

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

Учредители

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)

Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

Г.В. Орлова – канд. биол. наук (Россия)

Редакционный совет

В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия)
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)
А. Бёрнер – д-р наук (Германия)
В.М. Говорун – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)
Г.Л. Дианов – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
Ю.Е. Дуброва – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)
И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.Е. Керкис – д-р наук (Бразилия)
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США)
И.Б. Рогозин – канд. биол. наук (США)
А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
К.Г. Скрябин – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
К.В. Славин – д-р наук, проф. (США)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Т.Г. Амстиславская – д-р биол. наук, доцент (Россия)
Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)
Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)
Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)
Л.И. Афтanas – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Е.В. Березиков – канд. биол. наук, проф. (Россия, Нидерланды)
С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук, доцент (Россия)
В.Н. Даниленко – д-р биол. наук, проф. (Россия)
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)
Е.А. Долгих – канд. биол. наук (Россия)
Н.Н. Дыгало – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Л. Киселев – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.А. Козлов – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Ю.М. Константинов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
О. Кребс – д-р биол. наук, проф. (Германия)
И.Н. Лаврик – канд. хим. наук (Германия)
Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)
М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Н.А. Проворов – д-р биол. наук (Россия)
Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.В. Ратушный – канд. биол. наук (США)
Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Г. Самсонова – д-р биол. наук (Россия)
В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 8 times annually

Founders

Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

Editorial council

V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

L.A. Bespalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia

A. Börner, Dr. Sci., Germany

M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan

G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

V.M. Govorun, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

J. Le Gouis, Dr. Sci., France

I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany

S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil

L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands

V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia

V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States

A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia

A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States

S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.G. Skryabin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States

I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

T.G. Amstislavskaya, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia

Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.V. Berezikov, Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia, Netherlands

S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia

P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.A. Dolgikh, Cand. Sci. (Biology), Russia

N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

T.A. Gavrilenko, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.L. Kiselev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Kozlov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany

I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany

L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia

M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.A. Provorov, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States

E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Stepanov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

505

ОТ РЕДАКТОРА

Генофонд и селекция растений

506

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Генетические ресурсы цитрусовых культур в России, Украине и Беларуси: хранение и использование

Р.В. Кулян, Л.С. Самарина, Р.С. Рахмангулов, И.В. Кикавский, А.И. Алехна

515

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Засухоустойчивый генофонд твердой яровой пшеницы, идентифицированный в многолетних испытаниях питомников казахстанско-сибирской селекции пшеницы

М.Г. Евдокимов, В.С. Юсов, А.И. Моргунов, Ю.И. Зеленский

523

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Характеристика вирулентности популяций *Ruscinia triticina* и перспективы использования генов *Lr24*, *Lr25*, *LrSp* в селекции яровой мягкой пшеницы на Южном Урале

В.А. Тюнин, Е.Р. Шрейдер, Е.И. Гуляева, Е.Л. Шайдаюк

530

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Изучение межфазного периода «всходы – колошение» у исходных родительских форм и гибридов тритикале с разными генами *Vrn*

П.И. Стёпочкин, М.В. Емцева

534

ОБЗОР

Экологическая селекция растений: типы и практика

В.В. Сюков, В.Г. Захаров, А.И. Менибаев

537

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Комбинационная способность сортов ячменя ярового в системе прямых диаллельных скрещиваний

Е.В. Компанец, М.Р. Козаченко, Н.И. Васько, А.Г. Наумов, П.Н. Солонечный, С.И. Святченко

545

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Маркер-контролируемое получение и производство форм пшеницы с повышенным уровнем биофлавоноидов: оценка продукции для обоснования значимости направления

Е.К. Хлесткина, Н.И. Усенко, Е.И. Гордеева, О.И. Стабровская, И.Б. Шарфунова, Ю.С. Отмахова

554

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro*

Д.С. Мурасева, Н.С. Звягина, Т.И. Новикова, О.В. Дорогина

Генофонд и селекция животных

561

ОБЗОР

Криобанк генетических ресурсов кошачьих

С.Я. Амстиславский, В.И. Мокроусова, В.В. Кожевникова, Е.А. Кизилова, Е.Ю. Брусенцев, К.А. Окотруб, В.А. Напримеров, С.В. Найдено

569

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Роль условий среды пренатального роста плодов в формировании массы новорожденной особи у домашних свиней

С.В. Никитин, С.П. Князев, В.И. Ермолаев

Популяционная генетика

576

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в этнических группах, проживающих на территории Восточной Сибири

Е.В. Беляева, О.А. Ершова, Т.А. Астахова, О.В. Бугун

581

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Генетический полиморфизм и сопутствующие факторы риска ишемического инсульта в монгольской популяции Китая

Ч. У, Х. У, Ю.Л. Орлов, Г. Гегентана, В. Хуо, А.О. Брагин, Н. У, С. Суялату, Ф. Жао, Ж. Жао, Л.Э. Табиханова, М. Чен, Х. Бай

588

ОБЗОР

Генетическое разнообразие дождевого червя *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida)

С.В. Шеховцов, Д.И. Берман, Е.В. Голованова, С.Е. Пельтек

596

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Полиморфизм интрона гена *rps16* у представителей рода *Malus* Mill. и родственных видов семейства Rosaceae Juss.

М.А. Филюшин, К.В. Борис

- 505 FROM THE EDITOR
Plant gene pool and breeding
- 506 ORIGINAL ARTICLE
Citrus genetic resources in Russia, Ukraine, Belarus: conservation and management
R.V. Kulyan, L.S. Samarina, R.S. Rakhmangulov, I.V. Kikavskii, A.I. Alehna
- 515 ORIGINAL ARTICLE
Drought tolerance gene pool in developing adaptive varieties of durum wheat identified in study nurseries under the Kazakhstan-Siberian program
M.G. Evdokimov, V.S. Yusov, A.I. Morgounov, Yu.I. Zelensky
- 523 ORIGINAL ARTICLE
Characteristics of virulence of *Puccinia triticina* populations and the potential of the *Lr24*, *Lr25*, *LrSp* genes for spring common wheat breeding in the Southern Ural
V.A. Tyunin, E.R. Shreyder, E.I. Gulyaeva, E.L. Shaydayuk
- 530 ORIGINAL ARTICLE
Study of the interphase period “shoots–earring” of the initial parental forms and hybrids of triticale with different *Vrn* genes
P.I. Stepanchkin, M.V. Emtseva
- 534 REVIEW
Ecological plant breeding: types and practice
V.V. Syukov, V.G. Zakharov, A.I. Menibaev
- 537 ORIGINAL ARTICLE
Combining ability of spring barley varieties in the direct diallel cross system
E.V. Kompanets, M.R. Kozachenko, N.I. Vasko, A.G. Naumov, P.N. Solonechniy, S.I. Sviatchenko
- 545 ORIGINAL ARTICLE
Evaluation of wheat products with high flavonoid content: justification of importance of marker-assisted development and production of flavonoid-rich wheat cultivars
E.K. Khlestkina, N.I. Usenko, E.I. Gordeeva, O.I. Stabrovskaya, I.B. Sharfunova, Y.S. Otmakhova
- 554 ORIGINAL ARTICLE
Conservation of the West Sayan endemic *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) in *in vitro* collection
D.S. Muraseva, N.S. Zvyagina, T.I. Novikova, O.V. Dorogina
- Animal gene pool and breeding**
- 561 REVIEW
Genome resource banking in the family Felidae
S.Ya. Amstislavsky, V.I. Mokrousova, V.V. Kozhevnikova, E.A. Kizilova, E.Yu. Brusentsev, K.A. Okotrub, V.A. Naprimerov, S.V. Naidenko
- 569 ORIGINAL ARTICLE
The influence of prenatal environmental conditions on the weight of newborn domestic pigs
S.V. Nikitin, S.P. Knyazev, V.I. Ermolayev
- Population genetics**
- 576 ORIGINAL ARTICLE
Glutathione S-transferase polymorphism in ethnic groups living in Eastern Siberia
E.V. Belyaeva, O.A. Yershova, T.A. Astahova, O.V. Bugun
- 581 ORIGINAL ARTICLE
Genetic polymorphisms and related risk factors of ischemic stroke in a Mongolian population in China
Q. Wu, H. Wu, Yu.L. Orlov, G. Gegentana, W. Huo, A.O. Bragin, N. Wu, S. Suyalatu, F. Zhao, J. Zhao, L.E. Tabikhanova, M. Chen, H. Bai
- 588 REVIEW
Genetic diversity of the earthworm *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida)
S.V. Shekhovtsov, D.I. Berman, E.V. Golovanova, S.E. Peltek
- 596 ORIGINAL ARTICLE
Polymorphism of the *rps16* gene intron in *Malus* Mill. and related Rosaceae Juss. species
M.A. Filyushin, K.V. Boris

Уважаемые коллеги, дорогие читатели! Редакция Вавиловского журнала генетики и селекции рада сообщить о включении журнала в международную базу данных Scopus! Мы надеемся, что индексирование в МБД Scopus будет способствовать развитию журнала и расширению круга его читателей. Напоминаем нашим авторам, что у них есть возможность представлять свои работы как на русском, так и на английском языке.

Одно из важнейших направлений, освещаемых на страницах Вавиловского журнала генетики и селекции, – сохранение, развитие и использование биоресурсных коллекций. Этой теме посвящены два раздела настоящего номера – «Генофонд и селекция растений» и «Генофонд и селекция животных».

На Черноморском побережье Краснодарского края Российской Федерации находится самая северная в мире зона выращивания цитрусовых культур в открытом грунте. В этих условиях поддерживает свою уникальную коллекцию Всероссийский НИИ цветоводства и субтропических культур, который является площадкой для совершенствования агротехнических приемов и выведения новых сортов субтропических культур, устойчивых к низким температурам. Ученые из ВНИИЦиСК совместно с коллегами из Национального ботанического сада НАН Украины и Центрального ботанического сада НАН Беларуси, где коллекции цитрусовых выращивают в условиях оранжереи, представили обзорную статью, в которой обобщены сведения о коллекциях цитрусовых упомянутых учреждений, рассмотрены основные направления исследования данных коллекций и ключевые вопросы, связанные с их сохранением и развитием.

Для сохранения генофонда растений наряду с другими методами используется метод создания коллекций *in vitro*. Однако применение техноло-

гий микроклонального размножения, поддержания и регенерации растений требует их оптимизации в отношении каждого вида. Вниманию читателей предложен протокол сохранения в коллекции *in vitro* эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst., разработанный исследователями из Центрального сибирского ботанического сада СО РАН.

Современным подходом к сохранению *ex situ* генетических ресурсов млекопитающих служит криоконсервация эмбрионов и гамет. В обзорной статье новосибирских и московских авторов обсуждается проблема криосохранения генетических ресурсов кошачьих.

Несколько статей посвящены использованию генетических ресурсов в селекции. При этом рассмотрены различные направления селекции злаковых растений – от селекции на засухоустойчивость до производства форм диетического назначения.

В разделе «Популяционная генетика» затронуты вопросы этногеомики, распространения среди коренного населения Восточной Сибири аллельных вариантов полиморфных локусов, связанных с адаптационными механизмами.

Исследования в области этногеомики в Сибири в свое время были инициированы академиком В.П. Пузыревым. В июле Валерию Павловичу исполнилось 70 лет. Редакция журнала сердечно поздравляет юбиляра – заслуженного деятеля науки, члена Президиума Вавиловского общества генетиков и селекционеров, члена редакционного совета Вавиловского журнала генетики и селекции, и желает ему новых научных достижений! Под руководством В.П. Пузырева были выявлены новые данные по структуре наследственной компоненты подверженности артериальной гипертензии, коронарному атеросклерозу, аритмиям сердца, а в 1994 г. по его инициативе открыта первая в России генетическая клиника, ставшая Федеральным центром по медицинской генетике. Юбилею Валерия Павловича посвящена статья, опубликованная в электронном издании «Письма в Вавиловский журнал» (<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/anniversary/appx6.pdf>).

Академик В.К. Шумный

Генетические ресурсы цитрусовых культур в России, Украине и Беларуси: хранение и использование

Р.В. Кулян¹, Л.С. Самарина¹✉, Р.С. Рахмангулов¹, И.В. Кикавский², А.И. Алехна³

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур, Сочи, Россия

² Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

³ Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Коллекции *ex situ* генетических ресурсов цитрусовых культур составляют основу будущих селекционных программ, направленных на получение новых высокопродуктивных сортов. В основных цитрусопроизводящих странах в последние десятилетия происходит резкое снижение продуктивности многолетних цитрусовых насаждений. Риск сокращения генетических ресурсов сильно возрос из-за свирепствующих там заболеваний и распространения их на соседние насаждения. Поэтому сохранение биоразнообразия цитрусовых культур в нетипичных регионах их произрастания приобретает все большую актуальность. Цель данной работы – сравнить генетическое разнообразие цитрусовых культур в базовых коллекциях трех государств (России, Украины и Беларуси), выявить направления и перспективы использования имеющихся геноресурсов, а также основные проблемы их сохранения. Проведенный сравнительный анализ позволит наметить стратегию дальнейших исследований по цитрусовым культурам в нетипичных регионах выращивания. Коллекция цитрусовых на базе Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур насчитывает 132 генотипа, коллекция Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси – 100 генотипов, коллекция Национального ботанического сада им. Н.Н. Гришко Национальной академии наук Украины – около 60 генотипов. В статье приведен перечень видового и сортового разнообразия в коллекциях. Основные проблемы успешного сохранения и использования геноресурсов цитрусовых – недостаточное применение современных инструментов характеристики гермоплазмы, отсутствие единой web-базы данных геноресурсов и единого мнения по поводу видовой принадлежности некоторых таксонов. Кроме того, остро стоит необходимость фитосанитарного контроля в коллекциях и разработки современных тест-систем для быстрой диагностики заболеваний. Важной задачей является пополнение разнообразия, в первую очередь видового, путем обмена материалом с другими зарубежными коллекциями. Все это открывает горизонты для дальнейшей исследовательской работы по созданию депонированных коллекций геноресурсов цитрусовых.

Ключевые слова: *Citrus*; *Poncirus*; *Fortunella*; генетические ресурсы; биоразнообразие; генобанк; гермоплазма.

Citrus genetic resources in Russia, Ukraine, Belarus: conservation and management

R.V. Kulyan¹, L.S. Samarina¹✉, R.S. Rakhmangulov¹, I.V. Kikavskii², A.I. Alehna³

¹ Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Sochi, Russia

² N.N. Grishko National Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

³ Central Botanical Garden of National Academy of Sciences Belarus, Minsk, Belarus Republic

Citrus genetic resources including modern and old cultivars, breeding forms and wild genotypes form the basis of the global citrus industry, that is why the preservation of the biodiversity and the creation of duplicate collections all over the world is an important task. In recent decades, there has been a sharp decline in the productivity of citrus commercial plantations in the main citrus-producing countries. The risk of an abrupt reduction in genetic diversity greatly increased because of the accumulated diseases raging there and the spread of these diseases in the neighboring citrus groves. Therefore, the preservation of biodiversity in atypical citrus regions is becoming increasingly important. The aim of this study was to compare the genetic diversity of citrus crops in the basic collections of the three countries (Russia, Ukraine and Belarus), to determine the direction and prospects for the use of available genetic resources, as well as to reveal the main problems of germplasm preservation. The comparative analysis will determine the strategy for further studies on the citrus crops in atypical areas of cultivation. The collection of citrus based in the Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops contains 132 accessions, the collection of the Belarus Botanical Garden contains 100 accessions, the collection of the Grishko National Botanical Garden contains about 60 accessions. The list of species and cultivars of three collections is presented in the article. The main problems of the successful conservation and use of citrus genetic resources are insufficient use of modern tools of germplasm characterization, the absence of a unified web-database containing all available biodiversity, the lack of consensus regarding the taxonomic position of certain genotypes. Additionally, there is a need for disease control in collections, it is necessary to develop advanced test systems for rapid diagnosis of diseases. One more important task is the extension of species diversity through the exchange of material with other foreign collections.

Key words: *Citrus*; *Poncirus*; *Fortunella*; genetic resources; biodiversity; genebank; germplasm.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кулян Р.В., Самарина Л.С., Рахмангулов Р.С., Кикавский И.В., Алехна А.И. Генетические ресурсы цитрусовых культур в России, Украине и Беларуси: хранение и использование. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):506-514. DOI 10.18699/VJ17.21-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kulyan R.V., Samarina L.S., Rakhmangulov R.S., Kikavskii I.V., Alehna A.I. Citrus genetic resources in Russia, Ukraine, Belarus: conservation and management. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):506-514. DOI 10.18699/VJ17.21-o (in Russian)

Генетические ресурсы рода *Citrus*, включая современные и устаревшие сорта, селекционные формы и дикие генотипы, формируют основу развития мировой индустрии цитрусовых культур, поэтому сохранение максимально возможного биоразнообразия и создание дублирующих коллекций по всему миру является важной задачей.

В России цитрусовые культуры определяются как генетические ресурсы, представляющие потенциальную ценность для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства, поэтому их сохранение осуществляется на федеральном уровне на базе коллекции Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур (ВНИИЦиСК). Коллекции института расположены на Черноморском побережье Краснодарского края Российской Федерации – в самой северной в мире зоне выращивания цитрусовых культур в открытом грунте (Рындин, 2016). Это уникальный пограничный регион не только для совершенствования агротехнических приемов, но и для выведения новых сортов, устойчивых к низким температурам.

Украина и Беларусь – также нетипичные регионы произрастания цитрусовых культур. Коллекция цитрусовых содержится в условиях оранжереи с зимним обогревом. Во всех трех странах цитрусовые растения очень популярны в комнатном цветоводстве. С каждым годом интерес к цитрусовым культурам растет как у сельхозпроизводителей, ландшафтных дизайнеров, так и у любителей-цитрусоводов. Поэтому сохранение и пополнение геноресурсов цитрусовых культур в указанных регионах является актуальной задачей. Содержание коллекций цитрусовых в тепличных условиях будет способствовать более надежному сохранению биоразнообразия этих растений.

Коллекции цитрусовых *ex situ* имеются во многих странах, но зачастую они состоят из промышленных видов и сортов. Такие генобанки часто содержат многие формы и сорта одного и того же вида, поэтому видовое генетическое разнообразие в них меньше, чем может казаться из количества образцов (Citrus genetics..., 2007). К тому же во многих цитрусопроизводящих странах в последние десятилетия происходит резкое снижение продуктивности многолетних цитрусовых насаждений. Возрастает риск потери генетического разнообразия из-за распространения серьезных болезней и вредителей с промышленных насаждений на коллекционные (Belasque et al., 2010; Dibley, 2015).

К примеру, в 1970-х гг. было еще мало известно о заболевании Huanglongbing (HLB), но в последние 20 лет во многих странах оно привело цитрусовую отрасль к кризису (Belasque et al., 2010; Dibley, 2015; Payne, 2015). Средства для полного устранения его не найдено до сих пор, несмотря на то что только в одном штате Флорида США ежегодно выделяется более 20 млн долларов на исследования, посвященные борьбе с HLB. Существующие меры сдерживания распространения возбудителя повышают себестоимость производства плодов в два раза (Belasque et al., 2010). Симптомы становятся явными только через два-три года, за этот период с помощью прививочного ножа можно бесконтрольно разнести возбудителя по

питомнику и по коллекции. Кроме серьезной проблемы с HLB, существенный ущерб наносят такие болезни, как Citrus Tristeza virus, Citrus canker и др. Все это усиливает актуальность создания и пополнения коллекций видов цитрусовых в странах, не являющихся крупномасштабными производителями этих плодов.

В центрах естественного произрастания цитрусовых культур вследствие сокращения лесов, урбанизации и развития инфраструктуры, увеличения площадей под монокультурами, пожаров и развития туризма происходит резкое сокращение природного генетического разнообразия (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, India, 1994–1997). Это усиливает необходимость создания и пополнения коллекций *ex situ*, усиления сотрудничества между организациями, содержащими коллекции, в разных странах для обмена опытом и коллекционными образцами, а также разработки совместных программ и стратегий управления генетическими ресурсами (Roose et al., 2016; Volk et al., 2016b).

Целью данной работы были анализ генетического разнообразия цитрусовых культур в базовых коллекциях трех государств (России, Украины и Беларуси) и определение направления и перспектив использования имеющихся геноресурсов, а также основных проблем их сохранения. Проведенный сравнительный анализ позволит разработать стратегию дальнейших исследований по цитрусовым культурам в нетипичных регионах выращивания.

Генетические ресурсы цитрусовых культур в России

Интродукция цитрусовых культур в зоне Черноморского побережья Кавказа началась в 1902 г., тогда были приняты селекционные исследования на базе Сухумской опытной станции и Института горного садоводства (ныне ВНИИЦиСК). В ходе этой работы коллекция пополнялась, выводились новые сорта, адаптированные к местным условиям выращивания (Горшков, 2004; Кулян, 2014, 2015b; Рындин и др., 2014). Были заложены производственные насаждения мандарина и других видов цитрусовых, рентабельность которых подтверждена многолетним опытом (Горшков и др., 2013).

В настоящее время российская коллекция цитрусовых культур на базе ВНИИЦиСК представлена генетическим и эколого-географическим разнообразием видов и сортов, интродуцированных из Японии, Америки, Италии, Испании, Никарагуа, Грузии, Абхазии. В коллекцию входят дикие, полудикие виды и сорта местной селекции, устойчивые к биотическим и абиотическим факторам среды в этой зоне выращивания. В общей сложности коллекция ВНИИЦиСК насчитывает 132 сортообразца (таблица).

Генетические ресурсы цитрусовых культур на базе ВНИИЦиСК сохраняются в полевой коллекции, в защищенном грунте, а также ведется разработка приемов *in vitro* сохранения. Как в полевых коллекциях, так и в промышленных насаждениях основным подвоем является *Poncirus trifoliata*, устойчивый к низким отрицательным температурам, а в защищенном грунте цитрусовые выращиваются на зеленом подвое *Citrus aurantium* L. Растения сохраняются по три-пять и более образцов каждого генотипа. Для защиты от низких температур с 1967 г.

Genotypes of citrus accessions from three collections

No.	Taxon	Variety	Origin	Central Botanical Garden, NAS Belarus	Grishko National Botanical Garden, Ukraine	Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops
1	<i>Citrus aurantiifolia</i> var. <i>latifolia</i> Yu. Tanaka	'Tahiti' (Persian lime)	India	–	–	+
2	<i>Citrus aurantiifolia</i> Sw.	'La Valette'	Malta	–	+	–
3	<i>Citrus aurantium</i> L.	Bitter orange	India	–	–	+
4	<i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>salicifolia</i>	Unknown	USA	+	–	+
5	<i>Citrus aurantium</i> L.	'Consolei' ('Corniculata')	Spain	–	+	–
6	<i>Citrus australasica</i>	Unknown	Australia	+	–	–
7	<i>Citrus</i> × <i>myrtifolia</i> (Ker Gawl.) Raf.	Unknown	India	–	+	–
8	<i>Citrus</i> × <i>myrtifolia</i> (Ker Gawl.) Raf.	'Chinotto'	Italy	–	+	+
9	<i>Citrus bergamia</i> Risso	'Bergamot'	Italy	+	–	+
10	<i>Citrus bergamia</i> Risso var. <i>melarosa</i>	Melarosa	Italy	+	–	+
11	<i>Citrus ichangensis</i> Sw.	Ichangensis	China	–	–	+
12	<i>Citrus</i> × <i>clementina</i> Tan.	Clementina	USA	–	+	+
13	<i>Citrus</i> × <i>clementina</i> Tan.	'Kicli'	USA	+	–	+
14	<i>Citrus</i> × <i>clementina</i> Tan.	'Caftin'	USA	+	–	+
15	<i>Citrus juko</i> Tan.	'Juko juzu'	Japan	+	–	+
16	<i>Citrus juko</i> Tan.	'Nadezhda'	Soviet Union	–	–	+
17	<i>Citrus juko</i> Tan.	Juko tangerine	Iran	–	–	+
18	<i>Citrus leiocarpa</i> Tan.	'Shiva – Mikan'	Japan	+	–	+
19	<i>Citrus limettioides</i> Tan.	'Sweet Lime'	India	+	+	+
20	<i>Citrus limetta</i> Risso	Limetta	Italy	+	–	+
21	<i>Citrus</i> × <i>ponderosa</i>	Ponderosa	USA	+	+	+
22	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Del Brasile'	Brazil	+	–	+
23	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Canaliculata'	Italy	+	–	–
24	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Del Coronel'	Italy	–	–	+
25	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Eureka'	USA	+	–	+
26	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Ever Bearing'	USA	+	–	–
27	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Femminello'	Italy	–	+	–
28	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Carrubaro'	Italy	–	+	–
29	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Frost Eureka'	USA	–	+	+
30	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Frutto Picollo'	Italy	–	+	–
31	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Genoa'	USA	+	+	+
32	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Interdenato'	Italy	+	–	+
33	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Lisbon'	USA	+	+	+
34	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Lunario'	Italy	–	+	–
35	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Melos'	Italy	–	+	–
36	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Monachello'	Italy	+	–	–
37	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Perretone'	Italy	+	–	–
38	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Santa Teresa'	Italy	+	–	+
39	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Sone Guinea'	Italy	+	–	+
40	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Speciale'	Italy	+	–	–
41	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Toskano'	Italy	–	–	+
42	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Villa Franka'	USA	+	–	+
43	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Abkhazskiy'	Soviet Union	+	–	–
44	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Gagrinskiy'	Soviet Union	–	–	+
45	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Gizenko'	Soviet Union	+	–	+
46	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Gonio'	Soviet Union	+	–	+

Continuation of table

No.	Taxon	Variety	Origin	Central Botanical Garden, NAS Belarus	Grishko National Botanical Garden, Ukraine	Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops
47	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Dioskuria'	Soviet Union	+	–	+
48	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Morocco'	Iran	–	–	+
49	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Italian'	Italy	–	–	+
50	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Kabo'	Soviet Union	–	+	–
51	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Kievskiy'	Ukraine	+	–	–
52	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Krupnoplodnyy'	Soviet Union	+	–	+
53	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Kuznera'	Soviet Union	+	+	+
54	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Kurskiy'	Russia	–	+	–
55	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Maikopskiy'	Russia	+	–	+
56	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Mir'	Russia	+	–	+
57	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Moskovskiy'	Russia	–	–	+
58	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Novoafonskiy'	Soviet Union	+	+	+
59	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'New Zealand'	USA	–	–	+
60	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Odishi'	Soviet Union	+	–	+
61	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Pavlovskiy'	Russia	+	+	+
62	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Skierniewicka'	Poland	+	–	–
63	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Mediterráneo'	Italy	+	–	–
64	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Sukhumskiy'	Soviet Union	+	–	–
65	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Tashkentskiy'	Soviet Union	–	+	–
66	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Turetskiy'	Italy	–	–	+
67	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Uvarova'	Soviet Union	+	–	+
68	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Udarnik'	Soviet Union	+	+	+
69	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Ukrainskiy'	Ukraine	–	+	–
70	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Festival'nyy'	Soviet Union	–	+	–
71	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	'Yubileinyy'	Soviet Union	+	+	+
72	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	'Mato Buntan'	Japan	+	–	+
73	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	'Buntan'	Japan	–	–	+
74	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	'Hayat'	Turkey	+	–	–
75	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	'Kao Yao'	Japan	–	+	–
76	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	'Natsu Mikan'	Japan	–	–	+
77	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	'Natsudaidai'	Japan	–	–	+
78	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	'Sambokan'	Japan	+	–	+
79	<i>Citrus maxima</i> var. <i>pyriformis</i> (Hassk) Karaya	'Pyriformis'	Japan	–	+	–
80	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	'Gul'ripshskiy'	Soviet Union	+	–	+
81	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	'Meteleva'	Soviet Union	–	–	+
82	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	Pear-shaped pomelo	Japan	+	+	+
83	<i>Citrus medica</i> L.	Medica	India, China	–	+	+
84	<i>Citrus medica</i> L.	'Variegata'	India, China	+	+	–
85	<i>Citrus medica</i> L. var. <i>pyriformis</i> (Hassk) Karaya	Pyriformis	Japan	–	+	–
86	<i>Citrus medica</i> L.	Etrog	Mediterranean	+	+	–
87	<i>Citrus medica</i> var. <i>sarcodactylis</i> Sw.	'Buddha's hand'	India, China	+	+	+
88	<i>Citrus x meyeri</i> Tan.	Meyer lemon	China	+	+	+
89	<i>Citrus microcarpa</i> Bung.	Microcarpa	India	+	–	+
90	<i>Citrus microcarpa</i> Bung.	Microcarpa variegata	Italy	+	+	+
91	<i>Citrus microcarpa</i> Bung.	'Tiger'	USA	–	+	–

Continuation of table

No.	Taxon	Variety	Origin	Central Botanical Garden, NAS Belarus	Grishko National Botanical Garden, Ukraine	Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops
92	<i>Citrus</i> × (<i>Fingerlime</i> × <i>microcarpa</i>)	Fingerlime	Australia	–	–	+
93	<i>Citrus</i> × (<i>Fingerlime</i> × <i>microcarpa</i>)	Faustrimedin	USA	+	–	–
94	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	'Duncan'	USA	+	+	+
95	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	'Marsh Seedless'	USA	–	+	+
96	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	'Seedless'	USA	–	–	+
97	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	'Siamensis'	Italy	–	+	–
98	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	'Pernambuco'	USA	+	–	–
99	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	'Oyu'	USA	–	–	+
100	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	'Yubileinyy'	Soviet Union	+	–	+
101	<i>Citrus reshni</i> Tan.	'Cleopatra'	USA	+	–	+
102	<i>Citrus reticulata</i> Blan.	'Tardio'	Italy	–	–	+
103	<i>Citrus reticulata</i> Blan.	'Rage'	Italy	–	–	+
104	<i>Citrus reticulata</i> Blan.	'Honey'	USA	+	–	–
105	<i>Citrus reticulata</i> Blan.	'Liao Hung'	Japan	–	+	–
106	<i>Citrus reticulata</i> Blan.	'Rubin'	USA	–	+	–
107	<i>Citrus reticulata</i> Blan.	'Cami'	USA	–	+	–
108	<i>Citrus reticulata</i> Blan.	'Fortune'	USA	–	+	–
109	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Washington Navel'	USA	+	+	+
110	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Hamlin'	USA	–	+	+
111	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Lempso'	Italy	–	+	–
112	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Moro'	Italy	–	–	+
113	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Moro Nucelare'	Italy	–	+	–
114	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Moscate'	Italy	–	+	–
115	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Salustiana'	Spain	+	–	+
116	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Sanguinello'	Spain	+	–	–
117	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Tarocco'	Italy	+	+	–
118	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Tarocco Tapi'	Italy	+	+	–
119	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Tompson Navel'	USA	+	–	+
120	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Vainiglia'	USA	–	+	–
121	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Valensia'	Eastern Asia	+	–	+
122	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Verna'	Spain	–	+	–
123	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Afonskiy'	Soviet Union	–	–	+
124	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Grushevidnyy Korolek'	Soviet Union	+	–	–
125	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Pamyati Michurina'	Soviet Union	–	–	+
126	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Pervenets'	Soviet Union	–	–	+
127	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.	'Sukhumskiy'	Soviet Union	–	–	+
128	<i>Citrus tangerina</i> Tan.	'Tangerina'	Morocco	–	–	+
129	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Ikeda'	Japan	–	–	+
130	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Izeki Wase'	Japan	–	–	+
131	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Kowano Wase'	Japan	+	+	+
132	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Miyagawa Wase'	Japan	+	+	+
133	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Silverhill'	New Zealand	–	+	–
134	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Anaseuli'	Soviet Union	+	–	–
135	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Georgievskiy'	Soviet Union	+	–	+
136	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	Hybrid 10	Russia	–	–	+
137	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	Hybrid 3252	Russia	–	–	+

End of table

No.	Taxon	Variety	Origin	Central Botanical Garden, NAS Belarus	Grishko National Botanical Garden, Ukraine	Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops
138	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Iveriya'	Soviet Union	+	–	+
139	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Kelasurskiy'	Soviet Union	–	–	+
140	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	Clone 22	Soviet Union	–	–	+
141	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	Clone 33	Soviet Union	–	–	+
142	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Kodorskiy'	Soviet Union	–	–	+
143	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Krasnodarskiy'	Soviet Union	+	–	+
144	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Krupnoplodnyy'	Soviet Union	–	–	+
145	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'S 1'	Russia	+	–	+
146	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Ocho Wase'	Japan	–	–	+
147	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Pioner 80'	Soviet Union	+	+	+
148	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Saadreo'	Soviet Union	+	–	–
149	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Sakharnyy'	Soviet Union	+	–	+
150	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Sentyabr'skiy'	Soviet Union	+	+	+
151	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Se–Chen'	Japan	–	+	–
152	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Slava Vavilovu'	Soviet Union	+	–	+
153	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Sochinskiy 23'	Soviet Union	+	–	+
154	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Chernomorskiy'	Soviet Union	+	–	+
155	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Shirokolistnyy'	Soviet Union	–	–	+
156	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	'Yubileinyy'	Soviet Union	+	–	+
Interspecies hybrids and closely related species						
157	<i>Citrus × limonelloides</i>	Limonelloides	Asia	+	–	+
158	<i>Fortunella margarita</i> (Lour.) Sw.	Zhemchuznyy	Russia	+	+	+
159	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Unknown	Asia	+	–	+
160	<i>(C. sinensis × P. trifoliata) × Fortunella</i>	Tsitranzhkvat	Asia	–	–	+
161	<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corr.	Unknown	Asia	+	–	–
162	<i>C. limon × Fortunella</i>	Limonella	Unknown	–	–	+
163	<i>C. medica</i> L. × <i>C. maxima</i>	Unknown	Asia	+	–	–
164	<i>C. sinensis × Fortunella japonica</i>	Unknown	Unknown	+	–	–
165	<i>Citrus × insitorum</i> Mabb.	Tsitranzh	Unknown	–	–	+
166	<i>Feronia limonia</i>	Unknown	Unknown	+	–	–
167	<i>Fortunella crassifolia</i> Sw.	Thick-leaved	Unknown	–	+	+
168	<i>Fortunella japonica</i> (Thunb.) Sw.	Round	Japan	+	+	+
169	<i>Fortunella</i> sp. × <i>C. unshiu</i>	Hybrid 78	Russia	–	–	+
170	<i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng.	Unknown	Asia	+	–	–
171	<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack.	Unknown	Asia	+	–	–

цитрусовые культуры выращиваются в регионе с применением комбинированных укрытий в зимний период (Горшков, Капустин, 1988).

Генетические ресурсы цитрусовых культур на Украине (НБС им. Н.Н. Гришко)

Коллекцию цитрусовых растений в Национальном ботаническом саду стали комплектовать в 1950-х гг. по инициативе главного основателя сада действительного члена АН УССР Н.Н. Гришко. Основой коллекции послужили растения, полученные из Батуми, – лимоны сортов 'Genoa', 'Lisbon', 'Ударник', 'Villa-Franka'; ман-

дарин *Citrus unshiu* Marc.; апельсин 'Washington Navel'. Одновременно с этими генотипами была получена партия растений из Сочинской опытной станции субтропических культур (ныне ВНИИЦиСК), где их выращивали в форме кадочной культуры на протяжении пяти-восьми лет. Некоторые из них и теперь успешно произрастают в лимонарии и оранжерейно-экспозиционном комплексе НБС. Н.М. Вильчинским, первым куратором коллекции, в короткие сроки был разработан комплекс агротехнических мероприятий, что позволило получать высокоценные плоды цитрусовых в нетипичных регионах произрастания (Вильчинский, Бедриковська, 1960).

В 1964 и 1972 гг. из Сухумской опытной станции субтропических культур ВИР получены сорта лимона *Citrus limon* (L.) Burm. 'Юбилейный', 'Кабо', 'Павловский', 'Новогрузинский', 'Кузнера' (Черевченко и др., 1988). В 1988 г. коллекция пополнилась лимоном *Citrus × meyer* (лимон Мейера) из Батуми, а в 2009 г. – цитроном *Citrus medica* L. 'Рука Будды' (*C. medica* L. var. *sarcodactylis* (Hooten) Swingle), пестролистным цитроном *Citrus medica* L. var. *variegata* и пестролистным каламандином (*× Citrotfortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands). При содействии сотрудников Ботанического сада Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН коллекция была пополнена 12 сортами апельсина и мандарина. Фонд цитрусовых активно пополняется за счет обмена с цитrusоводами-любителями и в настоящее время представлен разновозрастными растениями 60 сортов, которые относятся к 3 родам, 11 видам.

Генетические ресурсы цитрусовых культур в Беларуси (ЦБС НАН Беларуси)

Еще в конце 1930-х гг. в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси удалось собрать коллекцию цитрусовых свыше 50 видов и сортов. Началом коллекции послужил сорт лимона 'Павловский', полученный из Богородского плодопитомнического совхоза. В 1978 г. из Батуми были привезены лимон сорта 'Новоафонский', мандарин *Citrus × unshiu* Marc. и апельсин 'Washington Navel'.

В 1991 и 1996 гг. из Института горного садоводства (ныне ВНИИЦиСК) г. Сочи получены сорта *C. limon* (L.) Burm.: *C. × meyer*, *C. verrucosa*, 'Новогрузинский', 'Кантонский', 'Villa-Franka', 'Eureka', 'Lisbon', 'Мир'. В 1995 г. коллекция цитрусовых пополнилась *C. limon* (L.) Burm. сортом 'Скернавицкий' и *C. medica* var. *sarcodactylis* Sw. ('Рука Будды'), а в 2001 г. – японским пестролистным каламандином *C. microcarpa* Bunge var. *variegata*, полученным из Ботанического института Российской академии наук им. В.Л. Комарова (Санкт-Петербург).

Большую помощь в становлении коллекции Минского лимонария оказали известные ученые-агрономы В.В. Воронцов и А.П. Токарев из сочинского Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур.

Масштабная реконструкция ЦБС началась со строительства новой оранжереи-лимонария в 2003 г. В настоящее время на базе лимонария создан сад субтропических плодовых культур, который является уникальной коллекцией, единственной в Республике Беларусь. Коллекция активно пополняется за счет обмена с ведущими в этой области научными учреждениями других стран, и теперь в ней представлено более 100 сортов и видов. В 2017 г. Центральный ботанический сад НАН Беларуси будет отмечать свое 85-летие.

Направления исследований в коллекциях

В России использование геноресурсов цитрусовых связано, в первую очередь, с селекционными программами, направленными на получение сортов с высокой урожайностью, раннеспелостью, низкорослостью, устойчивостью к экстремальным факторам среды (Рындин, Кулян, 2013а, б). Новые выделенные формы проходят первичное и государственное испытание на хозяйственно ценные

признаки, параллельно изучается биохимический состав плодов по показателям качества (Абильфазова, Кулян, 2015). Ведется постоянная работа с коллекцией цитрусовых по выделению источников хозяйственно ценных признаков и привлечению их в селекционный процесс (Кулян, 2014б, 2015б).

На базе ВНИИЦиСК в результате многолетних исследований и наблюдений разработана технология выращивания цитрусовых в открытом грунте. Обобщен опыт цитrusоводов и усовершенствованы элементы технологии выращивания цитрусовых культур в защищенном грунте (Рындин и др., 2016). Для получения высоких урожаев разработаны рекомендации по применению микроэлементов путем внесения внекорневых подкормок (Притула, Абильфазова, 2013). Постоянно проводится мониторинг вредителей и болезней, а также изучаются новые препараты по защите растений от вредителей и болезней (Игнатова, Карпун, 2013). Разрабатываются молекулярно-генетические маркеры для определения филогенетических связей между образцами в коллекциях, паспортизации генотипов и поиска генов хозяйственно ценных признаков. Ведется работа по *in vitro* сохранению и размножению ценных сортов и видов (Коломиец и др., 2014, 2015; Коломиец, Самарина, 2016).

В настоящее время осуществляется поиск направлений совместной работы с зарубежными институтами, которые занимаются сохранением геноресурсов цитрусовых культур, селекцией и молекулярно-генетическими исследованиями (США, Индия). Зарубежным селекционерам интересны российские холодостойкие продуктивные сорта для выращивания в более холодных зонах, где реже встречаются возбудители серьезных заболеваний цитрусовых (G. Volk, R. Krueger, E. Stover – личная переписка). Интерес для российской стороны состоит в пополнении коллекции видовыми образцами цитрусовых, имеющих хозяйственно ценные признаки, такие как «карликовость» и «холодостойкость».

На Украине основным направлением исследования цитрусовых в НБС является изучение структурной морфологии, репродуктивной способности цитрусовых. В целях получения большого количества посадочного материала совершенствуются методики вегетативного размножения. Ведется работа по определению оптимальных сроков, методов и подбору стимуляторов роста для решения проблем быстрого получения качественного посадочного материала разных видов цитрусовых. Параллельно проводятся исследования по оптимизации приемов прививки. Изучается влияние дикорастущих подвоев цитрусовых на интенсивность роста и развития их окультуренных форм, выясняются параметры оптимальных условий для их возделывания в защищенном грунте умеренной зоны Украины (Кикавский, 2012, 2013; Кикавский, 2016).

В Минском ботаническом саду на базе лимонария проводятся исследования по интродукции и акклиматизации; разрабатываются технологии и рекомендации по способам выращивания субтропических культур в условиях Беларуси; совершенствуются приемы размножения (черенкование, прививки, окулировки); проводятся испытания грунтов, удобрений и средств защиты; организованы экскурсии, выставки, занятия со школьниками и студентами,

съезды любителей-растениеводов из Клуба белорусских цитрусоводов (Гетко и др., 2014; Григорцевич и др., 2015).

Проблемы сохранения и перспективы использования геноресурсов

Основными проблемами успешного сохранения и использования геноресурсов цитрусовых являются недостаточное применение современных инструментов характеристики гермоплазмы (Volk, 2015; Liu et al., 2016; Yunsheng et al., 2016), отсутствие единой web-базы данных геноресурсов (Sanabam et al., 2012), споры по поводу видовой принадлежности некоторых таксонов (Roose et al., 2016; Volk et al., 2016a). Кроме того, остро стоит необходимость фитосанитарного контроля в коллекциях и разработки современных тест-систем для быстрой диагностики заболеваний (НАО et al., 2016). Важной задачей является пополнение разнообразия в коллекциях цитрусовых, в первую очередь, видового, путем обмена материалом с другими зарубежными коллекциями (см. таблицу).

Таким образом, в статье показано генетическое разнообразие цитрусовых культур в трех базовых коллекциях – России, Украины и Беларуси. Отмечено, что каждая коллекция содержит интересные генотипы, отсутствующие в других коллекциях. Наибольшее генетическое разнообразие имеется в коллекции ФГБНУ ВНИИЦиСК и в коллекции ЦБС НАН Беларуси. Коллекция НБС им. Н.Н. Гришко Украины содержит примерно в два раза меньше генотипов цитрусовых, чем в первых двух коллекциях. Большая часть генотипов трех коллекций идентичны, что и логично, так как они получены из коллекции Черноморского побережья Кавказа, однако необходимо проведение паспортизации этих сортов с привлечением молекулярных маркеров для подтверждения их генетической идентичности в трех коллекциях.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы

Abil'fazova Yu.S., Kulyan R.V. Brief biochemical characterization of mandarin hybrids. *Subtropicheskoye i dekorativnoye sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture*. 2015;54:62-67. (in Russian)

Belasque J.Jr., Bassanezi R.B., Yamamoto P.T., Ayres A.J., Tachibana A., Violante A.R., Tank A.Jr., Giorgi F.Di., Tersi F.E.A., Menezes G.M., Dragone J., Jank R.H.Jr., Bové J.M. Lessons from huanglongbing management in São Paulo State. Brazil. *J. Plant Pathol.* 2010;92(2):285-302.

Cherevchenko T.M., Prihod'ko S.N., Mayko T.K. *Tropicheskie i subtropicheskie rasteniya zakrytogo grunta: spravochnik [Tropical and subtropical plants in greenhouse conditions]*. Kiev, Naukova dumka, 1988;176-232. (in Russian)

Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology. Ed. I.A. Khan. Wallingford: CAB International, 2007;370.

Dibley S. Plant health Australia. Exercise yellow dragon: exercise report. Plant Health Australia. Canberra. ACT. 2015;1-16.

Getko N.V., Alekhna A.A., Suboch V.P., Pochitskaya I.M., Titok V.V. The composition of volatiles in hybrids and cultivars of *Citrus limon* (L.) Burm.f. grown in a greenhouse. *Vestnik Natsional'noi akademii nauk Belarusi*. Minsk: Belarusskaya Nauka. 2014;2:5-10. (in Russian)

Gorshkov V.M. Historical aspects and specific features of Citrus production in subtropical Russia in 1903–2003. *Subtropicheskoye i*

dekorativnoye sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture. 2004;39(2):388-403. (in Russian)

Gorshkov V.M., Fogel' V.A., Kulyan R.V. *Katalog tsitrusovykh kul'tur [Citrus crop catalog]*. Ed. by A.V. Ryndin. Sochi, 2013;91. (in Russian)

Gorshkov V.M., Kapustin V.P., Kuchero O.F. *Primenenie polimernykh karkasov dlya zashchity tsitrusovykh ot morozov [Application of polymer scaffolds for protecting citrus orchards from winter frost]*. Moscow: Agropromizdat. 1988;14. (in Russian)

Grigortsevich L.N., Surma M.A., Alekhna A.I., Telesh A.D. Agrotechnical measures of citrus propagation in greenhouse conditions. *Trudy BGU. Lesnoe Hozyaistvo = Proceedings of the Belarusian State Technological University: Forestry*. 2015;1:223-226. (in Russian)

Hao G., Stover E., Gupta G. Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to citrus canker and huanglongbing (HLB). *Frontiers Plant Sci.* 2016;7:1078. DOI 10.3389/fpls.2016.01078.

Ignatova Ye.A., Karpun N.N. Coccid species on citrus crops in subtropics of Krasnodar region. *Subtropicheskoye i dekorativnoye sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture*. 2013;48:209-220. (in Russian)

Kikavskiy I.V. Citrus plants in the National Botanical Garden of Ukraine. *Subtropicheskoye i dekorativnoye sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture*. 2012;47:68-73. (in Russian)

Kikavskiy I.V. Citrus L. plants in the National Botanical Garden of Ukraine. *Roľ botanicheskikh sadov v sokhranenni roznoobraziya rastenyi: Mater. Mezhdunar. nauch.-prakt. konf., posvyashch. 100-letiyu Batumskogo botanicheskogo sada, 8–10 maya*. Batumi [The role of botanical gardens in plant biodiversity conservation. Proceedings of the International Scientific Conference in behalf of the centenary of the Batumi botanical garden. 8–10 May]. Batumi, 2013;156-158. (in Russian)

Kikavskiy I.V. Seasonal growth habits of Citrus L. varieties. *Suchasni tendencii zberzhennja, vidnovlennja ta zbagachennja fitoriznomantitja botanichnykh sadiv i dendroparkiv: material mizhnar. nauk. konf. prysvjach. 70-richchju dendrologichnogo parku "Oleksandrija", jak naukovoï ustanovy NAN Ukraïny, 23–25 travnja* [Proceedings of the International conference in behalf of the 70th anniversary of the dendrological garden "Oleksandrija", Ukraine, May 23–25, 2016];178-180. (in Ukrainian)

Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Gvasaliya M.V., Samarina L.S., Sokolov R.N. Micropropagation in vitro of subtropical, ornamental and endemic species of Western Caucasus: original and optimized protocols. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural Biology*. 2014;3:49-58. (in Russian)

Kolomiets T.M., Samarina L.S. Protocol of long-term in vitro storage of commercial citrus species. *Subtropicheskoye i dekorativnoye sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture*. 2016;56:169-184. (in Russian)

Kolomiets T.M., Samarina L.S., Gubaz S.L. Propagation and conservation of Citrus limon by in vitro micrografting. *Problemy razvitiya APK regiona = Regional Problems of AIC Development*. 2015;4(24):28-31. (in Russian)

Kulyan R.V. Crossing ability of citrus species for interspecific and interspecific hybridization. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural Biology*. 2014;1:36-41. (in Russian)

Kulyan R.V. The role of mutational variability in Citrus reticulata Blanco var. Unshiu Tan. *Subtropicheskoye i dekorativnoye sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture*. 2015a;53:85-90. (in Russian)

Kulyan R.V. Germplasm collection of citrus – a basis and source of useful agronomic traits. *Vestnik Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Proceedings of the Michurinsk State Agrarian University*. 2015b;4:52-56. (in Russian)

Liu X., Tang L., Wu H., Xi W., Yu J., Zhou Z. Development of DArT markers and evaluation of phylogenetic relationship of key Citrus species. *Gen. Resour. Crop. Evol.* 2016;63:1307.

Payne J. Connecting with Cuba Citrus Industry. 2015;4-5.

- Pritula Z.V., Abil'fazova Yu.S. Guidelines on foliar micronutrient application to mature plants of Miagava-Vase dwarf mandarin varieties. *Subtropicheskoye i dekorativnoye sadovodstvo* = Subtropical and Ornamental Horticulture. 2013;48:280-288. (in Russian)
- Roose M.L., Gmitter F.G.Jr., Lee R., Hummer K., Machado M., Ashmore S., Deng X., Ancillo G., Vives M.C., Volk G.M., Kahn T.L., Luro F. Development of a global conservation strategy for citrus genetic resources. *Acta Horticulturae*. 2015;1065:75-84.
- Ryndin A.V. Achievements of the Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops in 2015. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii* = Pomiculture and Small Fruit Culture in Russia. 2016;44:57-68. (in Russian)
- Ryndin A.V., Belous O.G., Malyarovskaya V.I., Pritula Z.V., Abil'fazova Ju.S., Kozhevnikova A.M. Physiological and biochemical methods for studying adaptation mechanisms in subtropical fruit crops and ornamental species in Russian subtropical regions. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya* = Agricultural Biology. 2014;3:40-48. (in Russian)
- Ryndin A.V., Gorshkov V.M., Kulyan R.V., Karpun N.N., Ignatova Ye.A., Sabekiya D.A. *Lyubitel'skoe tsitrusovodstvo* [Amateur Citrus Growing], Sochi, 2016. (in Russian)
- Ryndin A.V., Kulyan R.V. Genetic potential of modern citrus assortment on the Black Sea coast of Russia. *Vestnik Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk* = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2013a;6:41-45. (in Russian)
- Ryndin A.V., Kulyan R.V. The potential to increase frost hardiness of citrus in humid subtropical regions of Russia. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii* = Pomiculture and Small Fruit Culture in Russia. 2013b;37(2):204-207. (in Russian)
- Sanabam R., Somkuwar B.G., Thingnam G., Moirangthem S., Jyoti P.H., Huidrom S. CIBMAN: Database exploring citrus biodiversity of manipur. *Bioinformation*. 2012;8(17):838-840.
- Vil'chinskiy M.M., Bedrikivs'ka N.P. *Kollektsiya tsitrusovykh rasteniy botanicheskogo sada AN URSR i biokhimicheskaya kharakteristika plodov limona* [Citrus collection of the Botanical garden of the Academy of Sciences of the Ukrainian Soviet Socialist Republic and biochemical characterization of lemon fruits]. *Aklimatizatsiya Roslin* [Plant Acclimatization. Proceedings of the Botanical Garden]. 1960;7:137-142 (in Ukrainian)
- Volk G.M. Widespread applications of citrus cryopreservation. *Citrograph*. 2015;6(2):42-44.
- Volk G.M., Bonnart R.M., Shepherd A.N., Yin Z., Lee R.F., Polek M., Krueger R. Citrus cryopreservation: viability of diverse taxa and histological observations. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 2016a. DOI 10.1007/s11240-016-1112-4.
- Volk G.M., Lee R.F., Krueger R. The value of citrus genebanking. *Citrograph*. 2016b;7(4):42-44.
- Vorontsov V.V., Lavriychuk I.I., Zagaynyy S.A., Gorshkov V.M., Lozhnitsyn I.P., Goletiani T.G., Ksenofontova D.V. *Methodic Guidelines for dwarf mandarin growing technology in subtropics of Krasnodar kray*. Sochi, 1979. (in Russian)
- Yunsheng W., Zhou L., Yu X., Stover E., Luo F., Duan Y. Transcriptome profiling of huanglongbing (HLB) tolerant and susceptible citrus plants reveals the role of basal resistance in HLB tolerance. *Front. Plant Sci.* 2016;7:933. DOI 10.3389/fpls.2016.00933.



Засухоустойчивый генофонд твердой яровой пшеницы, идентифицированный в многолетних испытаниях питомников казахстанско-сибирской селекции пшеницы

М.Г. Евдокимов¹, В.С. Юсов¹✉, А.И. Моргунов², Ю.И. Зеленский³

¹ Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Омск, Россия

² Представительство Международного центра улучшения кукурузы и пшеницы в Центральной Азии и Закавказье (CIMMYT), Анкара, Турция

³ Представительство Международного центра улучшения кукурузы и пшеницы в Центральной Азии и Закавказье (CIMMYT), Астана, Казахстан

В условиях Западной Сибири и Северного Казахстана в течение вегетационного периода часто проявляются засухи различных видов. В связи с этим большое значение имеют сорта, адаптивные к климатическим зонам, с повышенной засухоустойчивостью и высокой стабильностью. Эффективность и скорость селекции по этим направлениям зависят от количества информации, характеризующей генотипы, поступающей в каждом цикле исследований. Увеличение такого «потока» информации за один год достигается системной организацией сортоиспытаний по экологическим пунктам, различающимся динамикой и стрессовой нагрузкой метеофакторов. Основная цель работы заключается в следующем: с использованием результатов экологических испытаний в системе КАСИБ (Казахстанско-Сибирская сеть по селекции яровой пшеницы) дифференцировать селекционный материал научных учреждений Сибири и Казахстана и сформировать исходный материал по засухоустойчивости. На протяжении 2000–2015 гг. проведено изучение генофонда яровой твердой пшеницы КАСИБ в экологических пунктах Казахстана и России. Отмечен прогресс в селекции яровой твердой пшеницы в селекционных учреждениях России и Казахстана. Выделены генотипы, представляющие интерес по засухоустойчивости, урожайности и ее стабильности и пластичности при создании сортов в условиях Казахстана и Сибири. Для практической селекции на засухоустойчивость рекомендуются сорта и линии твердой пшеницы – 383-МС, 452-МС, Каргала 303, Каргала 447, Каргала 24, Каргала 1515/06, Каргала 1516/06, Каргала 69, Каргала 1538, Каргала 1540, Каргала 1539, Каргала 1671, Каргала 1411 (Актюбинская СХОС), Гордеиформе 91-25-5, Гордеиформе 91-22-2, Жемчужина Сибири, Гордеиформе 94-94-13, Гордеиформе 98-42-1, Гордеиформе 01-121-3, Гордеиформе 02-156-1 (Сибирский НИИСХ), Алтын шығыс, Алтын дала, линия Г1549 (Карабалыкская СХОС), Гордеиформе 373, Гордеиформе 627 (Алтайский НИИСХ), 17394, 18053, Наурыз-6 (Казахский научно-производственный центр земледелия и растениеводства), Коллективная 2, ТС-15 (Курганский НИИСХ), линия 653д-4 (Самарский НИИСХ).

Ключевые слова: сорт; линия; генофонд; засухоустойчивость; стабильность; адаптивность.

Drought tolerance gene pool in developing adaptive varieties of durum wheat identified in study nurseries under the Kazakhstan-Siberian program

M.G. Evdokimov¹, V.S. Yusov¹✉, A.I. Morgounov², Yu.I. Zelensky³

¹ Siberian Agricultural Research Institute, Omsk, Russia

² International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Ankara, Turkey

³ International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Astana, Kazakhstan

Drought during the wheat vegetative period happens often in West Siberia and Kazakhstan condition. For this reason, varieties with adaptation to climatic zones, drought tolerance and high stability have high importance. The breeding efficiency and rates depend on the amount of information on genotypes in every study cycle. The aim of this study was to screen breeding material in Siberian and Kazakhstan research institutes from KASIB nurseries for drought tolerance and to develop a drought tolerant pool. For the evaluation of genotypes, it is necessary to study them in diverse condition. The basic purpose of the present work is to study breeding material of durum wheat from KASIB institutions at different ecological sites. In 2000–2015, durum wheat entries in the Kazakhstan-Siberian program were studied. Progress in durum wheat breeding was tested in Russian and Kazakhstan institutes. Entries were screened for drought tolerance, yield and yield stability. They have value for including in hybridization for developing varieties with adaptation to Siberian and Kazakhstan conditions. The following varieties and lines are recommended for breeding for drought tolerance: 383-MC, 452-MC, Kargala 303, Kargala 447, Kargala 24, Kargala 1515/06, Kargala 1516/06, Kargala 69, Kargala 1538, Kargala 1540, Kargala 1539, Kargala 1671, Kargala 1411 (Aktubinsk Agricultural Experimental Station), Hordeiforme 91-25-5, Hordeiforme 91-22-2, Jemthujina Sibiri, Hordeiforme 94-94-13, Hordeiforme 98-42-1, Hordeiforme 01-121-3, Hordeiforme 02-156-1 (Siberian

Research Agricultural Institute), Altin schigis, Altin dala, Line Г1549 (Karabalyk Experimental Station), Hordeiforme 373, Hordeiforme 627 (Altai Research Agricultural Institute), 17394, 18053, Nauriz-6 (Kazakh Research-Production Center of Agriculture and Plant Growing), Kollektivnaya 2, TC-15 (Kurgan Research Agricultural Institute), Line 653d-4 (Samara Research Agricultural Institute).

Key words: variety; line; gene pool; drought tolerance; stability; adaptivity.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Евдокимов М.Г., Юсов В.С., Моргунов А.И., Зеленский Ю.И. Засухоустойчивый генофонд твердой яровой пшеницы, идентифицированный в многолетних испытаниях питомников казахстанско-сибирской селекции пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):515-522. DOI 10.18699/VJ17.23-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Evdokimov M.G., Yusov V.S., Morgounov A.I., Zelensky Yu.I. Drought tolerance gene pool in developing adaptive varieties of durum wheat identified in study nurseries under the Kazakhstan-Siberian program. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):515-522. DOI 10.18699/VJ17.23-o (in Russian)

Основная задача зернопроизводителей – получение высокой и стабильной урожайности. Однако в условиях Сибири и Северного Казахстана в течение вегетационного периода часто проявляются засухи различного вида, которые вносят существенные коррективы в производство зерна пшеницы. Наблюдаются как почвенные, так и воздушные типы засухи с преобладанием почвенных, а в отдельные годы возможны оба вида засухи. При этом они чаще бывают в первой половине вегетации.

Существует множество физиологических методов диагностики засухоустойчивости растений, которые изложены в монографиях В.А. Кумакова (1980), П.А. Генкеля (1982), Г.В. Удовенко (1988). Разработан также целый ряд методов, используемых для оценки твердой пшеницы (Jaradat, Konzak, 1983; Ehdaie, Waines, 1988; Navaux et al., 1988; Clarke et al., 1989; Gumnuluri et al., 1989; Кожушко и др., 1990; Кубайли и др., 1990; Venora, Calcagno, 1991). Однако селекционеры при оценке засухоустойчивых генотипов чаще используют более доступные показатели. А.И. Грабовец и М.А. Фоменко (2016) считают, что масса зерна с единицы площади, уборочный индекс – наиболее объективные показатели адаптации генотипа к засухе. Полевая засухоустойчивость оценивается по степени снижения продуктивности в условиях засухи по сравнению с продуктивностью в благоприятных условиях (Головоченко, 2001; Янченко и др., 2004; Лепехов, Коробейников, 2013).

Наиболее распространенный метод создания адаптивных и засухоустойчивых сортов – гибридизация с использованием соответствующего исходного материала. Эффективность и скорость селекции по этим направлениям зависят от количества информации, характеризующей генотипы и поступающей в каждом цикле исследований. Увеличение такого «потока» информации за один год достигается системной организацией сортоиспытаний по экологическим пунктам, различающимся динамикой и стрессовой нагрузкой метеофакторов. В связи с этим в 1999 г. была создана Казахстанско-Сибирская сеть по селекции яровой пшеницы (КАСИБ). Основное назначение КАСИБ – повышение эффективности селекции яровой пшеницы в Северном Казахстане и Сибири путем обмена сортами, селекционным материалом, информацией при встречах, совещаниях, координированной оценки материала (Моргунов, 2003). Участники программы КАСИБ

по яровой твердой пшенице – Казахский НИИ зернового хозяйства им. А.А. Бараева (КазНПЦЗХ), Казахский научно-производственный центр земледелия и растениеводства (КазНПЦЗиР), Карабалыкская сельскохозяйственная опытная станция, Актюбинская сельскохозяйственная опытная станция, Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Курганский научно-исследовательский институт сельского хозяйства. Испытание селекционного материала во многих экологических точках позволило селекционерам Международного центра улучшения кукурузы и пшеницы (CIMMYT) создать сорта, сочетающие высокий потенциал продуктивности с экологической пластичностью. Убедительные данные о возможности выведения высокоурожайных, отзывчивых на благоприятные условия сортов, адаптированных к засухе в маргинальных регионах, приводит S. Rajaram (2003). Результаты испытаний КАСИБ в условиях Западной Сибири показали, что по некоторым признакам выделяются формы, представляющие интерес в качестве исходного материала (Евдокимов и др., 2008). Основная цель нашей работы – при использовании результатов экологических испытаний в системе КАСИБ дифференцировать селекционный материал научных учреждений Сибири и Казахстана по засухоустойчивости и сформировать исходный материал по этому направлению. Новизна и уникальность исследований заключаются в том, что такое широкое экологическое испытание по твердой пшенице в России и Казахстане проведено впервые.

Материалы и методы

Изучены питомники КАСИБ, сформированные в 2000–2014 гг. (табл. 1). Сорта испытывали в различных почвенно-климатических условиях (в Российской Федерации – в Омской, Самарской, Курганской областях и Алтайском крае; в Республике Казахстан – в Целиноградской, Актюбинской, Костанайской, Алма-Атинской, Павлодарской, Карагандинской областях).

Исходный материал по программе КАСИБ изучали в соответствии с методическими указаниями ВИР (Методические указания..., 1999). Площадь делянок 2–3 м². Повторность опыта 2–3-кратная. Исследовали комплекс

Table 1. Numbers of KASIB accessions studied

Nursery	Year of study	Number of accessions	Number of test sites
1 KASIB SDW	2000	23	5
2 KASIB SDW	2001	20	5
4–5 KASIB SDW	2003–2004	16	10; 11
6–7 KASIB SDW	2005–2006	17	8; 6
8–9 KASIB SDW	2007–2008	16	6; 5
10–11 KASIB SDW	2009–2010	18	5; 5
12–13 KASIB SDW	2011–2012	22	7; 7
14–15 KASIB SDW	2013–2014	22	7; 8

SDW, spring durum wheat.

хозяйственно ценных признаков, но в данной статье приводится один показатель – урожайность зерна. Математическую обработку полученных данных выполняли по Б.А. Доспехову (1973). Весь набор сортов был проверен на засухоустойчивость и адаптивность. Индекс засухоустойчивости рассчитывали по формуле Фишера и Маурера (цит. по: [Янченко и др., 2004]):

$$DSI = (1 - Y/Y_p) / (1 - X/X_p),$$

где DSI – индекс засухоустойчивости; Y – урожайность сорта в условиях стресса; Y_p – урожайность сорта без стресса; X – средняя урожайность по всем сортам при стрессе; X_p – средняя урожайность по всем сортам без стресса. Параметры экологической пластичности рассчитывали по S.A. Eberhart и W.A. Russel ((1966) в изложении: Зыкин и др., 1984).

Результаты и обсуждение

Селекционный материал питомников КАСИБ изучен в различных почвенно-климатических зонах России и Казахстана. В табл. 2 показаны экологические пункты, в которых испытание проводилось не менее трех лет. Наиболее жесткие условия для возделывания твердой пшеницы сложились в Актобе (Казахстан), поскольку

средняя урожайность по всем питомникам была 15.9 ц/га. При двухлетнем испытании в Павлодаре она составляла 9.8–12.7, в Петропавловске – 14.6–15.9 ц/га. В условиях Барнаула она была равной 30.5 ц/га, Омска – 28.4 ц/га (Россия) Алматы – 29.2 ц/га (Казахстан). В остальных экологических точках – в пределах 26.3–27.2 ц/га.

В табл. 3 представлены наиболее урожайные (тройка лидеров) и самые засухоустойчивые сорта, имеющие наименьшие показатели индекса засухоустойчивости.

В питомнике КАСИБ 1 по средней урожайности во всех испытываемых пунктах в тройке лидеров были сорта Аметист, Гордеиформе 91-25-5 (Сибирский НИИСХ), линия 180022-1 (КазНПЦЗиР). Эти сорта высокопластичны и отзывчивы на улучшение условий среды (коэффициенты регрессии урожайности на индексы среды равны 1.31–1.53, по (Eberhart, Russel, 1966)). По индексу засухоустойчивости (0.76–0.83) выделились сорта 17394, 18053 селекции КазНПЦЗиР. Стабильность урожайности у них была выше, но по уровню урожайности они значительно уступали остальным сортам. К числу засухоустойчивых можно отнести сорт Омская янтарная (Сибирский НИИСХ). Гордеиформе 91-25-5, 17394, 18053, Омская янтарная имели показатели урожайности выше и в условиях стресса. Сорта алтайской селекции испыты-

Table 2. Yields of spring durum wheat in KASIB trials averaged over KASIB nurseries, metric centners/ha

Locality	KASIB								Mean
	1	2	4–5	6–7	8–9	10–11	12–13	14–15	
Aktobe		25.2	25.9	9.5	19.9	6.1	11.1	13.6	15.9
Karabalyk	31.6	39.9	18.4	37.1	23.9	25.7	30.7	7.4	26.8
Shortandy	28.5	31.9	20.8				26.9	23.3	26.3
Almaty			27.2	35.8		20.5	24.1	38.2	29.2
Barnaul		18.5	37.4	24.8	34.5	39.7	22.3	36.0	30.5
Omsk		31.4	32.4	21.7	33.7	25.1	32.2	22.3	28.4
Otar		45.3		17.2	19.2				27.2
Karaganda	42.0	19.1	18.9						26.6
LSD ₀₅	3.2	3.0	2.6	2.4	2.8	2.3	2.0	2.4	2.6

Table 3. The most productive and drought-tolerant varieties in KASIB nurseries

Variety/line	Yield, metric centners/ha			DSI	V, %	Bi	S ² d
	average	stress	without stress				
KASIB 1							
Ametist	31.8	10.6	46.0	1.06	67.9	1.53	8.79
Hordeiforme 91-25-5	29.7	11.9	41.6	0.98	67.7	1.39	37.89
18022-1	28.5	10.5	40.5	1.02	65.1	1.31	9.37
17394	20.4	11.8	26.1	0.76	43.1	0.59	13.61
18053	22.6	11.8	29.8	0.83	46.4	0.74	4.95
Omskaya yantarnaya	27.7	12.1	38.0	0.94	56.4	1.07	24.39
KASIB 2							
Hordeiforme 430-88	33.5	13.8	47.9	1.51	59.7	1.60	14.78
Hordeiforme 242-93	35.7	17.0	48.3	1.38	52.9	1.54	31.40
Hordeiforme 127-89	34.1	18.4	44.2	1.24	44.3	1.26	14.86
383-MS	24.2	22.5	28.4	0.44	32.7	0.38	15.84
452-MS	28.1	22.5	34.4	0.73	44.9	0.63	104.9
Hordeiforme 91-22-2	27.8	20.4	32.5	0.79	35.8	0.80	23.59
KASIB 4–5							
Jemthujina Sibiri	26.4	19.1	34.7	0.95	33.93	1.15	15.60
Damsinnskaya yantarnaya	25.1	17.3	33.6	1.12	30.73	1.06	7.84
173/93-1	25.7	18.3	34.6	1.10	33.37	1.18	6.17
Kollektivnaya 2	22.7	18.9	26.7	0.64	24.48	0.73	4.02
TS-15	20.7	16.1	25.6	0.67	37.55	0.89	19.81
KASIB 6–7							
Hordeiforme 94-94-13	29.4	21.3	37.4	0.80	36.1	0.98	13.16
Subastrale 489	27.3	15.5	41.1	1.15	55.6	1.11	15.55
Kargala 303	26.9	21.5	33.3	0.66	37.9	0.76	39.35
Kargala 447	26.2	19.3	33.1	0.77	40.7	1.06	12.71
Kargala 24	24.7	18.2	32.2	0.81	42.2	0.94	11.02
KASIB 8–9							
Altyn schygys	28.4	17.1	34.9	0.85	34.8	0.82	10.45
Altyn dala	28.1	15.7	33.9	0.90	38.5	1.13	3.81
Nauryz 6	28.2	18.7	34.0	0.75	32.6	0.46	22.63
Kargala 1515/06	24.7	13.1	30.1	0.94	38.7	0.85	13.82
Kargala 1516/06	24.9	15.1	29.5	0.82	32.7	0.51	13.07
KASIB 10–11							
Hordeiforme 561	30.2	12.2	39.3	1.11	60.6	1.28	1.71
Hordeiforme 98-42-1	30.0	15.6	37.3	0.93	53.6	1.13	0.68
Hordeiforme 97-49-1	29.6	12.0	38.9	1.11	59.1	1.28	0.78
Kargala 69	26.1	13.9	32.5	0.78	51.5	0.91	7.80
Kargala 1538	24.7	14.6	30.5	0.84	47.9	0.87	38.94
Kargala 1540	26.8	14.4	32.7	0.90	49.3	0.88	1.56
KASIB 12–13							
688d-4	26.0	13.5	35.3	1.00	57.2	1.11	17.19
653d-44	25.6	14.6	33.8	0.92	54.2	1.05	8.29
Omskiy izumrud	25.4	13.2	34.6	1.00	54.3	1.04	8.34
Kargala 1538	24.4	14.0	32.2	0.92	56.3	1.01	18.83
Kargala 1539	24.1	13.4	32.1	0.94	54.6	0.98	15.04
Kargala 1671	22.5	12.8	29.8	0.93	55.5	0.94	9.47

End of Table 3

Variety/line	Yield, metric centners/ha			DSI	V, %	Bi	S ² d
	average	stress	without stress				
	KASIB 14–15						
Hordeiforme 01-121-3	29.5	17.7	35.6	0.98	34.9	1.01	14.48
Hordeiforme 02-156-1	29.0	17.8	35.1	0.96	34.3	1.00	16.93
Hordeiforme 04-85-4	29.1	17.0	35.2	1.01	38.2	1.05	10.30
Kargala 1411	19.8	13.0	23.3	0.86	41.2	0.72	14.88
G1549	23.4	15.4	27.3	0.85	42.5	1.00	8.06
Hordeiforme 627	24.8	16.1	28.9	0.87	42.3	1.06	32.34

LSD₀₅ Siberian Research Institute of Agriculture: KASIB, metric centners/ha: 1 – 1.2; 2 – 2.5; 4–5 – 2.7; 6–7 – 2.8; 8–9 – 3.0; 10–11 – 2.2; 12–13 – 2.6; 14–15 – 2.0

DSI, drought sensitivity index; V, coefficient of variation; Bi, regression coefficient; S²d, variance of deviations.

вали только в двух пунктах, поэтому расчеты индексов и параметры стабильности по ним не проведены. Однако следует отметить, что при испытании в Павлодаре Гордеиформе 373 сформировал самый высокий урожай и его можно отнести к числу засухоустойчивых. Кроме того, у высокопродуктивного сорта Гордеиформе 91-25-5 индекс засухоустойчивости был ниже 1.00 и составил 0.98.

В КАСИБ 2 выделились по урожайности три образца селекции Карабалыкской СХОС: Гордеиформе 242-93, Гордеиформе 127-89, Гордеиформе 430-88 с высокой экологической пластичностью. К числу засухоустойчивых генотипов отнесены 383-МС, 452-МС (Актюбинская СХОС), Гордеиформе 91-22-2 (Сибирский НИИСХ). Значения DSI: 0.44–0.79. Более стабильную урожайность формировали сорта 383-МС, Гордеиформе 91-22-2. Коэффициент вариации у них был 32.7–35.8 %, при наивысшем значении, 59.7 %, у Гордеиформе 430-88.

В условиях 2003–2004 гг. (КАСИБ 4–5) лучшими по продуктивности в этом питомнике были Жемчужина Сибири (Сибирский НИИСХ), Линия 173/93, Дамсинская янтарная (КазНПЦЗХ). Экологическая пластичность сорта Жемчужина Сибири, линии 173/93 выше, чем у других сортов, и характеризует большую широту нормы реакции и отзывчивость их на более благоприятный комплекс среды. Высокая пластичность сорта Жемчужина Сибири подтверждается в исследованиях П.Н. Мальчикова с коллегами (2016). Степень засухоустойчивости была выше у сортов Коллективная 2, ТС-15 (Курганская НИИСХ), Жемчужина Сибири (Сибирский НИИСХ). Наиболее стабильный сорт – Коллективная 2 ($V = 24.5 \%$, $S^2d = 4.02$).

В КАСИБ 6–7 выделились по урожайности сорта Гордеиформе 94-94-13 (Сибирский НИИСХ), Субастрале 489 (Алтайский НИИСХ), Каргала 303 (Актюбинская СХОС). Однако только Субастрале 489 является пластичным сортом.

По индексу засухоустойчивости имели преимущество сорта Каргала 303, Каргала 447, Гордеиформе 94-94-13, Каргала 24. Необходимо отметить, что Гордеиформе 94-94-13, Каргала 303 удачно совмещают высокую продуктивность с засухоустойчивостью. Кроме того, это самые стабильные генотипы по урожайности ($V = 36.1$ – 37.9% при максимальном значении в питомнике – 69.02 %).

В КАСИБ 8–9 (2007–2008 гг.) наибольший урожай сформировали Алтын шыгыс, Алтын дала (Карабалыкская СХОС), Наурыз-6 (КазНПЦЗиР). Алтын дала сочетает высокую урожайность с пластичностью. Причем эти же сорта оказались засухоустойчивыми. Кроме них по засухоустойчивости выделились сорта Каргала 1515/06, Каргала 1516/06 (Актюбинская СХОС), но по средней урожайности они явно уступили лидерам в этом питомнике. Наименьшее варьирование по урожайности имели сорта Наурыз 6, Каргала 1516/06, Алтын шыгыс. В тройке лидеров по урожайности в КАСИБ 10–11 находились сорта Гордеиформе 561 (Алтайский НИИСХ), Гордеиформе 98-42-1, Гордеиформе 97-49-1 (Сибирский НИИСХ), сочетающие высокую пластичность со стабильностью, по параметрам S.A. Eberhart и W.A. Russel (1966). По степени засухоустойчивости преимущество имели сорта Каргала 69, Каргала 1538, Каргала 1540 (Актюбинская СХОС), Гордеиформе 98-42-1 (Сибирский НИИСХ).

Изучение генотипов в питомнике КАСИБ 12–13 показало, что наиболее урожайные образцы – 688д-4, 653д-44 (Самарский НИИСХ) и сорт Омский изумруд (Сибирский НИИСХ). Причем 653д-44, Омский изумруд наряду с высокой пластичностью формировали стабильный урожай, о чем свидетельствуют показатели S²d и V. Сорта селекции Актюбинской СХОС Каргала 1538, Каргала 1539 Каргала 1671 оказались более засухоустойчивыми по показателям индекса. К числу засухоустойчивых генотипов следует отнести и самарскую линию 653д-44. В КАСИБ 14–15 преимущество по продуктивности имели три сорта омской селекции – Гордеиформе 01-121-3, Гордеиформе 02-156-1, Гордеиформе 04-85-4 – со стабильной урожайностью. Последний сорт более пластичен. Сорта Каргала 1411 (Актюбинская СХОС), линия Г1549 (Карабалыкская СХОС), Гордеиформе 627 (Алтайский НИИСХ) были лидерами по засухоустойчивости (0.85–0.87). Близки к этим значениям показатели у высокоурожайных сортов Гордеиформе 01-121-3, Гордеиформе 02-156-1 (0.96–0.98). Кроме того, данные сорта имели меньшую вариацию по этому признаку.

По средней урожайности набора сортов из учреждений-оригинаторов в КАСИБ 1 преимущество имели сорта селекции Сибирского НИИСХ, во 2-м КАСИБ –

Table 4. Grain yields of varieties in KASIB trials averaged over enterprises of origin, metric centners/ha

Origin	KASIB								Mean
	1	2	4–5	6–7	8–9	10–11	12–13	14–15	
Aktobe Agricultural Experimental Station		27.2	24.2	25.9	25.6	25.9	23.7	21.5	24.9
Karabalyk Agricultural Experimental Station	22.9	31.5	23.2	19	28.2	24.1	21.6	24.6	24.4
Kazakh. Research & Production Center of Grain Farming			25.4				22.5	24.9	24.3
Kazakh. Research Institute of Farming and Crop Science	22.2			22.7	27.5	23.8	24	21.6	23.6
Altai Research Institute of Agriculture	24.2		23.4	25.6	25.6	28.5	24.4	25	25.2
Samara Research Institute of Agriculture							25.8	25.8	25.8
Siberian Research Institute of Agriculture	28.5	28.7	24.5	27.6	25.8	28.9	24.4	29.3	27.2
LSD ₀₅	1.2	2.5	2.7	2.8	3.0	2.2	2.6	2.0	2.4

Table 5. Drought susceptibility indices and grain yields of varieties under stressing conditions averaged over nurseries

Origin	KASIB								Averaged over nurseries
	1	2	4–5	6–7	8–9	10–11	12–13	14–15	
Aktobe Agricultural Experimental Station	–	0.83/20.3	1.17/15.4	0.53/19.6	0.94/13.5	0.84/14.3	0.93/13.4	0.90/13.9	0.88/15.8
Karabalyk Agricultural Experimental Station	1.18/8.6	1.35/15.5	1.18/13.6	1.90/11.3	0.87/16.4	1.04/11.2	0.99/11.4	0.88/15.8	1.17/13.0
Kazakh. Research & Production Center of Grain Farming	–	–	1.08/16.1	–	–	–	1.05/11.2	1.01/14.5	1.05/13.9
Kazakh. Research Institute of Farming and Crop Science	0.95/12.2	–	–	0.96/13.6	0.96/14.7	1.03/11.2	1.02/12.2	1.19/10.8	1.03/12.5
Altai Research Institute of Agriculture	0.72/16.9	–	1.08/15.7	0.94/16.2	1.06/12.2	1.11/11.4	0.98/13.1	1.03/14.3	1.03/14.3
Samara Research Institute of Agriculture	–	–	–	–	–	–	0.96/14.1	0.95/15.6	0.96/14.9
Siberian Research Institute of Agriculture	0.99/15.5	1.07/17.6	0.94/16.4	0.85/16.5	1.05/12.5	1.05/12.9	1.01/12.6	0.98/17.5	0.99/15.2

Numerator, sustainability index; denominator, yield, metric centners/ha

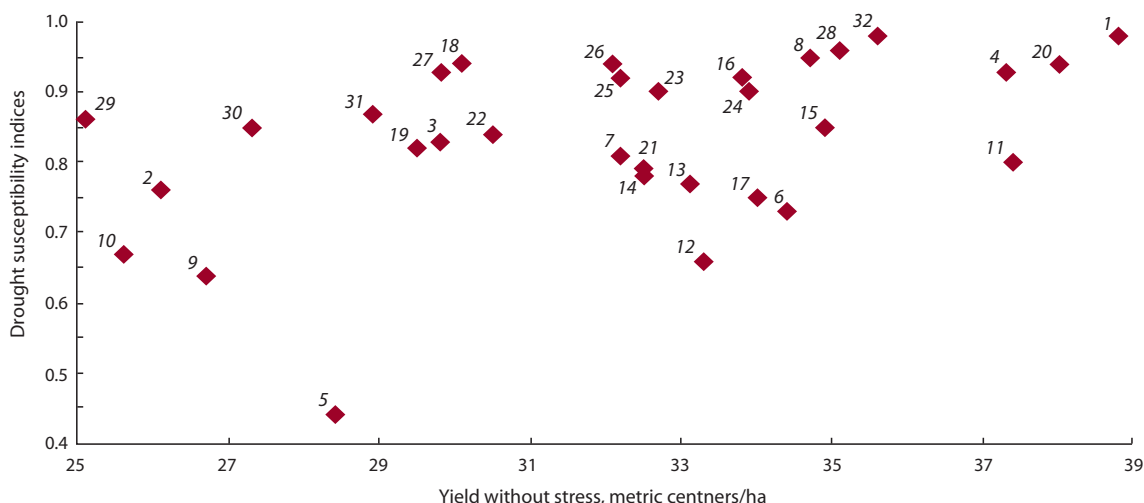
Карабалыкской СХОС, в 4–5-м – КазНПЦЗХ, в 6–7-м – Сибирского НИИСХ, в 8–9-м – Карабалыкской СХОС, в 10–11-м – Сибирского НИИСХ, в 12–13-м – Самарского НИИСХ, в 14–15-м – Сибирского НИИСХ (табл. 4). Средняя урожайность по всем питомникам была выше по сортам Сибирского НИИСХ (27.2 ц/га), Самарского НИИСХ (25.8 ц/га), Алтайского НИИСХ (25.2 ц/га).

Индекс засухоустойчивости (средний по испытываемым сортам) в первом питомнике варьировал от 0.72 до 1.18 и был наименьшим у сортов Алтайского НИИСХ (табл. 5). Во втором питомнике его колебания составляли от 0.83 у сортов Актюбинской СХОС до 1.35 – Карабалыкской СХОС. В 4–5-м КАСИБ изменчивость показателя составляла 0.42–1.18. Минимальное значение имели сорта Курганского НИИСХ, а максимальное – Карабалыкской СХОС. В КАСИБ 6–7 по засухоустойчивости выделились сорта Актюбинской СХОС ($DSI = 0.53$), омские сорта (0.85). У остальных сортов значение индекса составляло от 0.94 до 1.90. В питомнике КАСИБ 8–9 наименьшее значение индекса (0.87) имели сорта Карабалыкской СХОС. В питомниках КАСИБ 10–11 и 12–13 по засухоустойчивости выделились сорта Актюбинской СХОС: индекс засухоустойчивости составлял, соответственно, 0.84 и 0.93. В КАСИБ 14–15 преимущество имели сорта Карабалыкской СХОС ($DSI = 0.88$) и Актюбинской СХОС (0.90). Средний показатель по всем питомникам

свидетельствует о том, что более засухоустойчивы сорта селекции Актюбинской СХОС ($DSI = 0.88$). Близки к ним сорта омской и самарской селекции (0.99 и 0.96).

Приведенные в табл. 5 данные по средней урожайности в условиях стресса подтверждают выше отмеченное. Уровень урожайности сортов Актюбинской СХОС в условиях стресса был выше во 2-м, 6–7-м, 10–11-м КАСИБ. Сорта Сибирского НИИСХ имели преимущество в 4–5-м, 14–15-м, сорта Карабалыкской СХОС в 8–9-м, а самарские сорта в 12–13-м КАСИБ. Средняя урожайность по всем питомникам была выше у сортов: актюбинских (15.8 ц/га), омских (15.2 ц/га), самарских (14.9 ц/га).

Для селекции на адаптивность твердой пшеницы немаловажное значение имеют засухоустойчивые генотипы, которые характеризуются широкой нормой реакции и формируют высокий урожай в более благоприятных условиях. Их использование в гибридизации позволит создать пластичные сорта со стабильной урожайностью. На рисунке представлено 32 сорта с индексом засухоустойчивости ниже 1.0. Среди них 12 генотипов в условиях без стресса сформировали урожайность от 25.6 до 30.5 ц/га, а остальные – от 32.2 до 38.8 ц/га. Наибольшую ценность представляют сорта, расположенные в правой части диаграммы: 1 – Гордеиформе 91-25-5; 4 – Омская янтарная; 6 – 452-МС; 7 – Гордеиформе 91-22-2; 8 – Жемчужина Сибири; 11 – Гордеиформе 94-94-13; 12 – Каргала 303;



Mean yields under nonstressing conditions and drought susceptibility indices of durum wheat varieties.

1, Hordeiforme 91-25-5; 2, 17394; 3, 18053; 4, Омская янтарная; 5, 383-МС; 6, 452-МС; 7, Hordeiforme 91-22-2; 8, Жемчужина Сибири; 9, Коллективная 2; 10, ТС-15; 11, Hordeiforme 94-94-13; 12, Каргала 303; 13, Каргала 447; 14, Каргала 24; 15, Алтын шыгыс; 16, Алтын дала; 17, Наурыз 6; 18, Каргала 1515/06; 19, Каргала 1516/06; 20, Hordeiforme 98-42-1; 21, Каргала 69; 22, Каргала 1538; 23, Каргала 1540; 24, 653d-44; 25, Каргала 1538; 26, Каргала 1539; 27, Каргала 1671; 28, Hordeiforme 02-156-1; 29, Каргала 1411; 30, Line G1549; 31, Hordeiforme 627; 32, Hordeiforme 01-121-3.

13 – Каргала 447; 14 – Каргала 24; 15 – Алтын шыгыс; 16 – Алтын дала; 17 – Наурыз 6; 20 – Гордеиформе 98-42-1; 21 – Каргала 69; 23 – Каргала 1540; 24 – линия 653-д44; 25 – Каргала 1538; 26 – Каргала 1539; 28 – Гордеиформе 02-156-1; 32 – Гордеиформе 01-121-3. Полученные результаты в полной мере согласуются с предположением S. Rajaram (2003), П.Н. Мальчикова, М.Г. Мясниковой (2015) и других исследователей о возможности создания высокоурожайных, отзывчивых на благоприятные условия и адаптированных к засухе сортов.

Таким образом, на основании проведенных исследований для практической селекции на засухоустойчивость в условиях Сибири и Казахстана рекомендуются следующие сорта и линии: 383-МС, 452-МС, Каргала 303, Каргала 447, Каргала 24, Каргала 1515/06, Каргала 1516/06, Каргала 69, Каргала 1538, Каргала 1540, Каргала 1539, Каргала 1671, Каргала 1411 (Актюбинская СХОС), Гордеиформе 91-25-5, Гордеиформе 91-22-2, Жемчужина Сибири, Гордеиформе 94-94-13, Гордеиформе 98-42-1, Гордеиформе 01-121-3, Гордеиформе 02-156-1 (Сибирский НИИСХ), Алтын шыгыс, Алтын дала, Г1549 (Карабалыкская СХОС), Гордеиформе 373, Гордеиформе 627 (Алтайский НИИСХ), 17394, 18053, Наурыз-6 (КазНПЦЗиР), Коллективная 2, ТС-15 (Курганский НИИСХ), 653д-4 (Самарский НИИСХ).

Наибольшую ценность представляют сорта, сочетающие засухоустойчивость с высокой урожайностью в благоприятных условиях: Гордеиформе 91-25-5, Омская янтарная, 452-МС, Гордеиформе 91-22-2, Жемчужина Сибири, Гордеиформе 94-94-13, Каргала 303, Каргала 447, Каргала 24, Алтын шыгыс, Алтын дала, Наурыз 6, Гордеиформе 98-42-1, Каргала 69, Каргала 1540, линия 653-д44, Каргала 1538, Каргала 1539, Гордеиформе 02-156-1, Гордеиформе 01-121-3. Кроме того, сорта Гордеиформе 91-25-5, Гордеиформе 98-42-1, Алтын дала обладают высокой экологической пластичностью.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Clarke J., Romagosa I., Jana S. Relationship of excised – leaf water loss rate and yield of durum wheat in diverse environments. *Canad. J. Plant Sci.* 1989;69(4):1075-1081.
- Dospechov B.A. Metodika polevogo opyta [Methods of Field Experiments]. Moscow: Kolos Publ., 1973.
- Eberhart S.A., Russel W.A. Stability parameters for comparing varieties. *Crop Sci.* 1966;6(1):36-40.
- Ehdaie B., Waines J. Yield potential and stress susceptibility of durum landraces in poststress and stress environments. *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge.* 1988;2:811-815.
- Evdokimov M.G., Yusov V.S., Zhorov A.A., Kolmakov Y.V., Meshkova L.V. Results of complex research of durum spring wheat in West Siberia for the KASIB program. *Agromeridian = Agromeridian.* 2008;4(10):19-28.
- Genkel P.A. Fiziologiya zhara- i zasukhoustoychivosti rasteniy [Physiology of Heat and Drought Tolerance in Plants]. Moscow: Nauka Publ., 1982.
- Golovotchenko A.P. Osobennosti adaptivnoy seleksii yarovoy myagkoy pshenitsy v lesostepnoy zone Srednego Povolzhya [Adaptive Breeding of Spring Bread Wheat in the Forest Steppe of the Middle Volga Region]. Kinel, 2001.
- Grabovets A.I., Fomenko M.A. Improving wheat breeding methodology under insufficient moistening. *Zernobobovye i krupyanye kultury = Legumes and Groat Crops.* 2016;2(18):48-53.
- Gumnuluri S., Hobbs S.L., Jana S. Physiological responses of drought tolerant and drought susceptible durum wheat genotypes. *Photosynthetica.* 1989;23(4):479-485.
- Havaux M., Ernes M., Lannoye R. Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence. *J. Plant Physiol.* 1988;133(5):555-560.
- Jaradat A., Konzak C. Screening of wheat genotypes for drought tolerance. 1. Excised-leaf water retention. *Cereal Res. Commun.* 1983; 11(3-4):179-186.
- Kozhushko N.N., Vasilchuk N.S., Chernyshova S.V., Andreeva A.F. Drought tolerance of durum wheat of different ecogeographical

- origins in the Lower Volga region. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1990;134:101-106.
- Kubaily S., Borodina S.A., Semenova L.V. Salt tolerance and drought-heat resistance of bread and durum wheat accessions. Nauchno-tekhnicheskiy byulleten VNII rastenievodstva = Scientific and Technological Bulletin of the Vavilov Institute of Plant Industry. 1990; 206:66-67.
- Kumakov V.A. Fiziologiya yarovoy pshenitsy [Physiology of Spring Wheat]. Moscow: Kolos Publ., 1980.
- Lepekhov S.B., Korobeinikov N.I. Field and agronomical drought tolerance of breed wheat varieties in the forest-steppe of the Altai Krai. Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University. 2013;1(99):9-12.
- Malchikov P.N., Myasnikova M.G. Approaches to the development of durum wheat cultivars (*Triticum durum* Desf.) with wide variability of the growing season. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(2):176-184.
- Malchikov P.N., Myasnikova M.G., Oganyan T.V. Durum wheat biotypes for the Middle Volga and Ural regions. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, 9–10 avgusta 2016 g., Astana-Shortandy “Zemledelie i selektsiya selskokhozyaystvennykh rasteniy na sovremennom etape” [Proceedings of the Scientific-Practical Conference “Current State of Crop Agriculture and Breeding”, Astana–Shortandy, Aug. 9–10, 2016]. 2016;2:252-255.
- Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu mirovoy kolleksii pshenitsy: metodicheskie rekomendatsii [Guidelines on the study of the world-wide wheat collection]. Leningrad: Vavilov Institute of Plant Industry Publ., 1999.
- Morgounov A.I. Results and potential of the collaboration in the Kazakhstan-Siberian wheat breeding network. Vestnik regionalnoy seti po vnedreniyu sortov pshenitsy i semenovodstvu = Bulletin of the Regional Network for Wheat Variety Introduction and Seed Production. Almaty, 2003;1(4):7-15.
- Rajaram S. Is conventional plant breeding still relevant? Increasing wheat production in Central Asia through science and international cooperation. Proc. First Central Asia Wheat Conf. Almaty, Kazakhstan, 2003;1-4.
- Udovenko G.V. Diagnostika ustoychivosti rasteniy k stressovym vozdeystviyam [Diagnostics of Plant Resistance to Stress]. Leningrad: Vavilov Institute of Plant Industry Publ., 1988.
- Venora G., Calcagno F. Influence of the vascular system in *Triticum durum* Desf. on drought adaptation. Cereal Res. Commun. 1991;19(3): 319-326.
- Yanchenko V.I., Rozova M.A., Melnik V.M. Development of highly adaptive varieties of the Siberian ecotype using the gene pool of drought-resistant durum spring wheat. Vestnik regionalnoy seti po vnedreniyu sortov pshenitsy i semenovodstvu = Bulletin of the Regional Network for Wheat Variety Introduction and Seed Production. Almaty, 2004;1-2(7-8):31-36.
- Zykin V.A., Meshkov V.V., Sapega V.A. Parametry ekologicheskoy plastichnosti selskokhozyaystvennykh rasteniy, ikh raschet i analiz [Parameters of Ecological Flexibility in Agricultural Plants: Calculation and Analysis]. Novosibirsk, 1984.



Характеристика вирулентности популяций *Puccinia triticina* и перспективы использования генов *Lr24*, *Lr25*, *LrSp* в селекции яровой мягкой пшеницы на Южном Урале

В.А. Тюнин¹✉, Е.Р. Шрейдер¹, Е.И. Гуляева², Е.Л. Шайдаюк²

¹ Челябинский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Челябинская область, Чебаркульский район, пос. Тимирязевский, Россия
² Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

Для успешной генетической защиты пшеницы от бурой ржавчины и своевременного выявления патотипов с вирулентностью к используемым генам устойчивости необходим постоянный мониторинг популяций возбудителя. Цель настоящей работы – анализ вирулентности *Puccinia triticina* в Челябинской области и мониторинг эффективности *Lr*-генов в полевых условиях для обоснования и стабилизации генетической защиты пшеницы от бурой ржавчины на Южном Урале. Инфекционный материал собран с районированных и перспективных сортов мягкой пшеницы на селекционном участке Челябинского научно-исследовательского института сельского хозяйства (ЧНИИСХ) в 2014–2016 гг. Протестировано 383 монопустьных изолята, из них 180 в 2014 г., 131 – 2015, 72 – 2016 г. Высокой эффективностью характеризовался ген *Lr24*. Единичный изолят, вирулентный к линии *TcLr19*, отмечен в 2014 г. Изоляты, вирулентные к гену *Lr9*, встречались ежегодно как на сортах-носителях данного гена, так и без него, и все они характеризовались авирулентностью к гену *Lr26*. С помощью 20 *TcLr*-линий выявлено 27 фенотипов. Фенотипы TQTTR и TGTTR, авирулентные к линиям *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26* и *TcLr9*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26* соответственно, были общими в 2014–2016 гг. Согласно индексу Нея (N), не выявлено существенных различий по вирулентности между образцами челябинских популяций в 2014–2016 гг. Полученные результаты по эффективности *Lr*-генов в фазе проростков коррелировали с оценками линий Thatcher, образцов селекционного материала и сортов с известными *Lr*-генами в полевых условиях в селекционных посевах ЧНИИСХ. В селекции пшеницы на Урале перспективны высокоэффективные гены *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr37*. Использование этих генов и пирамидирование генов, частично утративших эффективность, позволяют расширить генетическое разнообразие новых сортов и стабилизировать состав популяций патогена. В полевых условиях Уральского региона выявлены следующие эффективные сочетания генов: *Lr9* + *Lr19*, *Lr9* + *Lr26*, *Lr9* + *Lr37*, *Lr9* + *Lr10* + *Lr26* и *Lr9* + *Lr26* + *Lr37*.

Ключевые слова: бурая ржавчина; *Lr*-гены; мягкая пшеница; сорт; вирулентность; устойчивость.

Characteristics of virulence of *Puccinia triticina* populations and the potential of the *Lr24*, *Lr25*, *LrSp* genes for spring common wheat breeding in the Southern Ural

V.A. Tyunin¹✉, E.R. Shreyder¹, E.I. Gulyaeva², E.L. Shaydayuk²

¹ Chelyabinsk Scientific Research Institute of Agriculture, Chelyabinsk Region, Chebarkulsky district, Timiryazevsky, Russia
² All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

Monitoring of pathogen populations is important for successful genetic wheat protection against leaf rust and identification of pathotypes with virulence to the resistance genes used. The aim of this work was analysis of *Puccinia triticina* populations in the Chelyabinsk region for virulence and studying the effectiveness of *Lr*-genes at the field for improving and stabilization of genetic protection from wheat leaf rust in the Southern Urals. Infection materials were collected in the experimental field of the Chelyabinsk Research Institute of Agriculture from breeding lines, commercial and perspective wheat varieties in 2014–2016. In total, 383 single pustule isolates were studied: 180 in 2014, 131 in 2015, and 72 in 2016. The *Lr24* gene was characterized as highly effective. The single isolate virulent to *TcLr19* line was revealed only in 2014. Isolates virulent to the *Lr9* gene occurred annually both on the varieties carrying this gene and those without it, and all of them were characterized by avirulence to the *Lr26* gene. According to the Nei index (N), no significant differences in virulence were revealed between Chelyabinsk populations in 2014–2016. 27 virulence phenotypes were determined using 20 *TcLr*-lines. The phenotypes TQTTR and TGTTR avirulent to lines *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26* and *TcLr9*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26*, respectively, were common in 2014–2016. The results on the effectiveness of *Lr*-genes at the seedling stage correlated with estimates for Thatcher *Lr*-lines, breeding materials and varieties with known *Lr*-genes grown at the field on the breeding nursery of the Chelyabinsk Research Institute of Agriculture. The highly effective genes *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr37* and some others were found to

have promise for use in wheat breeding in the Ural. The use of these genes and combination of these genes with non-effective ones will allow the genetic diversity of new wheat varieties to be increased and the fungus populations to be stabilized. By now, at the field conditions in the Ural region, the effective combinations of *Lr*-genes revealed are *Lr9+Lr19*, *Lr9+Lr26*, *Lr9+Lr37*, *Lr9+Lr10+Lr26*, and *Lr9+Lr26+Lr37*.

Key words: leaf rust; *Lr*-genes; common wheat; variety; virulence; resistance.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Тюнин В.А., Шрейдер Е.Р., Гуляева Е.И., Шайдаюк Е.Л. Характеристика вирулентности популяций *Puccinia tritica* и перспективы использования генов *Lr24*, *Lr25*, *LrSp* в селекции яровой мягкой пшеницы на Южном Урале. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):523-529. DOI 10.18699/VJ17.269

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Tyunin V.A., Shreyder E.R., Gulyaeva E.I., Shaydayuk E.L. Characteristics of virulence of *Puccinia tritica* populations and the potential of the *Lr24*, *Lr25*, *LrSp* genes for spring common wheat breeding in the Southern Ural. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):523-529. DOI 10.18699/VJ17.269 (in Russian)

Бурья ржавчина (возбудитель *Puccinia tritica* Erikss.) – значимая болезнь пшеницы на Урале. В годы эпифитотий ее вредоносность может достигать 37 % (Тюнин, Шрейдер, 2010). В многолетних исследованиях экологии пшеницы, проведенных в Челябинском НИИ сельского хозяйства (ЧНИИСХ), установлено, что данный биотический стресс сопряжен с годами с высокими показателями гидротермических условий вегетации и проявляет себя совокупно с полеганием посевов, истеканием (энзимо-микозным и углеводно-белковым истощением) семян и другими стрессами. Их взаимодействие интегрально выражается чаще в лесостепи и предгорьях региона как экологически избыточное увлажнение пшеницы. Из-за этого ресурс влаги недостаточно используется неустойчивыми к этим стрессам сортами и снижается урожайность пшеницы.

Возделывание устойчивых сортов – экологически безопасный метод борьбы со ржавчиной. Первые устойчивые к бурой ржавчине сорта яровой пшеницы Квинта и Дуэт созданы в ЧНИИСХ в 1999–2000 гг. Детерминация признака их устойчивости была обусловлена высокоэффективным в тот период геном *Lr9*. Полученные на их основе гибриды широко использовали в последующих скрещиваниях, что обусловило широкое распространение гена *Lr9* во многих современных сортах уральской селекции (Челяба 2, Памяти Рюба, Челябин юбилейная, Челябин ранняя, Челябин степная, Чебаркульская 3). Высокая концентрация сортов с геном *Lr9*, возделываемых в Уральском и Западно-Сибирском регионах Российской Федерации, привела к появлению в 2007 г. новых вирулентных рас (Мешкова и др., 2008), и к середине 2010-х гг. стала очевидна окончательная потеря эффективности данного гена.

В настоящее время в Государственном реестре селекционных достижений (2016) для выращивания в Уральском регионе рекомендуется 49 сортов яровой пшеницы. Общая доля сортов с геном *Lr9* среди них составляет 16 %, в том числе 10 % селекции ЧНИИСХ (Гуляева, 2012, 2016). Для расширения генетического разнообразия по устойчивости к бурой ржавчине в ЧНИИСХ в селекцию пшеницы привлечены новые доноры эффективной устойчивости, например линии «типа кукушки», полученные с участием *Aegilops speltoides* и несущие ген *LrSp*, а также изогенные линии сортов Thatcher и Новосибирская 67 и другой ис-

ходный материал с генами *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr37*, *Lr45*, *Lr47*, *Lr49*, *LrAsp5*.

Внедрение в производство новых сортов мягкой пшеницы, защищенных ранее не использованными *Lr*-генами, и увеличение посевных площадей, занятых генетически однородными сортами, могут привести к мутациям патогена по вирулентности и ускоренному изменению популяционного состава, как это произошло с сортами, защищенными геном *Lr9*. В связи с этим для успешной генетической защиты пшеницы от бурой ржавчины в Уральском регионе и своевременного выявления патотипов с вирулентностью к используемым генам устойчивости необходим постоянный мониторинг популяций *P. tritica*.

Цель настоящей работы – анализ вирулентности *P. tritica* в Челябинской области в 2014–2016 гг. и мониторинг эффективности *Lr*-генов в полевых условиях для обоснования и стабилизации генетической защиты пшеницы от бурой ржавчины на Южном Урале.

Материалы и методы

Листья пшеницы с урединопустулами собраны в 2014–2016 гг. на селекционном поле ЧНИИСХ с районированных и перспективных сортов, в разной степени пораженных бурой ржавчиной (табл. 1). В 2014 г. сборы были произведены дважды: в начале появления болезни (первая декада августа) и его массовом развитии (середина августа), в 2015–2016 гг. – только в период массового развития бурой ржавчины (середина августа).

Популяции с сухих листьев были реанимированы на восприимчивом сорте Инна и клонированы (см. табл. 1). Все изоляты тестировали на 20 почти изогенных линиях Thatcher (*TcLr*-линии). Для обозначения фенотипов использована буквенная номенклатура (Long, Kolmer, 1989), основанная на определении вирулентности к пяти группам из 20 *Lr*-линий: 1 – *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3a*; 2 – *Lr9*, *Lr16*, *Lr24*, *Lr26*; 3 – *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr17*, *Lr30*; 4 – *Lr2b*, *Lr3bg*, *Lr14a*, *Lr14b*; 5 – *Lr15*, *Lr18*, *Lr19*, *Lr20*.

Размножение монопустульных изолятов и анализ вирулентности проводили с использованием методики лабораторного культивирования *P. tritica*, основанной на применении бензимидазола (Михайлова и др., 2000).

Тип реакции на заражение учитывали на восьмой день после инокуляции по шкале E.B. Mains и H.S. Jackson

Table 1. Characterization of wheat sources of the leaf rust inoculation material

Variety, line (year of release)	Year of harvest	Damage by leaf rust: type, score/percentage	Number of single-pustule isolates studied	Lr genes
Chelyaba 2 (2005)*	2014(1)**	4/20	10	<i>Lr9, Lr10</i>
	2014(2)	4/70	10	
	2015	4/100	10	
	2016	4/20	7	
Duet (2003)	2014(1)	4/5	10	<i>Lr9, Lr10</i>
	2014(2)	4/30	10	
	2015	4/50	10	
	2016	4/10	5	
Omskaya 36 (2007)	2014(1)	4/20	10	
	2014(2)	4/90	10	
	2015	4/70	10	
Pamyati Ryuba (2006)	2014(1)	4/50	10	<i>Lr9, Lr10</i>
	2015	4/90	10	
Chelyaba Early (2016)	2014(2)	4/80	10	<i>Lr9, Lr10</i>
	2015	4/90	10	
Chelyaba Yubileynaya (2010)	2015	4/90	10	<i>Lr9, Lr10</i>
	2016	3/20	5	
Erythrospermum 59 (1994)	2014(1)	4/10	10	<i>Lr10</i>
	2014(2)	4/50	10	
	2015	4/30	21	
	2016	4/10	5	
Novosibirskaya 15 (2003)	2014(1)	4/30	10	<i>Lr10</i>
	2014(2)	4/80	10	
	2016	4/80	6	
Ural'skaya kukushka (2016)	2014(2)	2/5	10	
	2015	4/20	10	
Omskaya 35 (2004)	2015	4/70	10	
Chelyaba Steppe (2011)	2014(2)	4/10	10	<i>Lr9, Lr10</i>
Chebarkul'skaya 2	2014(2)	4/90	10	
	2015	4/70	10	
Chebarkul'skaya 3	2016	4/1	14	<i>Lr9</i>
Iskra (1949)	2014(1)	4/90	10	
Izumrudnaya (1996)	2014(2)	3/10	10	<i>Lr26</i>
	2016	2/1	12	
Niva 2 (1997)	2014(2)	4/50	10	
Rossiyanka (1981)	2016	4/30	10	
Rodnik	2015	4/20	10	
	2016	4/10	8	

* Year of addition to the State Register of Protected Selection Achievements.

** Sampling of inoculation material: 1, first third of August; 2, second third of August.

(1926), где 0 – отсутствие симптомов; 0; – некрозы без пустул; 1 – очень мелкие пустулы, окруженные некрозом; 2 – пустулы среднего размера, окруженные некрозом или хлорозом; 3 – пустулы среднего размера без некроза; 4 – крупные пустулы без некроза; X – пустулы на одном и том же листе разных типов, присутствуют хлорозы и некрозы.

Для сопоставления типа реакции отрезков листьев и проростков пшеницы по два-три изолята из каждой популяции тестировали на интактных растениях. Для этого по два-три зерна каждой *TcLr*-линии сеяли в почву. 12–14-дневные проростки инокулировали суспензией возбудителя и помещали в камеру искусственного климата (Sanyo, Versatile Environmental Test Chamber) с необхо-

димыми для возбудителя бурой ржавчины условиями инкубации (температура 22 °C, влажность 75 %). Учет проводили на 10–12-й день после заражения по вышеописанной шкале Е.В. Mains и H.S. Jackson (1926).

Статистическая обработка результатов анализа вирулентности выполнена с использованием пакета программ Virulence Analysis Tool (VAT) (Kosman et al., 2008). Для оценки различий между челябинскими популяциями в 2014–2016 гг. применяли индекс генетических расстояний Нея (N).

Для изучения эффективности *Lr*-генов в полевых условиях и мониторинга появления изолятов с новой вирулентностью изучили устойчивость изогенных линий

Thatcher, селекционного материала и сортов с известными *Lr*-генами и их комбинациями в фазе взрослых растений. Оценку проводили на селекционном поле яровой мягкой пшеницы ЧНИИСХ (лесостепь предгорий Южного Урала) на естественном инфекционном фоне бурой ржавчины. Развитие болезни во все годы исследований (2014–2016 гг.) было высоким и на восприимчивых сортах составляло 80–100 %. Степень поражения бурой ржавчиной оценивали в период максимального развития болезни по шкале R.F. Peterson с коллегами (1948), а тип реакции – по шкале E.B. Mains и H.S. Jackson (1926).

Результаты и обсуждение

Изучена вирулентность 383 монопустульных изолятов (180 – 2014 г., 131 – 2015, 72 – 2016 г.) (см. табл. 1). На стадии проростков высокоэффективным являлся ген *Lr24*. Единичный изолят, вирулентный к линии *TcLr19*, отмечен на сорте Эритроспермум 59 в 2014 г. в начале проявления бурой ржавчины (табл. 2). В последующие годы вирулентность к данному гену не выявлена. На линиях с генами *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr9*, *Lr11*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr18*, *Lr20* и *Lr26* отмечено существенное варьирование в частотах вирулентных клонов (от 0 до 100 %). Гены *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr17* и *Lr30* показали абсолютную неэффективность.

Изоляты, вирулентные к *TcLr9*, встречались как на сортах-носителях данного гена, так и без него, и все они были авирулентны к *TcLr26* (см. табл. 2). Сходный состав аллелей вирулентности (17) определен у изолятов, полученных с генетически однородных сортов Памяти Рюба, Челябинская 2 в 2014–2016 гг. и с сортов Дуэт и Челябин 2 в 2014–2015 гг. В 2016 г. на сортах Дуэт и Челябин 2 выявлено незначительное снижение вирулентности патогена (15 и 16 аллелей соответственно). Все изоляты *P. triticina*, выделенные с сортов с геном *Lr9*, характеризовались высоким числом аллелей вирулентности (17–15), за исключением изолятов с сорта Чебаркульская 3 (10 аллелей). Этот сорт в полевых условиях имел значимо меньшее поражение бурой ржавчиной относительно других сортов с геном *Lr9*. Вероятно, наряду с *Lr9* он имеет дополнительные гены, сочетание которых предопределяет отбор данным генотипом менее вирулентных изолятов.

Изоляты *P. triticina*, вирулентные к линии *TcLr26*, отмечены как на сортах с этим геном (Изумрудная), так и без него (Искра, Россиянка, Родник). Высокое разнообразие патогена по аллелям вирулентности наблюдали на умеренно восприимчивых сортах Родник и Эритроспермум 59 и высоковосприимчивых Омская 36 и Новосибирская 15 (см. табл. 2).

Результаты оценок отрезков листьев и интактных растений были идентичны для большинства изученных *Lr*-линий. На линиях *TcLr11* и *TcLr16* при инокуляции отдельными изолятами тип реакции на отрезках листьев был выше (3–4 балла), чем на интактных растениях (3–балла). Согласно общепринятой классификации на группы по устойчивости, тип реакции «3+» относится к умеренно восприимчивому.

Сводные результаты анализа вирулентности челябинских популяций *P. triticina* в 2014–2016 гг. представлены

в табл. 3. Отмечена стабильность в частотах встречаемости клонов, вирулентных к линиям с генами *Lr1*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr3ka*, *Lr3bg*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr18*, *Lr30*, и варьирование к линиям *TcLr9*, *TcLr2a*, *TcLr11*, *TcLr15* и *TcLr26*. Согласно индексу Нея, не выявлено существенных различий между образцами челябинских популяций в 2014–2016 гг. ($N = 0.01–0.04$).

С использованием 20 *TcLr*-линий определено 27 фенотипов, среди них: 21 – в 2014 г., 6 – в 2015 г. и 8 – в 2016 г. Фенотипическое разнообразие образцов челябинских популяций в 2014 г. было значимо выше в начальный период развития бурой ржавчины (16 фенотипов), чем в период массового развития болезни (10 фенотипов). Это, вероятно, обусловлено стабилизирующим отбором конкурентоспособных рас патогена. Общими фенотипами в 2014–2016 гг. являлись TQTTR (авирулентность: *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26*) и TGTTR (авирулентность: *TcLr9*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26*); в 2014 и 2015 гг. – TQTTR, TGTTR, THTSR (авирулентность: *TcLr9*, *TcLr14b*, *TcLr19*, *TcLr24*); в 2014 и 2016 гг. – TQTTR, TGTTR, THTTR (авирулентность: *TcLr9*, *TcLr19*, *TcLr24*), TCTTR (авирулентность: *TcLr9*, *TcLr16*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26*), TQPTR (авирулентность: *TcLr11*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26*); в 2015 и 2016 гг. – TQTTR и TGTTR. Наиболее представленными в 2014–2015 гг. были фенотипы TQTTR (34.4 и 80.1 % соответственно), в 2016 г. – THTTR (30.6 %).

Не выявлено существенных изменений в доминирующем фенотипическом составе челябинской популяции *P. triticina* в 2014–2016 гг. Однако практически ежегодно в ней встречались оригинальные фенотипы, которые не закреплялись в популяции. Многие из них характеризовались авирулентностью к линиям с генами *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr11*, *Lr15*, *Lr16* и *Lr18*. Все эти гены относятся к группе неэффективных в защите от бурой ржавчины в России (Гуляева и др., 2015).

Полученные результаты по эффективности *Lr*-генов в фазе проростков коррелировали с оценками линий Thatcher, образцов селекционного материала и сортов с известными *Lr*-генами в полевых условиях в селекционных посевах ЧНИИСХ. Линии *TcLr1*, *TcLr2a*, *TcLr2b*, *TcLr2c*, *TcLr3a*, *TcLr3bg*, *TcLr3ka*, *TcLr9*, *TcLr10*, *TcLr11*, *TcLr13*, *TcLr14a*, *TcLr14b*, *TcLr15*, *TcLr16*, *TcLr20*, *TcLr30*, *TcLr32*, *TcLr33*, *TcLr34*, *TcLr38* имели высокую степень поражения (80–100 %); *TcLr22a* и *TcLr26* – умеренную (30–40 %); *TcLr17*, *TcLr27+31*, *TcLr29* и *TcLr37* – слабую (5–10 %). На линиях *TcLr12*, *TcLr18*, *TcLr19*, *TcLr28* пораженность не превышала 5 %, а на линиях *TcLr24* и *TcLr25* симптомов болезни не обнаружено (0 %).

По результатам полевых и лабораторных оценок, выявлена высокая эффективность гена *Lr24* в условиях Урала. Он широко распространен в американских и австралийских сортах мягкой пшеницы, но не выявлен у российских сортов (Гуляева, 2016). В настоящее время в ЧНИИСХ создан селекционный материал с этим геном (линии Ферругинеум 25754, Лютесценс 26190, Лютесценс 26263), который так же, как и изогенная линия *TcLr24*, показал иммунный тип реакции при изучении в полевых условиях в 2014–2016 гг.

Несмотря на выявление единичных изолятов, вирулентных к гену *Lr19* в фазе проростков в 2014 г., сорта и

Table 2. Frequency of *P. triticina* isolates virulent to Thatcher lines with *Lr* genes in spring common wheat varieties in the Chelyabinsk region in 2014–2016

Wheat variety	Year	Frequency of clones virulent to TcLr lines, %											
		Lr1	Lr2a	Lr2b	Lr9	Lr11	Lr14b	Lr15	Lr16	Lr18	Lr19	Lr20	Lr26
Duet	2014 (1)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0
	2014 (2)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0
	2015	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0
	2016	100	0	0	100	100	100	0	100	100	0	100	0
Chelyaba 2	2014 (1)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	20	0
	2014 (2)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0
	2015	100	100	100	100	100	100	100	60	100	0	100	0
	2016	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0	100	0
Erythrospermum 59	2014 (1)	80	70	70	60	90	60	80	100	60	10	40	0
	2014 (2)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0
	2015	95	48	48	48	100	100	100	100	100	0	100	0
	2016	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100	0
Omskaya 36	2014 (1)	90	90	100	20	100	100	90	100	70	0	0	0
	2014 (2)	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	30	0
	2015	100	100	100	60	100	60	100	100	100	0	100	40
Novosibirskaya 15	2014 (1)	0	0	100	0	100	100	100	100	100	0	30	0
	2014 (2)	100	100	100	100	100	100	100	100	40	0	100	0
	2016	100	0	100	0	100	100	0	100	100	0	100	0
Rodnik	2015	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0
	2016	100	100	100	0	100	100	100	0	100	0	100	100
Izumrudnaya	2014 (2)	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100	100
	2016	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100	100
Niva 2	2014 (2)	80	100	100	0	100	100	100	100	0	0	80	0
Iskra	2014 (1)	100	100	100	0	80	80	100	60	80	0	100	100
Rossiyanka	2016	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100	100
Chebarkul'skaya 3	2016	0	0	0	100	0	100	0	100	100	0	0	0
Ural'skaya kukushka, Omskaya 35, Chebarkul'skaya 2, Pamyati Ryuba, Chelyaba Steppe, Chelyaba Yubileynaya, Chelyaba Early		100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0

Sampling of inoculation material: 1, first third of August; 2, second third of August.

линии с этим геном в полевых условиях в 2014–2016 гг. в ЧНИИСХ в основном характеризовались определенной степенью устойчивости. Вирулентность к гену *Lr19* чаще отмечается в Поволжье, где массово возделываются сорта с этим геном, но может встречаться и в других регионах (Коваленко и др., 2012). В настоящее время для продления «полезного срока жизни» гена *Lr19* используют его сочетания, например с генами *Lr26* и *Lr37* (Сибикеев и др., 2011). Сорта яровой пшеницы Омская 37 и Омская 38, защищенные генами *Lr19* и *Lr26*, а также селекционный материал с этими генами в Челябинской области имеют высокую степень устойчивости к бурой ржавчине.

Увеличение частот изолятов, вирулентных к гену *Lr9*, несомненно, предопределяет фитопатологическую ситуацию с бурой ржавчиной в условиях Челябинской области, где последние два года (2015–2016) были эпифитотийны-

ми. В первую очередь, это связано с поражением ранее устойчивых сортов пшеницы Дуэт, Челябинская юбилейная, Челябинская степная и других широко выращиваемых в регионе, которые послужили мощными накопителями инфекции за счет направленного отбора по вирулентности. В связи с этим определенное количество селекционного материала и сортов конкурсного сортоиспытания с геном *Lr9* приходится досрочно исключать из селекционного процесса при ежегодном формировании питомников. Для стабилизации фитосанитарной ситуации в Челябинском НИИСХ приняты попытки подбора эффективных сочетаний гена *Lr9* с другими известными ювенильными генами. В полевых условиях Челябинской области в 2016 г. отмечен высокий уровень устойчивости у селекционных образцов, несущих следующие сочетания *Lr*-генов: *Lr9+Lr19* (Лютесценс 26078, Лютесценс 26080, Эритроспермум 26208),

Table 3. Frequency of *P. tritica* clones virulent to Thatcher lines with *Lr* genes in spring common wheat varieties in the Chelyabinsk region in 2014–2016

Thatcher line with an <i>Lr</i> gene	2014	2015	2016
1	91.7 ± 2.1	99.3 ± 0.7	80.6 ± 4.7
2a	92.2 ± 2	92.2 ± 2.3	65.3 ± 5.6
2b	98.3 ± 1	92.2 ± 2.3	80.6 ± 4.7
2c	100	100	80.6 ± 4.7
9	60 ± 3.7	83.0 ± 3.2	43.1 ± 5.8
11	98.3 ± 1	100	70.8 ± 5.4
14b	91.1 ± 2.1	97.2 ± 1.4	100
15	92.8 ± 1.9	100	65.3 ± 5.6
16	97.8 ± 1.1	97.2 ± 1.4	88.9 ± 3.7
18	76.7 ± 3.2	100	100
19	0.6 ± 0.6	0	0
20	66.7 ± 3.5	100	73.6 ± 5.2
24	0	0	0
26	11.1 ± 2.3	2.8 ± 1.4	41.7 ± 5.8
3a, 3bg, 3ka, 14a, 17, 30	100	100	100

Lr9+Lr26 (Ферругинеум 25828, Эритроспермум 25826, Лютесценс 25928, Лютесценс 26122), *Lr9+Lr37* (Лютесценс 26128), *Lr24+Lr26* (Эритроспермум 25606), *Lr9+Lr10+Lr26* (новый сорт Силач, переданный на государственное сортоиспытание в 2016 г.), *Lr19+Lr26+Lr34* (Эритроспермум 25618). Наличие комбинаций данных генов у созданного селекционного материала подтверждено с помощью высокоинформативных молекулярных маркеров.

Использование молекулярных маркеров для пирамидирования генов — одно из важных преимуществ по сравнению с методами традиционной селекции. Они позволяют выявить генотипы, содержащие комбинации генов, на более ранних стадиях селекционного процесса (Леорова, 2013). В настоящее время информативные ПЦР-маркеры подобраны для более 20 *Lr*-генов. Эти маркеры широко используются в селекционных учреждениях в России и за рубежом (Гайнулин и др., 2007; Serfling et al., 2011; Давоян и др., 2014).

Наряду с донорами известных *Lr*-генов в ЧНИИСХ широко используются доноры, несущие ювенильные гены, не идентичные известным эффективным (*LrSp*, *LrAsp5*) и высокоэффективные в защите от ржавчины. Новый сорт яровой мягкой пшеницы Челябин 75, включенный в 2012 г. в Государственный реестр селекционных достижений, а также многочисленный селекционный материал, содержащий в своем генотипе тот же неизвестный высокоэффективный ген (*LrSp*) от *Ae. speloides*, сохраняет иммунитет к бурой ржавчине в условиях Южного Урала в течение длительного периода. Такую же реакцию имели образцы Велютинум 25758, Велютинум 25759 с геном *LrAsp5* и другие, полученные по программе КАСИБ (СИММТ) и отобранные из материала ИЦИГ СО РАН.

Проведенные исследования показали значимость ежегодного мониторинга вирулентности гриба для осуществления успешной иммуногенетической защиты. Получен-

ные сведения о вирулентности популяций, их изменениях под влиянием выращиваемых сортов, а также эффективности *Lr*-генов и их сочетаний позволяют скорректировать направления генетической защиты в Челябинской области, целенаправленно привлекать в селекцию новые доноры и обеспечить продление срока полезной жизни для генов, утративших эффективность, но широко распространенных в отечественных сортах пшеницы. Использование молекулярных маркеров позволит более успешно реализовать стратегию эффективного пирамидирования *Lr*-генов.

Acknowledgments

The authors are indebted to Dr. Odintsova, who kindly provided kukushka-type lines, donors of the *LrSp* gene. Also, the breeding for leaf rust resistance at the Chelyabinsk Research Institute of Agriculture was successful owing to resistance sources provided by Drs. Koval' and Salina, Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, and by CIMMYT.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Davoyan E.R., Bespalova L.A., Davoyan R.O., Zubanova Y.S., Mikhov D.S., Filobok V.A., Khudokormova J.N. Use of molecular markers in wheat breeding for resistance to leaf rust at the Lukyanenko Research Institute of Agriculture. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(4/1): 732-738. (in Russian)
- Gaynullin N.R., Lapochkina I.F., Zhemchuzhina A.I., Kiseleva M.I., Kolomiets T.M., Kovalenko E.D. Phytopathological and molecular genetic identification of leaf rust resistance genes in common wheat accessions with alien genetic material. *Genetika* = Genetics (Moscow). 2007;43(8):1058-1064. (in Russian)
- Gosudarstvennyy reestr selektsionnykh dostizheniy, dopushchennykh k ispolzovaniyu. Sorta rasteniy [State Register of Breeding Achievements Approved for Use. Varieties of Plants]. Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2016. (in Russian)

- Gul'tyaeva E.I. Genetic diversity of Russian common wheat varieties for leaf rust resistance. Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2012;2:29-32. (in Russian)
- Gul'tyaeva E.I. Identification of leaf rust resistance genes in Russian common wheat varieties. Sbornik tezisev Vserossiyskoi konferencii "50 let VOGiS: uspekhi i perspektivy" [Abstracts from the All-Russian conference "50th Anniversary of VOGiS: Advances and Prospects", November 8–10, 2016]. Moscow, 2016. (in Russian)
- Gul'tyaeva E.I., Shaidayuk E.L., Kazartsev I.A., Aristova M.K. Structure of Russian populations of *Puccinia triticina* Eriks. Vestnik zashchity rasteniy = Plant Protection News. 2015;85(3):5-10. (in Russian)
- Kosman E., Dinoor A., Herrmann A., Schachtel G.A. Virulence Analysis Tool (VAT), 2008.
- Kovalenko E.D., Zhemchuzhina A.I., Kiseleva M.I., Kolomiets T.M., Lapochkina I.F., Khudokormova Zh.N., Bokkel'man H. Current state of leaf rust populations and creation of a gene bank of wheat donors and sources resistant to the disease. Materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchyonnoi 125-letiyu so dnya rozhdeniya N.I. Vavilova "Immunogeneticheskaya zashchita selskokhozyaystvennykh kultur ot boleznei: teoriya i praktika" [Proceeding of the International scientific conference dedicated to the 125th anniversary of N.I. Vavilov's birth "Immunogenetic control of crop diseases: theory and practice", July 17–21, 2012]. Bol'shie Vyazemy, Moscow oblast, 2012;69-80. (in Russian)
- Leonova I.N. Molecular markers: Implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(2):314-325. (in Russian)
- Long D.L., Kolmer J.A. North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Phytopathology. 1989;79:525-529.
- Mains E.B., Jackson H.S. Physiologic specialization in the leaf rust of wheat: *Puccinia triticina* Erikss. Phytopathology. 1926;16:89-120.
- Meshkova L.V., Rosseeva L.P., Shreyder E.R., Sydorov A.V. Virulence of pathotypes of the wheat leaf rust agent to *ThLr9* in Siberia and the Urals. Vtoraya Vserossiyskaya konferentsiya "Sovremennye problemy immuniteta rasteniy k vrednym organizmam" [Proceedings of the 2nd All-Russian conference "Current issues in plant resistance to pests", St. Petersburg, September 29–October 2, 2008]. St. Petersburg, 2008;70-73. (in Russian)
- Mikhaylova L.A., Gul'tyaeva E.I., Mironenko N.V. Methods of study of the population structure of the wheat leaf rust agent *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*. Immuno-geneticheskie metody sozdaniya ustoychivyykh k vrednym organizmam sortov [Immuno-genetic methods of the development of pest-resistant varieties]. St. Petersburg, 2000. (in Russian)
- Peterson R.F., Cambell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. Can. J. Res. 1948;26:496-500.
- Serfling A., Krämer I., Lind V., Schliephake E., Ordon F. Diagnostic value of molecular markers for *Lr* genes and characterization of leaf rust resistance of German winter wheat cultivars with regard to the stability of vertical resistance. Eur. J. Plant Pathol. 2011;130(4):559-575.
- Sibikeev S.N., Markelova T.S., Druzhin A.E., Vedeneva M.L., Sing D. Evaluation of a set of introgressive spring bread wheat lines developed for resistance to stem rust race Ug99+Sr24 (TTKST). Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2001;2:3-5. (in Russian)
- Tyunin V.A., Shreyder E.R. Osobennosti tekhnologii selekcii myagkoy yarovoy pshenitsy na ustoychivost k uglevodno-belkovomu istoshcheniyu semyan i drugim stressam v usloviyakh Yuzhnogo Urala [Features of the technology of common spring wheat breeding for resistance to carbohydrate-protein depletion of seeds and other stresses in the Southern Ural environment]. Chelyabinsk, 2010. (in Russian)

Изучение межфазного периода «всходы–колошение» у исходных родительских форм и гибридов тритикале с разными генами *Vrn*

П.И. Стёпочкин , М.В. Емцева

Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирская область, пос. Краснообск, Россия

Разнообразие тритикале по генам *Vrn*, влияющим на длительность межфазного периода «всходы–колошение» и общую продолжительность вегетационного периода растений, меньше, чем у пшеницы. Для его расширения и дальнейшего применения в селекционных программах получены гибриды с использованием четырех линий октаплоидных тритикале с разными генами *Vrn* и двух селекционных линий озимого сорта Сирс 57. Цель данной работы – сравнительное изучение продолжительности межфазного периода «всходы–колошение» у исходных родительских форм и гибридов тритикале F_3 с разным сочетанием пар доминантных генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* и *Vrn-D4*. Показано, что по силе фенотипического проявления комбинаций этих генов (чем короче межфазный период «всходы–колошение», тем сильнее действие генов) октаплоидные гибриды составляют следующий ряд: $(VrnA1 \times VrnD1) \geq (VrnB1 \times VrnD1) \geq (VrnA1 \times VrnD4) = (VrnA1 \times VrnB1) > (VrnD1 \times VrnD4)$, а гибриды октаплоидных тритикале с гексаплоидными – $(VrnD1 \times \text{Сирс 57}) > (VrnB1 \times \text{Сирс 57}) \geq (VrnD4 \times \text{Сирс 57/2/4}) > (VrnB1 \times \text{Цекад 90/5})$. По степени проявления доминантных генов гибриды от разноплоидных скрещиваний не отличались от исходных материнских октаплоидных форм. Сочетание двух доминантных генов у гибридов (кроме комбинации *VrnD1* $\times$ *VrnD4*) в гомозиготном или гетерозиготном состоянии в генотипе растений укоротило межфазный период «всходы–колошение» по сравнению с родительскими формами, а в результате совместного действия генов *VrnA1* и *VrnD1* возникли растения с самым коротким межфазным периодом «всходы–колошение» по сравнению со всеми изученными формами тритикале.

Ключевые слова: октаплоидные и гексаплоидные тритикале; гибридизация; межфазный период «всходы–колошение»; доминантные гены *Vrn*.

Study of the interphase period “shoots–earring” of the initial parental forms and hybrids of triticale with different *Vrn* genes

P.I. Stepochkin , M.V. Emtseva

Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

The diversity of triticale *Vrn* genes influencing the duration of the interphase period “shoots–earring” and the total length of the growing period of plants is lesser than that of wheat. For its diversification and breeding purposes, hybrids were made by using the original parental forms – an original collection of isogenic lines of octaploid triticale with different *Vrn* genes, as well as by using breeding lines of hexaploid triticale and a winter variety, Sirs 57. The aim of this work was to conduct a comparative study of the duration of the interphase period “shoots–earring” in the initial parental forms and triticale F_3 hybrids having different combinations of pairs of the dominant genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* and *Vrn-D4*. It is shown that, according to the strength of the phenotype expression of the gene pairs (the shorter the interphase period “shoots–earring”, the stronger the activity of the genes), octaploid hybrids ranged as following: $(VrnA1 \times VrnD1) \geq (VrnB1 \times VrnD1) \geq (VrnA1 \times VrnD4) = (VrnA1 \times VrnB1) > (VrnD1 \times VrnD4)$, and the hybrids between octaploid and hexaploid triticales have the following order: $(VrnD1 \times \text{Sirs 57}) > (VrnB1 \times \text{Sirs 57}) \geq (VrnD4 \times \text{Sirs 57/2/4}) > (VrnB1 \times \text{Tsekad 90/5})$. At the level of expression of the dominant genes, the hybrids obtained from the crosses of different levels of ploidy did not differ from the original maternal octaploid forms. The combination of two dominant genes in the hybrids, except for the combination *VrnD1* $\times$ *VrnD4*, in homozygous or heterozygous state in the genotype of plants shortened the interphase period “shoots–earring” in comparison with the parental forms and the joint action of the *VrnA1* and *VrnD1* genes resulted in the emergence of plants with the shortest interphase period in comparison with all triticale forms studied.

Key words: octaploid and hexaploid triticale; hybridization; interphase period of “shoots–earring”; dominant genes *Vrn*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Стёпочкин П.И., Емцева М.В. Изучение межфазного периода «всходы–колошение» у исходных родительских форм и гибридов тритикале с разными генами *Vrn*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):530-533. DOI 10.18699/VJ17.22-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Stepochkin P.I., Emtseva M.V. Study of the interphase period “shoots–earring” of the initial parental forms and hybrids of triticale with different *Vrn* genes. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):530-533. DOI 10.18699/VJ17.22-o (in Russian)

Яровые сорта тритикале в Сибири занимают пока гораздо меньшие площади возделывания, чем озимые. Одна из причин – относительная позднеспелость. Вследствие гибридного происхождения и частичной несбалансированности многие биологические процессы у тритикале протекают медленнее, чем у пшеницы, потому что фазы колошения, цветения и налива зерна растянуты (Махалин, 1992). У пшенично-ржаных амфиплоидов период от колошения до цветения длится пять-восемь дней, в то время как у пшеницы – около двух-трех дней (Шульдин, 1981). Фаза тестообразной спелости у тритикале более продолжительна и у отдельных образцов может достигать трех недель (Фёдорова, 1983), а созревание наступает на 3–20 дней позже по сравнению с пшеницей (Махалин, 1992; Стёпочкин, 2008).

За тип развития (яровой, озимый, факультативный), а также продолжительность вегетационного периода пшеницы и ржи отвечают гены *Vrn* (response to vernalization – реакция на яровизацию). Пшеница имеет гены *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*, расположенные в длинных плечах хромосом 5A, 5B и 5D соответственно (Worland, 1996; Fu et al., 2005), а также ген *Vrn-D4* в околоцентромерном районе хромосомы 5D (Yoshida et al., 2010) и ген *Vrn-B3* в коротком плече хромосомы 7B (Yan et al., 2006). Рожь обладает геном *Vrn-R1* в длинном плече хромосомы 5R (Plaschke et al., 1993). Доминантное состояние гена *Vrn* обуславливает яровой тип развития, а рецессивное – озимый (Pugsley, 1971). Изучение изогенных и замещенных линий пшеницы с доминантными генами *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* показало, что эффект каждого из этих генов заключается в определении разной продолжительности этапа II органогенеза, который соответствует фазе кушения (Воронин, Стельмах, 1985), а также в продолжительности фаз кушения и выхода в трубку (Košner, Pánková, 2004). Сильнее всех на сокращение фазы кушения влияет доминантный ген *Vrn-A1*, слабее – доминантный ген *Vrn-B1* (Воронин, Стельмах, 1985; Košner, Pánková, 2004).

Многие исследователи при весеннем севе озимых растений обнаруживали в популяциях культур пшеницы, ржи, а также тритикале появление спонтанных яровых мутантов (Рутц, Леонтьев, 1969; Wexelsen, 1969; Стёпочкин, 2008). Причина их возникновения до сих пор не известна. В качестве возможных механизмов могут быть генетические мутации, в том числе в регуляторных участках генов *Vrn*, или же эпигенетические изменения. Последние, как было показано S.N. Oliver с коллегами (2009), могут изменять конформацию хроматина в области промоторов *Vrn* генов, тем самым модулируя уровень их транскрипции. На появление спонтанных яровых мутантов тритикале влияют условия вегетации в годы репродукции семян амфидиплоида и проведения опыта, а также длительность срока хранения семян – при его увеличении частота возникновения яровых мутантов повышается (Стёпочкин, 2008). Все мутантные формы тритикале при посеве осенью в разной степени перезимовывают, что указывает на то, что они развиваются по типу двуручек – растений, способных развиваться как по яровому, так и по озимому типу, что определяется, по мнению некоторых исследователей, генами *Vrn-B1* (Стельмах, 1985), *Vrn-D1*, *Vrn-D4* (Zhang

et al., 2008) либо «слабым» аллелем доминантного гена *Vrn-A1* (Ригин и др., 1985).

Работ по сравнительному изучению тритикале, несущих разные комбинации генов *Vrn*, по длительности периода «всходы–колошение» растений мало. Они проводились лишь на материале, гомозиготном по генам *Vrn* (Стёпочкин, 2009; Емцева, Стёпочкин, 2014).

Цель данной работы – сравнительное изучение продолжительности периода «всходы–колошение» у исходных родительских форм и гибридов тритикале F₃ с разным сочетанием доминантных генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* и *Vrn-D4*.

Материалы и методы

Исследования проводили у гибридов F₃ от скрещивания в 2014 г. тритикале как одного, так и двух разных уровней пloidности.

Гибриды 8х тритикале, сочетающие в генотипе два разных доминантных гена *Vrn*, создаются для получения нового коллекционного и селекционного материала октаплоидных тритикале. Скрещивания 8х тритикале с озимым пшенично-ржаным амфиплоидом 6х делали для создания в дальнейшем серии гексаплоидных пшенично-ржаных амфиплоидов по разным доминантным генам *Vrn*.

Все родительские формы, за исключением озимого сорта Сирс 57, переходят к генеративному развитию при весеннем севе без предварительной яровизации проростков или растений. Две гексаплоидные селекционные формы, Сирс 57/2/4 и Цекад 90/5, способны также перезимовывать по типу озимых форм, таких, как 6х Сирс 57. Они являются потомством седьмого поколения растений, способных переходить к генеративному развитию без яровизации и выделенных из озимых сортов Сирс 57 и Цекад 90, созданных в СибНИИРС.

Октаплоидные тритикале получены при искусственном удвоении числа хромосом гаплоидных пшенично-ржаных гибридов от скрещиваний линий мягкой пшеницы Triple Dirk – доноров разных доминантных генов *Vrn* и сорта озимой ржи Короткостебельная 69 (Стёпочкин, 2009). Потомство каждого гомозиготного по всем генам растения размножали изолированно для предотвращения переопыления. Отклонения по каким-либо признакам в пределах популяции семьи объясняются наличием анеуплоидных растений, что типично для цитогенетически нестабильного октаплоидного уровня.

Весной 2016 г. семена гибридов, четырех родительских 8х форм и трех 6х форм тритикале, высевали в открытый грунт. Число растений в пределах комбинации скрещивания было не менее 40.

Фенологические наблюдения проводили на протяжении всей вегетации растений. Для характеристики экспрессии генов *Vrn* выбрали межфазный период «всходы–колошение», в конце которого растения находятся на этапе VIII органогенеза (Куперман и др., 1982).

Результаты статистически обработаны по стандартным программам электронной таблицы EXEL.

Результаты и обсуждение

Первое поколение от проведенных в 2014 г. скрещиваний октаплоидных форм между собой и с гексаплоидными

The duration of the shoots–earring interval in F_3 plants of different combinations of parental triticales forms

Combinations, parental triticales forms	Shoots–earring, days	Range of the dates of the start of the short shoots–earring interphase period, days	Percentage of plants with short shoots–earring interphase periods
8x <i>VrnA1</i> × 8x <i>VrnD1</i>	55.3 ± 1.7	43–49	18.0
8x <i>VrnB1</i> × 8x <i>VrnD1</i>	57.7 ± 1.9	47–53	27.5
8x <i>VrnA1</i> × 8x <i>VrnD4</i>	59.2 ± 2.0	44–50	17.5
8x <i>VrnA1</i> × 8x <i>VrnB1</i>	59.7 ± 1.5	46–51	6.0
8x <i>VrnD1</i> × 8x <i>VrnD4</i>	74.2 ± 0.7**	66–72	7.5
8x <i>VrnD1</i> × 6x Sears 57	68.3 ± 1.7	49–55	6.7
8x <i>VrnB1</i> × 6x Sears 57	71.7 ± 1.4	58–64	7.5
8x <i>VrnD4</i> × 6x Sears 57 /2/4	73.6 ± 1.6	65–71	10
8x <i>VrnB1</i> × 6x Cecad 90/5	78.8 ± 1.7*	64–70	7.5
8x <i>VrnA1</i>	65.1 ± 2.0	62–68	96
8x <i>VrnD1</i>	66.3 ± 0.7	62–68	82
8x <i>VrnB1</i>	71.3 ± 0.9	66–72	70
8x <i>VrnD4</i>	74.6 ± 1.2*	64–70	18
6x Cecad 90/5	76.0 ± 0.8	70–76	68
6x Sears 57 /2/4	76.2 ± 0.9	70–76	52

Differences within 8x triticales groups and hybrid triticales populations (8x × 8x) and (8x × 6x) are significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

растениями не было выровненным по некоторым признакам растений: «кустистость», «облиственность», «озерненность», «длительность вегетационного периода». Очевидно, большая вариация признаков была обусловлена наличием анеуплоидных растений, что характерно для тритикале октаплоидного уровня (Стёпочкин, 2008). Второе поколение, полученное в 2015 г., оказалось гораздо более разнообразным по всем изученным признакам, что объясняется рекомбинацией хромосом, генов, анеуплоидией, особенно у гибридов от разноплоидных скрещиваний. В популяциях гибридов F_2 всех комбинаций появлялись единичные растения, не перешедшие к генеративному развитию, что можно объяснить выщеплением рецессивных гомозиготных форм или элиминацией хромосом, несущих доминантные гены *Vrn*. Были также растения, которые начали выколашиваться спустя более чем 80 дней вегетации и сформировавшие неполноценные семена. Для изучения третьего поколения выбирали полноценные семена с растений, которые выколашивались не позднее чем через 60 дней вегетации.

В третьем поколении также появлялись отдельные кустиющиеся растения озимого типа в пределах каждой комбинации скрещивания и растения с длительным периодом вегетации, но были также и такие, у которых фаза «всходы–колошение» была короче, чем у обеих родительских форм. Это обусловило несколько больший размах изменчивости по данному признаку у гибридов, по сравнению с исходными родительскими формами. За исключением гибридов комбинации *VrnD1* × *VrnD4*, у популяций гибридов других комбинаций скрещивания средняя продолжительность межфазного периода «всходы–колошение» растений была короче, чем у обеих родительских форм. Скорее всего, это связано с аддитивным эффектом двух доминантных генов *Vrn* у гомозиготных и гетерозиготных растений.

Гены *Vrn* по силе фенотипического проявления у мягкой пшеницы составляют ряд *Vrn1* (*VrnA1*) > *Vrn3* (*VrnD1*) > *Vrn4* (*VrnD4*) ≥ *Vrn2* (*VrnB1*) (Гончаров, Ригин, 1989; Гончаров, 2012). У октаплоидных тритикале, полученных на основе изогенных линий Triple Dirk, этот ряд фенотипов сохраняется, что было показано нами ранее (Стёпочкин, 2008, 2009) и подтверждается в данной работе на примере признака продолжительности межфазного периода «всходы–колошение». Однако различия недостоверны между популяциями растений по генам *VrnA1* и *VrnD1* (таблица).

Средние значения данного признака позволяют судить о степени экспрессии пары доминантных генов *Vrn* у изученных форм гибридов. По силе фенотипического проявления (чем короче фаза, тем сильнее проявление) гибриды у октаплоидных гибридов составляют следующий ряд: (*VrnA1* × *VrnD1*) ≥ (*VrnB1* × *VrnD1*) ≥ (*VrnA1* × *VrnD4*) = (*VrnA1* × *VrnB1*) > (*VrnD1* × *VrnD4*); у гибридов октаплоидных тритикале с гесаплоидными – ряд (*VrnD1* × Сирс 57) > (*VrnB1* × Сирс 57) ≥ (*VrnD4* × Сирс 57/2/4) > (*VrnB1* × Цекад 90/5).

Несмотря на то что процесс стабилизации у гибридов F_3 еще не закончен, особенно при разноплоидных скрещиваниях, где помимо рекомбинации генов, вероятно, не завершён процесс стабилизации уровня плоидности, полученные результаты позволяют утверждать, что сочетание двух доминантных генов, *VrnA1* и *VrnD1*, в одном организме растения укорачивает межфазный период «всходы–колошение» по сравнению с другими вариантами сочетаний двух доминантных генов у октаплоидных амфилоидов и исходными родительскими формами, что говорит об аддитивном эффекте этих генов. Ген *VrnD1* на фоне гена *VrnD4* у октаплоидных амфилоидов не проявился, так как гибриды с сочетанием обоих этих генов по данному признаку не отличаются от исходной родительской формы, несущей доминантный ген *VrnD4*.

Гибриды от разноплоидных скрещиваний комбинации *VrnB1* × Цекад 90/5 отличались самым длительным периодом «всходы–колошение». Также довольно продолжительным периодом характеризовались и другие гибриды этого типа скрещиваний. В целом популяции разноплоидных гибридов, видимо, состояли из доминантных гомозигот и гетерозигот по одному из генов, *VrnB1*, *VrnD1* и *VrnD4*, и по экспрессии этих генов они не отличались от исходных материнских форм октаплоидных тритикале. Скорее всего, две мутантные отцовские формы-двуручки, Цекад 90/5 и Сирс 57/2/4, либо не имели доминантных генов яровости, так же, как и озимый сорт Сирс 57, и были яровыми эпимутантами, либо имели слабые их аллели, согласно гипотезе Б.В. Ригина с коллегами (1985).

Эта группа гибридов характеризовалась небольшой долей рано выколосившихся (в пределах недельного интервала) растений. Но наименьший процент таких растений (6 %) отмечен у гибридов октаплоидных тритикале комбинации *VrnA1* × *VrnB1* (см. таблицу). Исходные родительские формы, кроме *VrnD4*, обладали высокой долей таких растений, что косвенно свидетельствует об их большей выравненности по данному признаку и более высокой их цитогенетической стабильности, чем у гибридных популяций.

Таким образом, сочетание двух доминантных генов, особенно *VrnA1* и *VrnD1*, в гомозиготном или гетерозиготном состоянии в генотипе октаплоидных растений большинства гибридов F_3 укорачивает период «всходы–колошение», и у селекционера есть возможность в последующих поколениях выбрать константные формы тритикале с более укороченным вегетационным периодом. Отбором наиболее ранних растений из популяций гибридов от разноплоидных скрещиваний можно будет создать в последующих поколениях серию линий гексаплоидных тритикале с идентифицированными доминантными генами *Vrn*. Получаемый гибридный материал представляет интерес как теоретический – для дальнейших генетических исследований, так и практический – для селекционного использования.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0001.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Emtseva M.V., Stepochkin P.I. Peculiarities of the duration of the vegetation period and time of the beginning of the phases of development in octaploid and hexaploid triticale under artificial conditions of growing. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2014;7:3–6. (in Russian)
- Fedorova T.N. Problems of breeding and cytogenetics of triticale. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 1983; 10:15–19. (in Russian)
- Fu D., Szűcs P., Yan L., Helguera M., Skinner J.S., von Zitzewitz J., Hayes P.M., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Genet. Genomics*. 2005;273:54–65.
- Goncharov N.P. *Sravnitel'naya genetika pshenits i ikh sorodichey [Comparative genetics of wheat and their related species]*. Novosibirsk: "Geo" Publ., 2012. (in Russian)

- Goncharov N.P., Rigin B.V. K voprosu o chisle dominantnykh genov *Vrn*, opredelyayushchikh yarovoy tip razvitiya [To the question on the number of dominant *Vrn* genes, which determine the spring type of development]. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. Leningrad, 1989;128:71–74. (in Russian)
- Košner J., Pánková K. Chromosome substitutions with dominant loci *Vrn-1* and their effect on developmental stages of wheat. *Czech. J. Genet. Plant Breed.* 2004;2(40):37–44.
- Kuperman F.M., Rzhanova E.I., Murashev V.V., Lvova I.N., Sedova E.A., Ahundova V.A., Shcherbina I.P. *Biologiya razvitiya kul'turnykh rasteniy [The Biology of development of cultivated plants]*. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1982. (in Russian)
- Mahalin M.A. *Mezhrodovaya gibridizatsiya zernovykh kolosovykh kul'tur [Intergeneric hybridization of cereals]*. Moscow: Nauka Publ., 1992. (in Russian)
- Oliver S.N., Finnegan E.J., Dennis E.S., Peacock W.J., Trevaskis B. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the *VERNALIZATION1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106:8386–8391.
- Plaschke J., Börner A., Xie D.X., Koebner R.M.D., Schlegel R., Gale M.D. RFLP mapping of genes affecting plant height and growth habit in rye. *Theor. Appl. Genet.* 1993;85:1049–1054.
- Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 1971;22:21–31.
- Rigin B.V., Svejnek S.N., Bulavka N.V. Genotypy obraztsov yarovoy myagkoy pshenitsy po genam, kontroliruyushchim tip razvitiya. [The genotypes of samples of spring soft wheat for the genes controlling the development]. *Katalog mirovoy kolleksii Vsesoyuznogo instituta rasteniyevodstva im. N.I. Vavilova [The catalogue of world collection of the All-Union Institute of plant growing by N.I. Vavilov]*. Leningrad: VIR Publ., 1985;427. (in Russian)
- Rutts R.I., Leontiev S.I. Ozimye pshenitsy pri vesennem vyseve v usloviyakh lesostepi Omskoy oblasti [Winter wheat at spring sowing in conditions of forest-steppe of the Omsk region]. *Tr. Om. SKhI [Proceed. of Omsk agricultural Institute]*. 1969;67:57–67. (in Russian)
- Shulyndin A.F. *Tritikale – novaya zernovaya i kormovaya kul'tura. [Triticale – a new grain and forage crop]*. Kiev: Urozhay Publ., 1981. (in Ukrainian)
- Stelmakh A.F. Genotype of typical facultative plants of soft wheat having the loci *Vrn1-3*, and *Ppdl-3*. *Nauchno-tekhnicheskii byulleten Vsesoyuznogo selektsionno-geneticheskogo instituta = Scientific and Technological Bulletin of the All-Union Plant Breeding and Genetics Institute*. Odessa, 1985;56(2):15–20. (in Ukrainian)
- Stepochkin P.I. Formoobrazovatel'nye protsessy v populyatsiyakh tritikale [The processes of plant forms emergency in populations of triticale]. Novosibirsk: Siberian branch. The Research Institute's of Siberian branch of RAAS, 2008. (in Russian)
- Stepochkin P.I. Development and study of a set of triticale forms as to the *Vrn* genes. *Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences*. 2009;11:26–32. (in Russian)
- Voronin A.N., Stelmakh A.F. Etapy organogeneza u pochty izogennykh po lokusam *Vrn1-3* liniy myagkoy pshenitsy [Stages of organogenesis have nearly isogenic at the loci *Vrn1-3* of soft wheat lines]. *Scientific-Techn. bull. WSGI*. 1985;55:19–23. (in Russian)
- Wexelsen H. Studies on the genetic basis of spring and winter forms in diploid and tetraploid rye (*Secale cereale* L.). *Meldinger fra Norges Landbrukshoegskole*. 1969;24(48):1–15.
- Worland A.J. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. *Euphytica*. 1996;89:49–57.
- Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Yasuda S., Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *Vrn-3* is an orthologue of *FT*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;104:19581–19586.
- Yoshida T., Nishida H., Zhu J., Nitcher R., Distelfeld A., Akashi Y., Kato K., Dubcovsky J. *Vrn-D4* is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2010;120:543–552.
- Zhang X.K., Xiao Y.G., Zhang Y., Xia X.C., Dubcovsky J., He J.H. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. *Crop Sci.* 2008;48:458–470.

Экологическая селекция растений: типы и практика

В.В. Сюков¹, В.Г. Захаров²✉, А.И. Менибаев¹

¹ Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова, Самарская область, пос. Безенчук, Россия

² Ульяновский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Ульяновская область, Ульяновский район, пос. Тимирязевский, Россия

В статье изложены основы экологической селекции. Представлены критический анализ определения этого термина и теоретические основы экологической селекции как метода отбора генотип-средовых наследственных факторов. Выделены два основных типа организации экологической селекции: челночная селекция, реализованная в CIMMYT и Всероссийском научно-исследовательском институте селекции и семеноводства овощных культур (ВНИИССОК), и сопряженная селекция, разработанная как программы «Экада», «Клевер», «Люцерна» и «Аридные культуры». Подробно изложены методические подходы, применяемые при сопряженной селекции. Показано, что экологическая селекция может быть представлена тремя модулями: формирование искусственного экологического градиента (экологического вектора), собственно отбор генотипов с широкой нормой реакции (отбор на гомеоадаптивность) и организация движения селекционного материала вдоль экологического вектора. На примере программы «Экада» показана практическая реализация экологической селекции по типу «сопряженной селекции». Экологический вектор программы представлен шестью точками, расположенными в исторически сложившихся селекционных центрах Поволжско-Уральского региона, характеризующимися различной степенью выраженности лимитирующих рост и развитие растений факторов среды. Схема организации селекции заключается в параллельном испытании совместного селекционного материала во всех точках экологического вектора и выделении наиболее пластичных линий. При этом, в отличие от «челночной селекции», вдоль экологического градиента перемещаются не генотипы, а информация. Результатом работы творческого коллектива «Экада» стало создание серии сортов яровой мягкой пшеницы (Экада 6, Экада 70, Экада 66, Экада 109, Экада 113), рекомендованных для использования в сельскохозяйственном производстве.

Ключевые слова: экологическая селекция; генотип-средовые взаимодействия; яровая пшеница; челночная селекция; сопряженная селекция.

Ecological plant breeding: types and practice

V.V. Syukov¹, V.G. Zakharov²✉, A.I. Menibaev¹

¹ Samara Research Scientific Institute of Agriculture named after N.M. Tulaykov, Samara region, Bezenchuk, Russia

² Ulyanovsk Research Scientific Institute of Agriculture, Ulyanovsk region, Timiryazevskiy, Russia

The article describes the theoretical basis of ecological breeding. A critical analysis of the definition of this term and the theoretical foundations of ecological breeding, as a method of selection of genotype-environmental hereditary factors are presented. Two main types of the organization of ecological breeding are in focus: shuttle breeding actualized in CIMMYT and the All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production (VNIISOK), and conjugate breeding developed under such programs as “Ekada”, “Clover”, “Lucerne” and “Arid cultures”. The methodological approaches used in conjugate breeding are described in details. It is illustrated that ecological breeding can be represented by three modules: the formation of an artificial ecological gradient (ecological vector), the actual selection of genotypes with a wide norm of reaction (selection for homeoadaptability) and the organization of movement of the breeding material along the ecological vector. The practical implementation of ecological selection of the “conjugate selection” type was shown with the “Ekada” program as an example. The ecological vector of the program consists of six points arranged in historical breeding centers of the Volga-Ural region characterized by varying strength of factors that limit the growth and development of plants. The organizational scheme of selection lies in parallel testing pooled breeding material at all points of the ecological vector and isolating the most compliant lines. In this case, information, not genotypes, is what is transferred along the ecological gradient, in contrast to “shuttle selection”. The result of the work of the creative team “Ekada” was the development of series of spring wheat strains (e.g. Ekada 6, Ekada 70, Ekada 66, Ekada 109, Ekada 113), which were recommended for use in agricultural production.

Key words: ecological selection; genotype-environmental interactions; spring wheat; shuttle breeding; conjugate breeding.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Сюков В.В., Захаров В.Г., Менибаев А.И. Экологическая селекция растений: типы и практика. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):534-536. DOI 10.18699/VJ17.270

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Syukov V.V., Zakharov V.G., Menibaev A.I. Ecological plant breeding: types and practice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):534-536. DOI 10.18699/VJ17.270 (in Russian)

Термин «экологическая селекция», или «адаптивная селекция», у многих авторов формулируется по-разному (Шевелуха, 1993; Пивоваров и др., 1994; Кильчевский, Хотылева, 1997; Жученко, 2001; Корзун, Бруйло, 2011). Под этим понятием часто объединяются несколько различных селекционных направлений, общим элементом которых является экологизация (биологизация) сельского хозяйства (Кильчевский, Хотылева, 1997) или повышение адаптивного потенциала растений к конкретным факторам среды (Жученко, 2001).

Если все-таки под экологической селекцией понимать отдельный раздел селекционной науки, то следует определиться, что брать за основной объект исследования в нем и какой основной метод выделяет экологическую селекцию из других направлений.

Прежде всего, следует признать, что селекционеры, ведущие селекционный процесс в конкретной природно-климатической зоне, ограничиваются в основном информацией о доле генотипической изменчивости в фенотипической. Если коэффициент наследуемости ($H^2 = \sigma_g^2 / \sigma_{ph}^2$) достаточно высок, отбор в ранних поколениях по анализируемому признаку считается эффективным. Однако подобный упрощенный подход не всегда приводит к ожидаемому результату, поскольку структура фенотипической вариабельности сложнее и кроме паратипической и генотипической изменчивости включает в себя генотип-средовые взаимодействия, которые носят в основном эпигенетический характер (Сюков и др., 2010).

В последнее время в научной литературе представлено много результатов исследований, в том числе и на молекулярно-генетическом уровне, подтверждающих эту концепцию. А.Н. Paterson с коллегами (1991) выявили на томатах, что для одного и того же признака в разных экологических условиях проявляются разные QTL. Аналогичные результаты получены на кукурузе (Stubber et al., 1992), арабидопсисе (Ungerer et al., 2003), сое (Jiang et al., 2011), а также на пшенице (Börner et al., 2002; Чесноков и др., 2008, 2012; Сюков и др., 2012). В предыдущих наших исследованиях показано, что генотипическая изменчивость вносит в 1.61–4.89 раза меньший вклад, чем наследуемые генотип-средовые взаимодействия, хотя основной вклад в формирование фенотипа по всем количественным признакам у яровой мягкой пшеницы дает изменчивость, вызванная различиями по годам и экологическим точкам. Общая доля паратипической изменчивости составляла от 38.2 (плотность продуктивного стеблестоя) до 58.9 % (урожайность) (Захаров и др., 2012).

Создание сортов с широкой нормой реакции невозможно без учета эпигенетической (генотип-средовой) составляющей, а значит, и без создания искусственного экологического градиента. Именно использование такого искусственного экологического градиента, который назван нами «экологический вектор», мы считаем основным методом экологической селекции.

Техника применения данного метода может быть различной, но все методики в конечном счете можно свести к двум типам. Первый тип – так называемая челночная селекция (shuttle breeding), разработанная Норманом Борлаугом в CIMMYT. Она заключается в движении селекционного материала между двумя контрастными экологи-

ческими точками в Мексике – Сьюдад-Обрегон и Толука (Rajaram et al., 1984, 2002; Rajaram, van Ginkel, 2001).

Процесс перемещения селекционного материала дает двойной эффект. Во-первых, изначально, как и полагал Н. Борлауг, челночная селекция должна была вдвое ускорить селекционный процесс, поскольку позволяла получать два урожая в год. Во-вторых, селекционные образцы, перемещавшиеся между двумя точками на 10 градусов широты и от близкого уровня моря в Долине Яки в Сонора до более чем 8 тыс. футов над уровнем моря в Толуке, были подвержены различным заболеваниям, почвенным и климатическим условиям и неодинаковой продолжительности светового дня: сокращение с момента посадки в зимний период в Соноре и удлинение летом в г. Толука. Результат был намного больше, чем просто превышение скорости процесса размножения. Растения, которые выжили и показали хорошие результаты в обоих местах, оказались более приспособленными к широкому диапазону условий (Rajaram et al., 1984).

N. Borlaug писал (1968), что с помощью этой техники они создали высокоурожайные, нечувствительные к длине дня сорта с широким спектром экологической адаптации и устойчивости к болезням. Это новая комбинация однозначно ценных признаков в сортах пшеницы.

Такая же логика формирования челночной селекции некоторых овощных культур (в первую очередь, перца сладкого) наблюдалась во Всероссийском научно-исследовательском институте селекции и семеноводства овощных культур (ВНИИСОК) (Пивоваров и др., 1994). Однако эксперименты показали ограниченность большинства регионов центральной России по информативности лимитирующих факторов среды в выбранных экологических точках. В связи с этим и для ускорения селекционного процесса были использованы экологические точки в Азербайджане (Ленкорань), Узбекистане (Термез) и на Кубе. Методы экологической селекции апробированы при создании сортов: огурца – Водолей, Единство и др.; томата – ТМК-22 и др.; петрушки – Бриз; шпината – Стоик; мангольда – Белавинка; редиса – Софит, Моховский; горошка душистого – Термезий, Люммер и др.; артишока – Красавец; мелиссы – Дозя; майорана – ТерМос, Малахит; фасоли овощной – Настёна, Магура, Миробелла и др. (Пивоваров и др., 1994).

Под эгидой CIMMYT на тех же принципах челночной селекции организована программа Казахстанско-Сибирской сети улучшения яровой пшеницы (КАСИБ) (Шаманин и др., 2012).

Второй тип организации экологической селекции можно назвать сопряженной селекцией. Он создан под названием программа «Экада» и включает три основных модуля: 1) формирование экологического вектора – совокупности естественных сред, которая способствует эффективному отбору по генотип-средовой компоненте вдоль создаваемого ею градиента; 2) выбор статистических параметров, адекватно оценивающих различия по гомеоадаптивности; 3) создание схемы движения селекционного материала по точкам экологического вектора.

Экологический вектор «Экада» представлен шестью географическими точками в исторически сложившихся селекционных центрах: Самарском НИИСХ (Безенчук –

далее Б), Ульяновском НИИСХ (Тимирязевский – У), Пензенском НИИСХ (Лунино – П), Башкирском НИИСХ (Чишмы – Ч), Татарском НИИСХ (Казань – К), НПФ «Фитон» (Карабалык, Кустанайская область, Республика Казахстан – Ф).

Анализ параметров среды показывает, что крайняя левая точка в сформированном экологическом векторе, в которой в наибольшей степени сконцентрированы лимитирующие рост и развитие растений факторы среды (почвенная и атмосферная засуха, эпифитотии листовых болезней), – Безенчук. Здесь созревает наименьший урожай зерна, и лишь в один год из трех лет среда характеризуется высокой дифференцирующей способностью и типичностью для вектора в целом. Крайне правыми точками являются Казань и Ульяновск, где в наибольшей степени реализуется потенциал продуктивности. Стабильно в центре вектора расположен пос. Карабалык с высокими параметрами дифференцирующей способности среды, но нетипичными для вектора в целом. Точки Пенза и Чишмы меняют свое положение, приближаясь то к левой, то к правой точке. Таким образом, сформирован экологический вектор Б→(П)→Ф→(Ч)→У→К с различным спектром давления лимитирующих факторов среды в онтогенезе вдоль экологических точек (Сюков и др., 2013).

Схема организации «сопряженной селекции» заключается в параллельном (сопряженном) испытании совместного селекционного материала во всех точках экологического вектора. Следовательно, в отличие от челночной селекции вдоль экологического градиента перемещаются не генотипы, а информация.

Практическим результатом работы временного творческого коллектива «Экада» стало создание серии сортов яровой мягкой пшеницы: Экада 6 (Крестьянка/Самсар), Экада 70 (Волжанка/Нја 21677//Тулайковская юбилейная), Экада 66 (Волжанка/Нја 21677//Тулайковская юбилейная), Экада 109 (Отечественная/Лютесценс 62//Саратовская 29/3/Безостая 1/Саратовская 29/4/Кутулукская/5/Л-503/6/Харьковская 12) и Экада 113 (Скала БР-2098/Юлия), которые включены в Государственный реестр селекционных достижений РФ.

Сорта, выведенные в ходе выполнения программы, отличаются полевой устойчивостью к листовым болезням; Экада 66 и Экада 70 практически не поражаются пыльной и твердой головней, а Экада 113, кроме того, проявляет слабую восприимчивость к стеблевой и желтой ржавчине.

По принципу сопряженной селекции на экологических точках России и Беларуси во Всероссийском научно-исследовательском институте кормов организованы программы «Клевер», «Аридные культуры» и «Люцерна» (Шамсутдинов, 2014).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Borlaug N.E. Wheat breeding and its impact on world food supply. Proc. 3rd Int. Wheat Genetic Symp. Canberra, Australia. 1968;1-36.
- Börner A., Schumann E., Fürste A., Costel H., Leithold B., Roder M.S., Weber W.E. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 2002;105:921-936.

- Chesnokov Y.V., Pochepnaya N.V., Berner A., Lovasser U., Goncharova E.A., Dragavcev V.A. Ecogenetic organization of quantitative traits of plants and mapping of loci determining agronomically important traits of soft wheat. Doklady RAN = Proceedings of the Russian Academy of Sciences. 2008;418(5):693-696. (in Russian)
- Chesnokov Y.V., Pochepnaya N.V., Kozlenko L.V., Sitnikov M.N., Mitrofanova O.P., Syukov V.V., Kochetkov D.V., Lovasser U., Berner A. Mapping of QTLs determining the expression of agronomically and economically valuable features in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in environmentally different Russia regions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(4/2):970-986. (in Russian)
- Jiang Z., Zhang B., Teng W., Han Y., Zhao X., Sun D., Zhang Z., Li W. Impact of epistasis and QTL×environmental interaction on the oil filling rate of soybean seed at different developmental stages. Euphytica. 2011;177(3):431-442.
- Kilchevsky A.V., Khotyleva L.V. Ekologicheskaya selektsiya rasteniy [Ecological Plant Breeding]. Minsk: Tekhnologiya Publ., 1997. (in Belarus)
- Korzun O.S., Bruylo A.S. Adaptivnye osobennosti selekcii i semenovodstva selskokhozyaystvennykh rasteniy [Adaptive Features of Crop Breeding and Seed Production]. Grodno: GGAU Publ., 2011. (in Belarus)
- Paterson A.H., Damon S., Hewitt J.D. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: Comparison across species, generations, and environments. Genetics. 1991;127:181-197.
- Pivovarov V.F., Dobrutskaia E.G., Balashova N.N. Ekologicheskaya selektsiya rasteniy (na primere ovoshchnykh kultur) [Ecological Plant Breeding by the Example of Vegetable Crops]. Moscow, 1994. (in Russian)
- Rajaram S., Borlaug N.E., van Ginkel M. CIMMYT International wheat breeding. Bread Wheat – Improvement and Production. Plant Production and Protection Series. FAO Rome. 2002;30:103-117.
- Rajaram S., Skovmand B., Curtus B.C. Philosophy and methodology of an international wheat breeding program. Gene manipulation in plant breeding. N. Y.; London, 1984;33-60.
- Rajaram S., van Ginkel M. Mexico, 50 years of international wheat breeding. The World Wheat Book. A History of Wheat Breeding. Paris: Lavoisier Publishing, 2001;579-608.
- Shamanin V.P., Morgunov A.I., Manes J., Zelenskiy Y.I., Chursin A.S., Levshunov M.A., Pototskaya I.V., Likhnenko I.E., Manko T.A., Karakoz I.I., Tabachenko A.V., Petukhovskiy S.L. Breeding and genetic estimation of spring bread wheat populations of the Siberian shuttle breeding nursery of SIMMYT. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(1):21-32. (in Russian)
- Shamsutdinov Z.S. Forage crop breeding: achievements and tasks. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2014;6:36-45. (in Russian)
- Shevelukha V.S. Evolution of agrotechnologies and strategy of adaptive plant breeding. Vestnik RASKhN = Herald of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 1993;4:16-21. (in Russian)
- Stuber C.W., Lincoln S.E., Wolff D.W. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. Genetics. 1992;132:823-839.
- Syukov V.V., Kochetkov D.V., Kocherina N.V., Chesnokov Y.V., Berner A., Lovasser U. Detection of loci determining quantitative traits of summer wheat in the Middle Volga region. Vestnik Saratovskogo gosagrouniversiteta im. N.I. Vavilova = Herald of Saratov State Vavilov Agrarian University. 2012;12:91-94. (in Russian)
- Syukov V.V., Madyakin E.V., Kochetkov D.V. The contribution of genotype-environmental effects to the formation of quantitative traits in inbred and outbred plants. Informatsionnyy Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders. 2010;14(1):141-147. (in Russian)
- Syukov V.V., Zakharov V.G., Vasilova N.Z., Krivobocheck V.G., Nikonov V.I., Ganeev V.A. Metodika vyyavleniya epigeneticheskoy ekspressii poligenov vdol ekologicheskogo vektora na primere yarovoy myagkoy pshenitsy [Methods of Identification of Epigenetic Expression of Polygenes along the Ecological Vector by the Example of Spring Soft Wheat]. Samara: SamNTc RAN Publ., 2013. (in Russian)
- Ungerer M.C., Halldorsdottir S.S., Purugganon M.D., Mackay T.F. Genotype-environmental interactions at quantitative trait loci affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. Genetics. 2003;165:353-365.
- Zakharov V.G., Syukov V.V., Krivobocheck V.G., Kochetkov D.V., Nikonov V.I., Vasilova N.Z., Ganeev V.A. Laws of the formation of a summer soft wheat phenotype for quantitative traits. Vestnik Saratovskogo gosagrouniversiteta im. N.I. Vavilova = Herald of Saratov State Vavilov Agrarian University. 2012;10:41-42. (in Russian)
- Zhuchenko A.A. Adaptivnaya sistema selekcii rasteniy (ekologo-geneticheskoe osnovy) [The Adaptive System of Plant Breeding: Ecogenetic Basics]. Moscow: RUDN Publ., 2001. (in Russian)



Комбинационная способность сортов ячменя ярового в системе прямых диаллельных скрещиваний

Е.В. Компанец , М.Р. Козаченко, Н.И. Васько, А.Г. Наумов, П.Н. Солонечный, С.И. Святченко

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева Национальной академии аграрных наук Украины, Харьков, Украина

Для эффективной комбинационной селекции необходимо знать комбинационную способность исходного материала. Целью исследований было определение особенностей общей (ОКС) и специфической (СКС) комбинационной способности и соотношение вариантов остистых и безостых сортов ячменя ярового. Исследование проведено в 2014–2015 гг. В скрещиваниях по прямой диаллельной схеме использованы сорта ячменя ярового и их родительские формы. В F_1 установлены особенности комбинационной способности остистых и безостых сортов ячменя ярового и их родительских форм. Выделены сорта с высокими эффектами ОКС по признакам: продуктивность растения – сорт Бадёрый; число зерен в колосе – Джерело, Бадёрый, Витраж и Малёвничий; масса 1000 зерен – Джерело, Бадёрый, Этикет, Гранал, Модерн, Витраж и Толар; длина колоса – Джерело, Гранал и Витраж; число колосков в колосе – Джерело и Малёвничий; высота растения – Джерело, Бадёрый и Гранал; продуктивная кустистость – Звершняя и Бадёрый; общая кустистость – Звершняя и Бадёрый; масса соломы – Бадёрый. Данные сорта имели наибольшее число генов, которые положительно определяют указанные признаки. Уровень комбинационной способности родительских компонентов скрещивания может по-разному проявляться у сортов, созданных на основе их гибридизации. Установлено превышение значений вариантов ОКС над значениями вариантов СКС за 2014–2015 гг. в сорте Звершняя по признаку масса 1000 зерен (4.20 и 4.03 по ОКС и 3.78 и 3.84 по СКС соответственно), что указывает на детерминацию этого признака в основном аддитивными эффектами генов. Определены высокие и низкие эффекты СКС по признакам продуктивность (масса зерна) растения и ее структурные элементы (продуктивная кустистость, число зерен в колосе, масса 1000 зерен). Больше всего высоких эффектов СКС отмечено по признаку масса 1000 зерен.

Ключевые слова: ячмень; сорт; диаллельные скрещивания; признак растения; F_1 ; общая и специфическая комбинационная способность; варианты ОКС и СКС; аддитивные и неаддитивные эффекты генов.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Компанец Е.В., Козаченко М.Р., Васько Н.И., Наумов А.Г., Солонечный П.Н., Святченко С.И. Комбинационная способность сортов ячменя ярового в системе прямых диаллельных скрещиваний. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):537-544. DOI 10.18699/VJ17.271

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kompanets E.V., Kozachenko M.R., Vasko N.I., Naumov A.G., Solonechniy P.N., Sviatchenko S.I. Combining ability of spring barley varieties in the direct diallel cross system. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5): 537-544. DOI 10.18699/VJ17.271 (in Russian)

Combining ability of spring barley varieties in the direct diallel cross system

E.V. Kompanets , M.R. Kozachenko, N.I. Vasko, A.G. Naumov, P.N. Solonechniy, S.I. Sviatchenko

Plant Production Institute nd. a. V.Ya. Yuriev of NAAS, Kharkiv, Ukraine

It is necessary to know the combining ability of starting material for effective breeding to create varieties. The research aim was to determine the peculiarities of the general combining ability (GCA) and specific combining ability (SCA) and the ratio of their variances for awned and awnless varieties and their parental forms in F_1 . The study was conducted in 2014–2015. Spring barley varieties and their parental forms were used in direct diallel crosses. In 2014–2015, peculiarities of the combining ability of awned and awnless spring barley varieties and their parental forms were determined in F_1 . We highlighted varieties with strong GCA effects: 'Badioryy' for plant productivity; 'Dzherelo', 'Badioryy', 'Vitrazh' and 'Maliornychy' for grain number per spike; 'Dzherelo', 'Badioryy', 'Etiket', 'Gral', 'Modern', 'Vitrazh', and 'Tolar' for 1000-grain weight; 'Dzherelo', 'Gral', and 'Vitrazh' for spike length; 'Dzherelo' and 'Maliornychy' for spikelet number per spike; 'Dzherelo', 'Badioryy' and 'Gral' for plant height; 'Zvershennyya' and 'Badioryy' for productive tillering; 'Zvershennyya' and 'Badioryy' for total tillering; and 'Badioryy' for straw weight. These varieties had the largest numbers of genes that positively determine these traits. The level of combining ability of parental forms may be manifested differently in varieties created via hybridization of them. GCA variances exceeded SCA variances in 'Zvershennyya' in 2014–2015 for the trait "1000-grain weight" (GCA – 4.20 and 4.03, respectively; SCA – 3.78 and 3.84, respectively), therefore, it is determined mainly by additive gene effects. Strong and weak SCA effects were observed for plant productivity (grain weight) and its structural components (productive tillering, grain number per spike, 1000-grain weight). Strong SCA effects were the most numerous for the trait "1000-grain weight."

Key words: barley; variety; diallel crosses; plant trait; F_1 ; general combining ability (GCA); specific combining ability (SCA); GCA and SCA variances; additive and non-additive gene effects.

Основным методом в селекции ячменя ярового как строгого самоопылителя является метод комбинационной селекции с последующим индивидуальным отбором константных линий и выделением лучших в конкурсном сортоиспытании. В последнее время за рубежом созданы гетерозисные гибриды ячменя (Polok et al., 1997; Gupta, Singh, 1999; Shahnejat-Bushehri, 2005; Soyulu, 2006), технология получения которых очень трудоемка. Поэтому направление гетерозисной селекции ячменя заслуживает дальнейшего исследования. В настоящее время стоит задача повышения эффективности общепринятого метода комбинационной селекции ячменя.

Увеличение объемов производства ячменя в первую очередь зависит от создания и быстрого внедрения в производство сортов с желаемыми ценными хозяйственными признаками и высокой урожайностью. Успех селекции в значительной мере зависит от наличия исходного материала с необходимыми признаками.

Подбор родительских пар для скрещиваний дает возможность в результате комбинационной селекции получить ценные формы по продуктивности и другим количественным признакам. Наиболее эффективным методом оценки комбинационной способности генотипов является система диаллельных скрещиваний (Турбин и др., 1974).

В работе М.Д. Варлахова с коллегами (1977) отмечено, что при использовании линий и сортов с высокой комбинационной способностью можно получить более урожайные сорта, чем в случае линий и сортов с низкой комбинационной способностью. Следовательно, комбинационная способность дает возможность селекционеру предсказать результаты будущих скрещиваний и сконцентрировать внимание на перспективном материале (Савченко, 1984).

Результаты неодинакового уровня ОКС и СКС сортов ячменя ярового, в основном по морфо-биологическим особенностям и комплексу биологических признаков, приведены в исследовании (Sprague, Tatum, 1942). Зависимость эффектов общей и специфической комбинационной способности сортов ячменя по продуктивности, высоте, массе зерна с колоса, продуктивной кустистости, числу зерен в колосе, массе 1000 зерен от генотипа показана в ряде работ (Турбин и др., 1974; Савченко, 1984; Ващенко, 2009; Донцов, 2011; Гудзенко, 2012; Звягинцева, Петренкова, 2012; Васильківський, Гудзенко, 2013; Potla et al., 2013; Ващенко, Шевченко, 2014; Milomirka et al., 2014).

S. Singh с коллегами (2007) установили различную комбинационную способность по продуктивности и ее компонентам у ячменя и показали, что эти признаки определяются неаддитивными эффектами генов.

Высокие показатели вариантов ОКС и СКС сортов ячменя установили К.К. Pawar и А.К. Singh (2013), в результате чего выделены ценные сорта для гибридизации, а также определены комбинации с высокими эффектами СКС по большинству признаков, что свидетельствует о преобладании у этих сортов неаддитивных эффектов генов и возможности использования в селекции более поздних поколений гибридов.

X. Zhang с коллегами (2015) определили различные уровни ОКС и СКС сортов ячменя и выделили сорта с

высокими эффектами ОКС и комбинации с высоким гетерозисом по большинству признаков.

Разные уровни вариантов ОКС и СКС по отдельным признакам ячменя показали B. Singh с коллегами (2013), они определили превышение неаддитивных эффектов генов по урожайности зерна и аддитивные эффекты генов по компонентам продуктивности.

S. Pesaraklu с коллегами (2016) установили высокие эффекты ОКС по признакам: число зерен в колосе, масса зерна с колоса, а высокие эффекты СКС – еще и по массе 1000 зерен сортов ячменя.

Целью настоящих исследований была оценка общей и специфической комбинационной способности, соотношение вариантов ОКС и СКС остистых и безостых сортов и их родительских форм в F_1 гибридов; установление зависимости комбинационной способности сортов от ее уровня у исходных компонентов скрещивания, на основе которых они созданы, а также определение эффективности отборов в комбинационной селекции ячменя.

Материалы и методы

Исследования проведены в 2014–2015 гг. В скрещиваниях по прямой диаллельной схеме использованы сорта ячменя ярового и их родительские формы: безостый сорт Модерн и его отцовская (безостый сорт Гранал) и материнская (остистый сорт Звершения) формы; безостый сорт Витраж и его материнская (остистый сорт Звершения) и отцовская (безостый сорт Гранал) формы; остистый сорт Этикет и его остистая материнская (линия 81-97-7, подобная сорту Джерело) и отцовская остистая (сорт Звершения) формы; остистый сорт Взирац и его остистая материнская (линия 90-6-108, подобная сорту Бадёрый) и остистая отцовская (сорт Звершения) формы; остистый сорт Малёвничий и его остистая материнская (сорт Pasadena) и остистая отцовская (сорт Tolar) формы.

Скрещивания проводили в 2013 и 2014 гг. Семена высевали кассетной сеялкой СКС-6-10 однострочными рядами с междурядьями 15 см в двух повторениях. Растения F_1 вместе с корнями собирали вручную. Анализировали 50 растений по отдельным количественным признакам: продуктивность (масса зерна) растения, ее структурные элементы (продуктивная кустистость, число зерен в колосе, масса 1000 зерен), а также длина колоса, число колосков в колосе, масса зерна с колоса, общая кустистость, масса соломы, высота растения и отношение массы зерна к массе соломы. Достоверность влияния факторов на изменчивость показателей признаков растений определяли с помощью дисперсионного анализа с использованием F-критерия Фишера (Доспехов, 1985). Общую комбинационную способность и специфическую комбинационную способность и соотношение их вариантов определяли по Griffing, согласно статистическим методам генетического анализа (Федин и др., 1980).

Результаты

По результатам исследований в 2014–2015 гг. в F_1 гибридов в системе прямых диаллельных скрещиваний выявлены особенности уровней ОКС и СКС и соотношение их вариантов пяти сортов ячменя ярового и четырех их родительских форм по конкретным количественным признакам растений.

Table 1. Effects of the general combination ability for quantitative traits in F₁ hybrids of spring barley varieties

Variety	Year	Grain weight per plant	Productive tilling capacity	Grains per ear	1000 grain weight	Total tilling capacity	Ear length	Spikelets per ear	Grain weight per ear	Straw weight	Plant height
Vzirets	2014	-0.40*	-0.06	-0.63*	0.29*	0.08	-0.23*	-0.89*	-0.12*	-0.04	-3.20*
	2015	0.20	0.34*	-0.81*	-0.32*	0.29*	-0.37*	-0.32	-0.06	0.06	-1.05
Gerelo	2014	-0.08	0.03	0.83*	0.47*	0.14*	0.60*	0.97*	0.00	-0.40*	4.15*
	2015	0.78*	0.21*	1.13*	0.19*	-0.17	0.88*	1.33*	0.15*	0.57*	2.87*
Zvershennyya	2014	0.65*	0.46*	-0.76*	-2.05*	0.39*	0.13*	-0.10	-0.19*	0.76*	-2.24*
	2015	-0.09	0.21*	-1.39*	-2.01*	0.31*	-0.88*	-1.18*	-0.13*	-0.27	-5.36*
Baderyy	2014	0.21*	0.47*	0.48*	0.45*	0.33*	-0.26*	0.08	-0.16*	0.40*	3.11*
	2015	1.18*	0.55*	0.58*	0.50*	0.41*	0.41*	0.65*	0.10*	0.98*	4.99*
Etiket	2014	0.32*	0.11	0.06	0.76*	-0.06	0.21*	0.32*	0.00	0.27*	2.38*
	2015	0.11	-0.18	-0.68*	0.79*	-0.31*	-0.51*	-0.48	0.00	-0.32*	-0.20
Granal	2014	-0.63*	-0.56*	-0.32*	0.55*	-0.40*	0.15*	-0.37*	0.07*	-0.37*	6.11*
	2015	-0.01	0.06	1.02*	0.60*	-0.11	0.70*	0.67*	-0.03	0.02	4.41*
Modern	2014	-0.47*	-0.25*	-0.16	0.33*	-0.36*	0.29*	-0.39*	0.05*	-0.45*	1.07*
	2015	-0.68*	-0.38*	0.58*	0.46*	-0.17	0.20	-0.31	0.03	-0.58*	-0.63
Vitrazh	2014	0.17*	0.18*	0.78*	0.39*	0.02	0.52*	0.66*	0.14*	-0.24*	-0.55
	2015	-0.44*	-0.17	0.56*	0.43*	0.09	0.41*	0.01	-0.02	0.11	1.72*
Malevnychiy	2014	0.61*	0.13*	0.86*	-0.32*	0.15*	-0.43*	0.88*	0.10*	0.38*	-2.51*
	2015	-0.28*	-0.30*	0.61*	-0.40*	-0.23	-0.10	1.00*	0.01	-0.07	-0.55
Pasadena	2014	-0.31*	-0.20*	-0.83*	-0.49*	-0.20*	-0.60*	-0.97*	0.03*	-0.45*	-4.58*
	2015	-0.45*	-0.03	-1.32*	-0.51*	0.34*	-0.50*	-1.14*	-0.08*	-0.12	-4.32*
Tolar	2014	-0.07	-0.31*	-0.30*	0.21*	-0.09	-0.38*	-0.17	0.07*	0.14	-3.74*
	2015	-0.34*	-0.32*	-0.27	0.26*	-0.44*	-0.25*	-0.24	0.03	-0.38*	-1.90*

* Different from the Vzirets reference at LSD₀₅

Уровень эффектов общей комбинационной способности сортов и их родительских форм ячменя ярового по количественным признакам F₁. У компонентов скрещивания уровень ОКС был неодинаковый (табл. 1). В 2014–2015 гг. сорта ячменя ярового и их родительские формы по соответствующим количественным признакам характеризовались следующими уровнями эффектов ОКС: у сорта Взирац за два года низкие (достоверно отрицательные) эффекты ОКС отмечены по признакам: число зерен с колоса (-0.63 и -0.83 соответственно по годам) и длина колоса (-0.23 и -0.37); средние (недостоверные) – по признаку масса соломы (-0.04 и 0.06); высокие (достоверно положительные) и средние – по признакам: продуктивная кустистость (-0.06 и 0.34) и общая кустистость (0.08 и 0.29).

Сорт Джерело имел высокие (достоверно положительные) эффекты ОКС за два года по признакам: число зерен с колоса (0.83 и 1.13); масса 1000 зерен (0.47 и 0.19); длина колоса (0.60 и 0.88); число колосков в колосе (0.97 и 1.33); отношение массы зерна к массе соломы (0.07 и 0.04) и высота растений (4.15 и 2.87); высокие и средние – по признакам: масса зерна с растения (-0.08 и -0.78); про-

дуктивная кустистость (0.03 и 0.21) и общая кустистость (0.14 и -0.17) и масса зерна с колоса (0.00 и 0.15).

Высокие эффекты ОКС у сорта Звершения установлены по признакам продуктивная (0.46 и -0.21) и общая (0.39 и 0.31) кустистость; низкие – по признакам: число зерен с колоса (-0.76 и -1.39); масса 1000 зерен (-0.25 и -2.01); масса зерна с колоса (-0.19 и -0.13) и высота растений (-2.24 и -5.36); низкие и средние – по признаку число колосков в колосе (-0.10 и -1.18); высокие и средние – по признакам: масса зерна с растения (0.65 и -0.09) и масса соломы (0.76 и -0.27).

Сорт Бадёрый имел высокие эффекты ОКС по признакам: масса зерна с растения (0.21 и 1.18); продуктивная кустистость (0.47 и 0.55); число зерен с колоса (0.48 и 0.58); масса 1000 зерен (0.45 и 0.50); общая кустистость (0.33 и 0.41); масса соломы (0.40 и 0.98) и высота растения (3.11 и 4.99); высокие и средние – по признаку число колосков в колосе (0.08 и 0.65).

У сорта Этикет высокие эффекты ОКС за 2014 и 2015 гг. были по признаку масса 1000 зерен (0.76 и 0.79); средние – по признакам: масса зерна с колоса (0.00 и 0.00) и продуктивная кустистость (0.11 и -0.18); высокие и сред-

ние – по признакам: масса зерна с растения (0.32 и 0.11); число колосков в колосе (0.32 и –0.48); отношение массы зерна к массе соломы (–0.01 и 0.08) и высота растений (2.38 и 0.20); низкие и средние – по признакам: число зерен в колосе (0.06 и –0.68) и общая кустистость (–0.06 и –0.31).

Высокие эффекты ОКС у сорта Гранал отмечены по признакам: масса 1000 зерен (0.55 и 0.60); длина колоса (0.15 и 0.70) и высота растений (6.11 и 4.41); высокие и средние – по признаку масса зерна с колоса (0.07 и 0.03); низкие и средние – по признакам: масса зерна с растения (–0.63 и –0.01); продуктивная кустистость (0.56 и 0.06); число зерен в колосе (–0.32 и 1.02); общая кустистость (–0.40 и –0.11); число колосков в колосе (–0.37 и 0.67) и масса соломы (0.37 и 0.02); средние – по отношению массы зерна к массе соломы (–0.03 и 0.02).

Сорт Модерн высокие эффекты ОКС имел по массе 1000 зерен (0.33 и 0.46); низкие – по признакам: масса зерна с растения (–0.47 и –0.68); продуктивная кустистость (–0.25 и –0.38) и масса соломы (–0.45 и –0.58); высокие и средние – по признакам: число зерен в колосе (–0.16 и 0.58); длина колоса (0.29 и 0.20); масса зерна с колоса (0.05 и 0.03) и высота растений (1.07 и –0.63); низкие и средние – по общей кустистости (–0.36 и –0.17); числу колосков в колосе (–0.39 и –0.31) и отношению массы зерна к массе соломы (0.02 и 0.04).

У сорта Витраж высокие эффекты ОКС отмечены по признакам: число зерен в колосе (0.78 и 0.56); масса 1000 зерен (0.39 и 0.43) и длина колоса (0.52 и 0.41); высокие и средние – по признакам: продуктивная кустистость (0.18 и –0.17); число колосков в колосе (0.66 и 0.01); масса зерна с колоса (0.14 и 0.02) и высота растения (–0.55 и 1.72); средние – по общей кустистости (0.02 и 0.09); низкие и средние – по признаку масса соломы (–0.24 и 0.11).

Высокие эффекты ОКС у сорта Малёвнычий наблюдали по признакам: число зерен с колоса (0.86 и 0.61) и число колосков в колосе (0.88 и 1.00); низкие – по признакам: масса 1000 зерен (–0.32 и –0.40) и высота растения (–2.51 и –0.55); высокие и средние – по признакам: общая кустистость (0.15 и –0.23); масса зерна с колоса (0.10 и 0.01) и масса соломы (0.38 и –0.07); низкие и средние – по признакам: длина колоса (–0.43 и –0.10) и отношение массы зерна к массе соломы (0.02 и 0.06).

Сорт Pasadena низкие эффекты ОКС имел по признакам: масса зерна с растения (–0.31 и –0.45); число зерен с колоса (–0.83 и –1.32); масса 1000 зерен (–0.49 и –0.51); длина колоса (–0.60 и –0.50); число колосков в колосе (–0.97 и –1.14) и высота растений (–4.58 и –4.32); низкие и средние – по признакам: продуктивная кустистость (–0.20 и –0.03); общая кустистость (–0.20 и 0.34); масса соломы (–0.45 и –0.12) и отношение массы зерна к массе соломы (0.01 и –0.04).

У сорта Tolar высокие эффекты ОКС установлены по признаку масса 1000 зерен (0.21 и 0.26); низкие – по признакам: продуктивная кустистость (–0.31 и –0.32); длина колоса (–0.38 и –0.25) и высота растения (–3.74 и –1.90); низкие и средние – по признакам: масса зерна с растения (–0.07 и –0.34); число зерен с колоса (–0.30 и –0.27); общая кустистость (–0.09 и –0.44) и масса соломы (0.14 и –0.38); высокие и средние – по признаку масса зерна с колоса (0.07 и 0.03); средние – по признакам: число колосков в

колосе (–0.17 и –0.24) и отношение массы зерна к массе соломы (–0.03 и 0.01).

Таким образом, за два года (2014 и 2015) высокие эффекты ОКС у сортов отмечены по признакам: продуктивность растения – Бадёрый; число зерен с колоса – Джерело, Бадёрый, Витраж и Малёвнычий; масса 1000 зерен – Джерело, Бадёрый, Этикет, Гранал, Модерн, Витраж и Tolar; длина колоса – Джерело, Гранал и Витраж; число колосков в колосе – Джерело и Малёвнычий; высота растения – Джерело, Бадёрый и Гранал; продуктивная кустистость – Звершения и Бадёрый; общая кустистость – Звершения и Бадёрый; масса соломы – Бадёрый. Эти сорта могут иметь больше генов, которые положительно определяют уровень показателей указанных признаков гибридов (Федин и др., 1980). Лучшими сортами с высокой ОКС по комплексу (большинству) признаков являются сорта Бадёрый (7 признаков) и Джерело (5), в меньшей степени это касается сортов Витраж (3), Гранал (3), Малёвнычий (2), Звершения (2), а также Этикет, Модерн и Tolar (по одному признаку).

Соотношение вариантов ОКС и СКС по количественным признакам растений сортов и их родительских форм в F_1 гибридов. Важное значение в оценке комбинационной способности сортов имеет не только уровень общей и специфической комбинационной способности, но и соотношение их вариантов. В 2014–2015 гг. в системе прямых диаллельных скрещиваний определено соотношение вариантов ОКС и СКС сортов и их родительских форм по количественным признакам растений в F_1 гибридов. Выявлено неодинаковое соотношение значений вариантов ОКС и СКС сортов и их родительских форм в F_1 гибридов.

Превышение значений вариантов ОКС над значениями вариантов СКС отмечено у сорта Звершения по признаку масса 1000 зерен (4.20 и 4.03 – ОКС и 3.78 и 3.84 – СКС в 2014 и 2015 гг. соответственно). По признаку масса 1000 зерен у сорта Звершения преобладают аддитивные эффекты генов, поэтому отбор по фенотипу будет эффективным. По остальным признакам у сорта Звершения и по всем признакам у всех других сортов было превышение значений вариантов СКС над вариантами ОКС, что свидетельствует о преобладании неаддитивных эффектов генов, поэтому отбор будет эффективным по генотипу и его необходимо проводить в поздних поколениях гибридов.

Эффекты СКС сортов по признакам: продуктивность растения, продуктивная кустистость, число зерен с колоса и масса 1000 зерен в F_1 гибридов в системе прямых диаллельных скрещиваний. Определены достоверно высокие эффекты СКС безостых и остистых сортов, в частности по продуктивности (масса зерна) растения в 2014 и 2015 гг. в F_1 гибридных комбинациях (табл. 2) Джерело × Взирец (0.63 и 1.97 соответственно по годам), Звершения × Взирец (1.35 и 1.80), Звершения × Малёвнычий (4.14 и 1.02), Бадёрый × Витраж (1.27 и 1.01), Витраж × Tolar (1.15 и 1.49) и Pasadena × Tolar (0.93 и 1.35); низкие – в гибридных комбинациях Взирец × Витраж (–1.02 и –1.85) и Гранал × Tolar (–1.00 и –1.14).

По признаку продуктивная кустистость высокие эффекты СКС были в F_1 Звершения × Взирец (0.93 и 1.03), Звершения × Малёвнычий (1.49 и 0.82), Бадёрый × Гранал (0.56 и 1.87), Бадёрый × Малёвнычий (0.43 и 0.72), Мо-

Table 2. Effects of the general combination ability for plant performance in the F₁ progeny of direct diallel crosses

Variety	Year	Parental form no.									
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Gerelo	2014	–2.07*	0.71*	–0.33	0.63*	–0.94*	1.65*	0.41*	–0.61*	0.70*	0.72*
	2015	0.31	–1.19*	–0.21	1.97*	0.68	–0.80	–0.84	1.07*	–1.83*	0.25
2. Zvershennyya	2014		0.73*	–1.20*	1.35*	1.38*	0.03	0.23	–1.24*	–1.58*	4.14*
	2015		0.19	3.41*	1.80*	–2.05*	–1.08*	–1.81*	–0.70	0.84	1.02*
3. Etiket	2014			0.72*	–1.72*	1.41*	–1.10*	–0.44*	0.69*	–0.55*	–0.18
	2015			0.46	–0.40	0.30	0.42*	0.24	–0.35	2.39*	–1.73*
4. Baderyy	2014				0.24	0.22	0.96*	1.27*	–0.35	0.76*	–0.37
	2015				1.42*	3.08*	–2.65*	1.01*	0.42	–0.93*	0.40
5. Vzirets	2014					0.53*	–0.18	–1.02*	0.21	2.17*	0.29
	2015					–1.33*	0.09	–1.85*	–0.84	–1.35*	2.49*
6. Granal	2014						0.10	0.36	0.34	–1.00*	–1.53*
	2015						0.54	0.20	–0.68	–1.14*	3.04*
7. Modern	2014							–0.80*	–0.42*	–0.21	0.66*
	2015							0.72	0.59	0.83	–0.99*
8. Vitrazh	2014								0.19	1.15*	0.86*
	2015								–0.15	1.49*	0.32
9. Pasadena	2014									0.93*	1.10*
	2015									1.35*	0.09
10. Tolar	2014										–0.94
	2015										–1.52*
11. Malevnichiy	2014										
	2015										

* Significant at $P < 0.05$.

дерн × Малёвнычий (1.35 и 0.80); низкие – в гибридной комбинации Джерело × Бадёрый (–0.47 и –0.73).

Высокие эффекты СКС по признаку число зерен с колоса были в гибридных комбинациях Джерело × Модерн (3.63 и 2.23), Джерело × Tolar (1.57 и 5.08), Взирец × Pasadena (2.67 и 1.54), Модерн × Pasadena (2.04 и 2.88), низкие – Взирец × Tolar (–1.98 и –2.13) и Pasadena × Малёвнычий (–2.93 и –2.30).

По признаку масса 1000 зерен с высокими эффектами ОКС (табл. 3) выделены гибридные комбинации Джерело × Звершения (3.59 и 3.09), Джерело × Взирец (2.03 и 1.30), Звершения × Этикет (1.30 и 1.44), Звершения × Гранал (0.71 и 0.98), Звершения × Tolar (1.00 и 1.27), Звершения × Малёвнычий (0.68 и 0.63), Этикет × Гранал (0.76 и 0.93), Этикет × Витраж (1.41 и 0.95), Этикет × Pasadena (1.94 и 1.98), Этикет × Малёвнычий (2.02 и 1.68), Бадёрый × Взирец (1.15 и 0.89), Бадёрый × Витраж (1.97 и 1.98), Бадёрый × Pasadena (2.05 и 2.12), Бадёрый × Tolar (2.65 и 2.66), Взирец × Гранал (2.86 и 3.04), Взирец × Модерн (0.37 и 0.18), Взирец × Tolar (2.34 и 2.43), Взирец × Малёвнычий (0.67 и 0.79), Гранал × Витраж (1.13 и 1.58), Гранал × Pasadena (0.21 и 0.37), Модерн × Витраж (0.54 и 0.87), Модерн × Pasadena (1.42 и 1.61), Модерн × Tolar

(0.82 и 0.80), Модерн × Малёвнычий (2.00 и 1.90), Витраж × Pasadena (0.82 и 0.54), Витраж × Tolar (0.67 и 0.13), Витраж × Малёвнычий (0.89 и 0.58), Pasadena × Малёвнычий (0.57 и 0.57); низкие – Джерело × Этикет (–0.37 и –0.41), Джерело × Гранал (–1.35 и –1.77), Джерело × Pasadena (–1.16 и –1.51), Звершения × Взирец (–0.40 и –0.25), Звершения × Модерн (–3.97 и –4.24), Звершения × Витраж (–1.33 и –1.35), Звершения × Pasadena (–0.85 и –2.02), Этикет × Взирец (–3.26 и –3.15), Этикет × Tolar (–0.71 и –0.43), Взирец × Витраж (–3.79 и 4.04), Взирец × Pasadena (–2.36 и –1.70), Гранал × Tolar (–0.94 и –1.29), Pasadena × Tolar (–0.15 и –0.43), Tolar × Малёвнычий (–0.63 и –0.34).

Обсуждение

Безостые сорта Модерн (линия 04-476, отбор в 2004 г.) и Витраж (линия 06-2168, отбор в 2006 г.) созданы в результате скрещиваний в разные годы одних и тех же сортов (оистого Звершения и безостого Гранал).

В наших исследованиях в скрещиваниях по прямой диаллельной схеме использованы не только безостые сорта Модерн и Витраж, но также их исходные сорта. Поэтому интересно сравнить их комбинационную способность по ОКС в F₁ (см. табл. 1).

Table 3. Effects of the general combination ability for 1000 grain weight in the F₁ progeny of direct diallel crosses

Variety	Year	Parental form no.									
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Gerelo	2014	3.59*	-0.37*	0.29*	2.03*	-1.35*	0.04	-1.29*	-1.16*	-0.46*	0.11
	2015	3.09*	-0.41*	0.13	1.30*	-1.77*	-0.03	-1.15*	-1.51*	-0.02	0.38*
2. Zvershennyya	2014		1.30*	-0.44*	-0.40*	0.71*	-3.97*	-1.33*	-0.85*	1.00*	0.68*
	2015		1.44*	-0.02	-0.25*	0.98*	-4.24*	-1.35*	-2.02*	1.27*	0.63*
3. Etiket	2014			-0.05	-3.26*	0.76*	-0.03	1.41*	1.94*	-0.71*	2.02*
	2015			-0.12	-3.15*	0.93*	-0.24*	0.95*	1.98*	-0.43*	1.68*
4. Baderyy	2014				1.15*	-0.79*	-1.47*	1.97*	2.05*	2.65*	-3.67*
	2015				0.89*	-0.24*	-1.85*	1.98*	2.12*	2.66*	-3.79*
5. Vzirets	2014					2.86*	0.37*	-3.79*	-2.36*	2.34*	0.67*
	2015					3.04*	0.18*	-4.04*	-1.70*	2.43*	0.79*
6. Granal	2014						-0.06	1.13*	0.21*	-0.94*	0.14*
	2015						-0.60*	1.58*	0.37*	-1.29*	-0.04
7. Modern	2014							0.54*	1.42*	0.82*	2.00*
	2015							0.87*	1.61*	0.80*	1.90*
8. Vitrazh	2014								0.82*	0.67*	0.89*
	2015								0.54*	0.13	0.58*
9. Pasadena	2014									-0.15*	0.57*
	2015									-0.43*	0.57*
10. Tolar	2014										-0.63*
	2015										-0.34*
11. Malevnychiy	2014										
	2015										

* Significant at $P < 0.05$.

По признаку масса зерна с растения по двум годам эффекты ОКС безостого сорта Модерн были низкие (Звершения – высокие и средние соответственно по годам), Гранал – низкие и средние, а Витраж – достоверно неоднозначные).

Высокие и средние эффекты ОКС по продуктивной кустиности наблюдали у сорта Витраж (Звершения – высокие, Гранал – низкие и средние, у сорта Модерн – низкие).

По общей кустиности средние эффекты ОКС отмечены у сорта Витраж (Звершения – высокие, Гранал – низкие и средние, Модерн – низкие и средние).

Высокие эффекты ОКС по числу зерен в колосе были у сорта Витраж (Звершения – низкие, Гранал – низкие и средние, у сорта Модерн – высокие и средние), т.е. у сортов Витраж и Модерн выше, чем у компонентов скрещивания.

По массе 1000 зерен высокие эффекты ОКС имели Модерн и Витраж, как и их отцовский сорт Гранал (Звершения – низкие).

Высокие эффекты ОКС по длине колоса были у сорта Витраж, так же как у его отцовского сорта Гранал (Звершения – неоднозначные, Модерн – высокие и средние).

По числу колосков в колосе высокие и средние эффекты ОКС были у сорта Витраж, т.е. выше, чем у компонентов скрещивания (Звершения – низкие и средние, Гранал – низкие и средние), а у сорта Модерн – низкие и средние, как и у компонентов скрещивания.

Высокие и средние эффекты ОКС по массе зерна с колоса имели и Модерн, и Витраж, как и их отцовский сорт Гранал (Звершения – низкие, Гранал – высокие и средние).

По массе соломы низкие эффекты ОКС имел сорт Модерн (Звершения – высокие и средние, Гранал – низкие и средние, а Витраж – низкие и средние, как и Гранал).

Низкие и средние эффекты ОКС по отношению массы зерна к массе соломы имел сорт Модерн (Звершения – неоднозначные, Гранал – средние, Витраж – неоднозначные).

По высоте растений высокие и средние эффекты ОКС имели и Модерн, и Витраж (Звершения – низкие, Гранал – высокие).

Таким образом, уровни эффектов ОКС безостого сорта Модерн, полученного от гибридной комбинации Звершения × Гранал, по признакам: масса зерна с растения, общая кустиность, масса 1000 зерен, длина колоса, масса зерна с колоса, масса соломы, высота растений были как у от-

цовского безостого сорта Гранал, а по признаку число колосков в колосе – как у Гранала и Звершения.

У безостого сорта Витраж, полученного от той же гибридной комбинации, уровни эффектов ОКС в F_1 были почти такими же, как у сорта Гранал, по четырем признакам (масса 1000 зерен, длина колоса, масса зерна с колоса и масса соломы) и почти такими, как у сорта Звершения, по признаку продуктивная кустистость.

Таким образом, безостый сорт Модерн, полученный от гибридной комбинации Звершения (остистый) × Гранал (безостый), имел, за некоторым исключением, эффекты общей комбинационной способности, почти как безостый отцовский сорт Гранал, но при этом сорт Модерн – по восьми, а сорт Витраж – по четырем признакам.

По признаку число зерен в колосе уровни эффектов ОКС сортов Модерн и Витраж были выше, чем у их исходных сортов Звершения и Гранал. У сорта Витраж они выше, чем у последних, по признаку число колосков в колосе, а у сорта Модерн – подобные. Это может быть результатом повышения уровня признаков при благоприятном сочетании наследственных факторов (Федин и др., 1980; Potla et al., 2013).

Сорт Малёвничий получен в результате гибридной комбинации Pasadena × Tolar. В 2014 и 2015 гг. у сорта Малёвничий отмечены более высокие эффекты ОКС, чем у исходных сортов, по признакам: число зерен с колоса (Pasadena – низкие, Tolar – низкие и средние) и число колосков в колосе (Pasadena – низкие, Tolar – средние).

Высокие и средние эффекты ОКС сорта Малёвничий были по двум годам выше, чем у исходных сортов, по признакам: общая кустистость (Pasadena – низкие и средние, Tolar – низкие и средние), масса зерна с колоса (Pasadena – неоднозначные, Tolar – средние) и масса соломы (Pasadena – низкие и средние, Tolar – низкие и средние).

Низкие и средние эффекты ОКС сорта Малёвничий и почти такие, как у исходных сортов, получены по признакам: длина колоса (Pasadena – низкие, Tolar – низкие); отношение массы зерна к массе соломы (Pasadena – низкие и средние, Tolar – средние).

Низкие эффекты ОКС у сорта Малёвничий были по признаку масса 1000 зерен, как и у исходных сортов (Pasadena – низкие, Tolar – высокие), и по признаку высота растений (Pasadena – низкие, Tolar – низкие).

Неоднозначные по годам эффекты ОКС сорта Малёвничий отмечены по признакам: масса зерна с растения (Pasadena – низкие, Tolar – низкие и средние) и продуктивная кустистость (Pasadena – низкие и средние, Tolar – низкие).

Таким образом, по признакам: длина колоса, отношение массы зерна к массе соломы, высота растений уровни эффектов ОКС сорта Малёвничий были почти такими же, как у исходных сортов, а по признаку масса 1000 зерен – как у исходного сорта Pasadena. По признакам: число зерен в колосе, число колосков в колосе, общая кустистость, масса зерна с колоса и масса соломы уровни эффектов ОКС сорта Малёвничий превышали показатели родителей сорта.

Результаты исследования ОКС при сочетании геномов в результате гибридизации показывают, что как созданные сорта, так и их исходные формы имеют высокую или низкую комбинационную способность по конкретным

признакам, которая зависит от генетических особенностей сортов. Об этом сообщено в ряде исследований (Sprague, Tatum, 1942; Турбин и др., 1974; Singh et al., 2007; Pawar, Singh, 2013; Potla et al., 2013; Singh et al., 2013; Milomirka et al., 2014; Pesaraklu et al., 2016).

Нами также установлено, что уровень комбинационной способности компонентов скрещивания может по-разному проявиться у сортов, созданных на их основе, возможно, в результате сочетания различных наследственных факторов.

Отмечено превышение вариантов ОКС над вариансами СКС по признаку масса 1000 зерен, что указывает на преобладание аддитивных эффектов генов в определении уровня признака, следовательно, отбор по фенотипу будет эффективным в ранних поколениях гибридных популяций. О преобладании аддитивных эффектов генов по компонентам продуктивности и неаддитивных эффектов генов по урожайности говорится также в работе (Singh et al., 2007).

Определение высоких эффектов СКС по продуктивности растений и ее структурным элементам позволяет выделить комбинации скрещивания с различным уровнем признаков, что предусматривает возможность эффективных отборов в потомствах гибридов (Pesaraklu et al., 2016).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Dontsov D.P. Analysis of the inheritance of the *plant height* trait in hybrids of the first and second generations of spring barley upon the creation of dwarf varieties for malting industry. *Elektronnyy nauchnyy zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU*. 2011; 70(06):1-11. (in Russian)
- Dospekhov B.A. *Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezultatov isledovaniy)* [Methods of Field Experiments (with the Fundamentals of Statistical Processing of Study Results)]. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)
- Fedin M.A., Silis D.Ya., Smiryaev A.V. *Statisticheskie metody geneticheskogo analiza* [Statistical Methods of Genetic Analysis]. Moscow: Kolos Publ., 1980.
- Gudzenko V.M. Combining ability in terms of quantitative characteristics of new spring barley accessions differing by eco-geographical origin in the Right-Bank Forest-Steppe of Ukraine. *Naukovi dopovidi NUBiP = Scientific Reports of NULES of Ukraine*. 2012; 8(30). (in Ukrainian)
- Gupta S.K., Singh D. Hybrid performance for yield and malt quality in barley using cytoplasmic male sterile lines. *Cereal Res. Commun.* 1999;27(4):389-394.
- Milomirka R.M., Dragan S.D., Desimir S.K., Aleksandar S.P., Snezana T.T. Combining abilities for spike traits in a diallel cross of barley. *J. Central Eur. Agric.* 2014;15(1):108-116. DOI 10.5513/JCEA01/15.1.1419.
- Pawar K.K., Singh A.K. Combining ability analysis for grain yield and its attributing traits in barley. *Int. J. Agric. Sc. Vet. Med.* 2013;1(2): 83-87.
- Pesaraklu S., Soltanloo H., Ramezanpour S.S., Kalate Arabi M., Nasrollah Nejad Ghomi A.A. An estimation of the combining ability of barley genotypes and heterosis for some quantitative traits. *Iran Agric. Res.* 2016;35(1):73-80.
- Polok K., Szarejko I., Maluszynski M. Barley mutant heterosis and fixation of 'F₁-performance' in doubled haploid lines. *Plant Breed.* 1997;116:133-140.
- Potla K.R., Bornare S.S., Prasad L.C., Prasad R., Madakemohekar A.H. Study of heterosis and combining ability for yield and yield contrib-

- uting traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). Int. Quarterly J. Life Sci. 2013;8(4):1231-1235.
- Savchenko V.K. Geneticheskii analiz v setevykh probnykh skreshchivaniyakh [Genetic Analysis in Network Test Crosses]. Minsk: Nauka i Tekhnika Publ., 1984. (in Russian)
- Shahnejat-Bushehri A.A., Torabi S., Omidi M., Ghannadha M.R. Comparison of genetic and morphological distance with heterosis with RAPD markers in hybrids of barley. Int. J. Agric. Biol. 2005;7(4): 592-595.
- Singh B., Sharma A., Joshi N., Mittal P., Singh S. Combining ability analysis for grain yield and its components in malt barley (*Hordeum vulgare* L.). Ind. J. Agric. Sci. 2013;83(1):96-98.
- Singh S., Dhindsa G.S., Sharma A., Singh P. Combining ability for grain yield and its components in barley (*Hordeum vulgare* L.). Crop Improv. 2007;34:128-132.
- Soylu S. A study on hybrid vigor of some quantitative traits in barley crosses. Agr. Med. 2006;136:30-36.
- Sprague G.F., Tatum L.A. Specific combining in single crosses of corn. J. Am. Soc. Agron. 1942;34:923-932.
- Turbin N.V., Khotyleva L.V., Tarutina L.A. Diallelnyi analiz v selektsii rasteniy [Diallel Analysis in Plant Breeding]. Minsk: Nauka i Tekhnika Publ., 1974. (in Russian)
- Varlakhov M.D., Makogonov E.I., Vasyakin N.I. Proyavlenie kombinatsionnoy sposobnosti sortov gorokha v ekologicheskikh ispytaniyakh [Manifestation of the combining ability in pea varieties in environmental trials]. Seleksiya zernobobovykh kultur, grechikhi i prosa na vysokuyu produktivnost i kachestvo [Breeding of Legumes, Buckwheat and Millet for High Performance and Quality]. Orel: VNIIZBK Publ., 1977. (in Russian)
- Vashchenko V.V. Genetic control of grain number per spike in spring barley varieties. Seleksiya i semenovodstvo = Breeding and Seed Industry. 2009;97:189-195. (in Russian)
- Vashchenko V.V., Shevchenko O.O. Estimation of the combining ability for quantitative traits in spring barley varieties in the Northern Steppe of Ukraine. Visnyk Poltavskoi derzhavnoi agrarnoi akademii = News of Poltava State Agrarian Academy. 2014;2:23-25. (in Ukrainian)
- Vasyl'kivc'kyi S.P., Gydzenko V.M. Combination ability, inheritance, and transgressive variability in spring barley hybrids with regard to grain weight per plant. Agrobiologiya: zbirnyk naukovykh robit [Agrobiology: Collection of scientific papers]. Bila Tserkva, 2013; 10(100):191. (in Ukrainian)
- Zhang X., Lv L., Lv Ch., Guo B., Xu R. Combining ability of different agronomic traits and yield components in hybrid barley. PloS ONE. 2015;10(6):1-9. e0126828. DOI 10.1371/journal.pone.0126828.
- Zvyagintseva A.N., Petrenkova V.P. Combining ability of starting spring barley accessions in terms of a complex of biological features in a diallel cross system. Seleksiya i nasinnitstvo = Breeding and Seed Industry. 2012;102:30-35. (in Ukrainian)



Маркер-контролируемое получение и производство форм пшеницы с повышенным уровнем биофлавоноидов: оценка продукции для обоснования значимости направления

Е.К. Хлесткина^{1, 2}✉, Н.И. Усенко², Е.И. Гордеева¹, О.И. Стабровская³, И.Б. Шарфунова³, Ю.С. Отмахова^{2, 4}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет), Кемерово, Россия

⁴ Институт экономики и организации промышленного производства Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

В современных условиях в структуре мирового товарного предложения на продовольственном рынке необходимо отметить появление широкой группы новых высокотехнологичных продуктов специализированного и функционального питания с высокой долей добавленной стоимости. На создание функциональных пищевых продуктов ориентировано одно из актуальных направлений селекции растений – создание сортов с повышенным содержанием флавоноидов (растительных соединений, способных оказывать положительное действие на здоровье человека). Однако в настоящее время существует значительный разрыв между фундаментальными исследованиями роли флавоноидов и генетического контроля их синтеза, с одной стороны, и собственно разработкой продукции из пшеницы с новыми свойствами и изучением пищевой ценности готовой для потребления хлебобулочной продукции, с другой. В настоящей работе были получены и исследованы изделия из пшеницы, синтезирующей биофлавоноидные пигменты антоцианы в перикарпе зерновки. Зерно такой пшеницы имеет темно-фиолетовый цвет. Контролем служила краснозерная пшеница. Две изученные линии имеют практически полное сходство, за исключением небольшого участка хромосомы 2A, в котором содержится ген-регулятор биосинтеза антоцианов *Pp3/TaMyc1*. Использование такой точной модели позволило связать наблюдаемые различия именно с уровнем синтеза антоцианов. Важной задачей была оценка устойчивости антоцианов к технологической обработке, поэтому содержание антоцианов исследовалось не только в готовых изделиях, но и в смесях муки и отрубей, используемых для выпечки, и отдельно в отрубях. В результате выявлены значительные отличия образцов, полученных из фиолетового зерна, по сравнению с контролем, включая образцы изделий, прошедших полный цикл технологической обработки, в том числе выпечку при повышенной температуре. Для экстракции антоцианов были смоделированы условия, наиболее близкие к условиям в процессе усвоения пищи в организме человека, с тем чтобы оценить количество доступных при употреблении в пищу антоцианов. Показано, что при приеме в пищу 100 г хлебцев докторских, изготовленных из муки с добавлением отрубей фиолетового зерна пшеницы, употребление антоцианов достигает 1.03 мг. В составе 100 г отрубей организм получит до 3.32 г антоцианов. Параллельно с оценкой содержания антоцианов во всех образцах с помощью амперометрического метода была измерена массовая доля антиоксидантов. Анализ показал, что наиболее высокой антиоксидантной активностью отличаются отруби,

Evaluation of wheat products with high flavonoid content: justification of importance of marker-assisted development and production of flavonoid-rich wheat cultivars

E.K. Khlestkina^{1, 2}✉, N.I. Usenko², E.I. Gordeeva¹, O.I. Stabrovskaya³, I.B. Sharfunova³, Y.S. Otmakhova^{2, 4}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Kemerovo Institute of Food Science and Technology, Kemerovo, Russia

⁴ Institute of Economics and Industrial Engineering SB RAS, Novosibirsk, Russia

In the structure of the global commodity supply in the food market in modern conditions it is necessary to note the emergence of a broad group of new high-tech products, and specialized functional food with high value added. The creation of varieties with a high content of flavonoids (plant compounds that can have a positive effect on human health) is one of the important directions of plant breeding oriented on the functional foods development. Currently, however, there is a significant gap between the well-studied role of flavonoids and the genetic control of their synthesis, on the one hand, and development of the actual product of wheat with new properties, evaluation of the nutritional value of the end-use bakery products for consumption, on the other hand. In the present study we produced and investigated bakery products from wheat synthesizing bioflavonoid pigments anthocyanins in the grain pericarp. The grains of this wheat have dark purple color. Red-grained bread wheat was a control. These two wheat lines have almost similar genomes with the exception of a small part of chromosome 2A, which contains the *Pp3/TaMyc1* gene regulating anthocyanin biosynthesis. The use of such an accurate model has allowed relating the observed differences precisely with anthocyanin biosynthesis. The important task was to evaluate the resistance of anthocyanins to the baking process. Therefore anthocyanin content was evaluated not only in the end-use product, but also in mixtures of flour and bran used for baking and separately in the bran. As a result, significant differences were detected in samples obtained from purple grains, compared with the control including

самой низкой – мука. Добавление отрубей к муке повышает антиоксидантную активность, процесс технологической обработки также увеличивает антиоксидантную активность. Вклад антоцианов в повышение антиоксидантной активности не отмечен. По хлебопекарным и органолептическим свойствам продукции фиолетовая пшеница не уступала, а в отдельных случаях была лучше контрольной линии. Установлено, что присутствие антоцианов увеличивает срок хранения хлебобулочных изделий и устойчивость их в провокационных условиях, способствующих развитию плесневых грибов. Полученные результаты в сочетании с известными данными о благотворном влиянии антоцианов на здоровье могут служить основанием для предложения включить продукцию из зерна пшеницы, окрашенного антоцианами, в перечень продуктов для диетического питания. Маркер-контролируемое создание и производство форм пшеницы с повышенным уровнем биофлавоноидов в зерне можно предложить как новое направление для расширения внутреннего и экспортного потенциала рынка зерна в связи с новыми возможностями получения продукции повышенной пищевой ценности.

Ключевые слова: антоцианы; биофлавоноиды; внутренний и экспортный потенциал; гены; ДНК-маркеры; зерно; маркер-ориентированная селекция; мягкая пшеница; хлеб; хлебопекарные свойства; пищевая ценность; функциональные продукты питания.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хлесткина Е.К., Усенко Н.И., Гордеева Е.И., Стабровская О.И., Шарфунова И.Б., Отмахова Ю.С. Маркер-контролируемое получение и производство форм пшеницы с повышенным уровнем биофлавоноидов: оценка продукции для обоснования значимости направления. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):545-553. DOI 10.18699/VJ17.25-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khlestkina E.K., Usenko N.I., Gordeeva E.I., Stabrovskaya O.I., Sharfunova I.B., Otmakhova Y.S. Evaluation of wheat products with high flavonoid content: justification of importance of marker-assisted development and production of flavonoid-rich wheat cultivars. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):545-553. DOI 10.18699/VJ17.25-o (in Russian)

the products that had passed a full processing cycle, including baking at elevated temperature. For the extraction of anthocyanins conditions were simulated most similar to those in the process of digestion in the stomach, in order to assess the amount of assimilable anthocyanins. By our estimates one can get up to 1.03 mg of assimilable anthocyanins with 100 g of whole-grained bread produced from anthocyanin-colored grains. With 100 g of bran, the body will get up to 3.32 g of anthocyanins. In parallel with the evaluation of the anthocyanins content in all samples, the mass fraction of antioxidants was measured by using the amperometric method. The highest antioxidant capacity was shown for bran, while the least one was demonstrated for flour. Adding bran to the flour as well as the backing process increased the antioxidant capacity of wheat products. The contribution of anthocyanins to increased antioxidant capacity is not significant. It was shown that bread-making quality and organoleptic properties of bakery products made from anthocyanin-colored grains did not concede, or in some cases were higher than the corresponding properties of products obtained from control NIL grains. It was found that the presence of anthocyanin increases the shelf life of bakery products and their resistance to molding in provocative conditions. These results, combined with the known data about the beneficial health effects of anthocyanins, suggest that wheat bakery products made from anthocyanin-rich grains can be included to the list for dietary food. Marker-assisted selection accelerating the creation of new forms of crops with a high level of flavonoids can be proposed as a new direction for the expansion of domestic and export grain market potential due to the new possibilities of obtaining products of increased nutritional value and making a good profit.

Key words: anthocyanins; bioflavonoids; domestic and export potential; genes; DNA markers; grain; marker-assisted selection; common wheat; bread; baking properties; nutritional value; functional food.

В структуре мирового товарного предложения продовольственных товаров в современных условиях необходимо отметить появление широкой группы новых высокотехнологичных продуктов специализированного и функционального питания¹ с высокой долей добавленной стоимости. Мировой рынок функциональных продуктов интенсивно развивается, ежегодно увеличиваясь на 15–20 %, что отражает современный тренд – стремление населения к полезному и сбалансированному питанию. Составы продуктов функционального питания содержат повышенное (или резко сниженное) по сравнению с обычными пищевыми компонентами количество основных

питательных веществ, витаминов, энергодающих субстратов, антиоксидантов, адаптогенов. Их форма выпуска ориентирована на замену (или дополнение) традиционных продуктов или готовых блюд (Рынок функциональных продуктов питания, 2014). Одним из важнейших факторов, во многом определяющим возникновение новых точек роста в сфере функциональных продуктов питания, является наличие научно-технологических заделов.

На создание функциональных пищевых продуктов ориентировано такое актуальное направление селекции растений, как получение сортов с повышенным содержанием каротиноидов и флавоноидов (Ficco et al., 2014; Adzhieva et al., 2016).

Биофлавоноиды – растительные соединения фенольной природы, которые синтезируются в различных частях растений, в том числе в зерне злаков – в эндосперме, алевроновом слое, семенной коже и перикарпе (Ficco et al., 2014; Khlestkina et al., 2015). При употреблении в составе растительной пищи флавоноидные соединения

¹ Функциональный пищевой продукт – это продукт, предназначенный для систематического употребления в составе пищевых рационов всеми возрастными группами здорового населения, обладающий научно обоснованными и подтвержденными свойствами, снижающий риск развития заболеваний, связанных с питанием, предотвращающий или восполняющий имеющийся в организме человека дефицит пищевых веществ, сохраняющий и улучшающий здоровье за счет наличия в его составе функциональных пищевых ингредиентов (ГОСТ Р 52349-2005).

способны оказывать положительное действие на здоровье человека. Например, флавоноидные пигменты антоцианы благодаря супрессии генов, вовлеченных в синтез жирных кислот и триацилглицерола, а также ингибированию ферментов панкреатической амилазы и кишечной α -глюкозидазы, оказывают гипогликемический эффект (Tsuda et al., 2003; Tadera et al., 2006; Shobana et al., 2009). Антоцианы и другие флавоноиды могут быть полезны для профилактики целого ряда заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых (Howard, Kritchevsky, 1997; Lila, 2004; Cassidy et al., 2011). Исследования показывают, что опрошенные лица, получившие информацию о положительном влиянии антоцианов на здоровье, проявляют заинтересованность в приобретении зерновых продуктов, содержащих антоцианы, по цене, превышающей таковую на аналогичные продукты, не имеющих в своем составе данных соединений (Bruschi et al., 2015).

В настоящее время в Государственном реестре не зарегистрированы сорта мягкой пшеницы, из зерна которых могут производиться продукты, содержащие антоцианы (<http://reestr.gossort.com/>; доступ 30.12.2016). Для ускоренного введения в современные сорта пшеницы генов, контролирующих антоциановую окраску перикарпа зерновки, известны диагностические ДНК-маркеры, с использованием которых можно вдвое ускорить процесс отбора по сравнению с отбором на основе оценки окраски зерна (Gordeeva et al., 2015). Тем не менее для обоснования значимости данного направления селекции мягкой пшеницы необходимы дополнительные исследования. Такая необходимость обусловлена тем, что наблюдается значительный разрыв между фундаментальными исследованиями роли флавоноидов и генетического контроля их синтеза у зерновых, с одной стороны, и собственно разработкой продукции из пшеницы с новыми свойствами и анализом пищевой ценности готовых для потребления хлебобулочных изделий, с другой. Это последнее звено всей исследовательской цепочки крайне важно для обоснования ценности получения и производства новых форм пшеницы, в частности сортов, в зерне которых содержатся антоцианы, как новой точки роста для расширения внутреннего и экспортного потенциала. Важной задачей являются разработка рецептур для расширения разнообразия пищевых продуктов, содержащих пигментированные отруби пшеницы, а также анализ устойчивости антоцианов к факторам технологической обработки, таким как длительность и температура выпечки.

Цель настоящего исследования – обоснование значимости маркер-контролируемого создания и производства форм пшеницы с повышенным уровнем биофлавоноидов для повышения пищевой ценности продукции, полученной из пшеницы с новыми свойствами, расширяющих возможности формирования внутреннего и экспортного потенциала российского рынка зерна.

В связи с этим в работе поставлены задачи: получение продукции из пшеницы, синтезирующей биофлавоноидные пигменты антоцианы; исследование хлебопекарных и органолептических свойств данной продукции; изучение устойчивости антоцианов к технологической обработке; анализ антиоксидантной активности в образцах, тестируемых на содержание антоцианов.

Материалы и методы

Растительный материал. Для точной сравнительной оценки использовали почти изогенные линии пшеницы с неокрашенным (*i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P*) и окрашенным (фиолетовым) (*i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P*) перикарпом зерновки, различающиеся небольшим участком хромосомы 2A (между маркерами *Xgwm339* и *Xgwm817*), содержащим ген-регулятор биосинтеза антоцианов *Pp3/TaMyc1* (Tereshchenko et al., 2012; Shoeva et al., 2014; Gordeeva et al., 2015). Следует отметить, что обе линии созданы на основе краснозерного сорта мягкой пшеницы Саратовская 29, т.е. содержат проантоцианидины в семенной коже. Далее в тексте статьи линии обозначены как краснозерная, КЗ (*i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P*) и линия с фиолетовым зерном, ФЗ (*i:S29Pp-A1Pp-D1Pp3^P*). Линии яровой мягкой пшеницы КЗ и ФЗ выращивали в Новосибирской области на опытном участке селекционно-генетического комплекса ИЦиГ СО РАН (55°02' с. ш., 82°56' в. д.) летом 2016 г.

Оценка технологических свойств муки и качества конечных продуктов. При разработке продукции из пшеницы, синтезирующей биофлавоноидные пигменты антоцианы, была использована мука из зерна линий КЗ и ФЗ, а также отруби, полученные при помоле этих образцов зерна. Для сравнения в качестве контроля использовали пробу муки пшеничной хлебопекарной высшего сорта (ГОСТ Р 52189-2003).

Для оценки качества муки применяли стандартные методы (ГОСТ 27676-88; ГОСТ 27839-2013): влажность определяли ускоренным методом высушивания в сушильном шкафу, кислотность – методом кислотно-основного титрования водно-мучной болтушки; белизну – на приборе белизномере РЗ-ТБМС-М; число падения – на приборе ЧП-1; массовую долю сырой клейковины получали отмытием водой с последующим взвешиванием; качество сырой клейковины характеризовали по цвету, растяжимости, упруго-эластичным свойствам (на приборе ИДК-3М), и по ее гидратационной способности; газообразующую способность муки – волюмометрическим методом на приборе Яго-Островского.

Оценку свойств проводили как для свежесмолотой муки, полученной помолом зерна линий КЗ и ФЗ, так и муки, подвергшейся созреванию в течение одного месяца, а также муки пшеничной хлебопекарной высшего сорта (ГОСТ Р 52189-2003).

Для оценки технологических свойств используемой муки и качества хлеба из нее применяли метод пробной лабораторной выпечки по методике (Пучкова, 2004). Тесто было приготовлено безопарным способом по рецептурам, разработанным в соответствии с целями исследований. Нормативные рецептуры продукции массового ассортимента и диетических изделий модифицировали путем использования муки, полученной помолом зерна линий ФЗ и КЗ. В качестве диетического изделия выбраны пользующиеся спросом у потребителей хлебцы докторские с отрубями. Согласно рецептуре изготовления хлеба пшеничного, на 100 г муки использовали: дрожжей прессованных хлебопекарных – 3 г, соли поваренной пищевой – 1.5 г. Технологические параметры приготовления проб предусматривали продолжительность: брожения – 190 мин,

Table 1. Bakery products produced and examined in the current study

Product name	Flour			Bran	
	High quality flour, GOST 52189-2003	Flour from the control (red-grained) wheat line	Flour from the purple-grained line	Bran from the control (red-grained) wheat line	Bran from the purple-grained line
Bread I	–	+	–	–	–
Bread II	–	–	+	–	–
Bread III (Crispbread)	+	–	–	+	–
Bread IV (Crispbread)	+	–	–	–	+
Bread V (Crispbread)	–	+	–	+	–
Bread VI (Crispbread)	–	–	+	–	+

расстойки – 45 мин, выпечки формового хлеба – 25 мин, подового – 15 мин.

Хлебцы докторские изготавливали по рецептуре: мука пшеничная – 83 г; дрожжи прессованные хлебопекарные – 2.5 г; соль поваренная пищевая – 1.3 г; отруби – 17 г; сахар-песок – 5 г. Технологические параметры: продолжительность брожения – 190 мин, расстойки – 40 мин, выпечки – 20 мин. Варианты изделий перечислены в табл. 1.

Для объективной оценки органолептических показателей качества полученных изделий использован метод 20-балльной оценки (Романов и др., 2014), включающий оценку таких показателей, как состояние поверхности, цвет корки, состояние мякиша, цвет мякиша, характер пористости, вкус, запах, разжевываемость.

Анализ содержания антоцианов и массовой доли антиоксидантов проводили в муке, отрубях, смесях муки и отрубей (в такой же пропорции, как для приготовления теста) и готовых изделий (в подсушенном виде). При интерпретации результатов в расчет брали соотношения массы муки с отрубями, готового изделия и подсушенного изделия (для хлеба – 1 : 1.45 : 0.95; хлебцев докторских – 1 : 1.4 : 1.04 соответственно). Для приготовления экстрактов каждый образец изделий был приготовлен в трех повторностях, а для каждой повторности проведено три последовательных измерения. Для анализа использовали среднее значение из трех последовательных измерений. Значимость различий между образцами по изученным параметрам оценивали с помощью критерия Манна–Уитни.

Экстракты получали путем добавления к 1 г измельченного образца 10 мл 1 % водного раствора HCl, перемешивания и инкубации в течение одного часа при 37 °C (для моделирования условий, приближенных к таковым при усвоении пищи в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ)). Для анализа использовали супернатант, полученный путем центрифугирования в течение 15 мин при 4 °C на скорости 5000 об/мин. Содержание антоцианов оценивали при использовании спектрофотометра SmartSpec™ Plus (BioRad, www.bio-rad.com). Перерасчет из OD530-700 в массовую концентрацию осуществляли по методу, описанному ранее (Abdel-Aal, Hucl, 1999) с использованием цианидин-3-глюкозида в качестве стандарта. Оценку антиоксидантной активности проводили с использованием анализатора антиоксидантной активности Близар (Интерлаб, Россия), согласно инструкции производителя. В качестве стандартного вещества использовали галловую кислоту (мг/л).

Результаты

Анализ показателей, характеризующих технологические и хлебопекарные свойства муки, позволил установить, что основные свойства муки в процессе хранения существенно не изменились. Результаты определения показателей качества муки представлены в табл. 2.

Массовая доля сырой клейковины муки из зерна линий КЗ и ФЗ практически была одинаковой и очень высокой, что считается определяющим фактором в оценке хлебопекарных свойств исследуемой муки.

В то же время клейковина по качеству была слабой и длинной по растяжимости, но имела хорошую гидратационную способность.

На основании показателя «число падения» выявлены низкая автолитическая активность муки из зерна линий КЗ и ФЗ и пониженная газообразующая способность, что может быть обусловлено низкой активностью ее собственных ферментов и/или состоянием крахмала.

Комплексный анализ свойств муки позволил прогнозировать хорошее качество хлебобулочных изделий, но окончательное подтверждение было получено на основе показателей качества изделий после проведения пробных выпечек и подбора рецептур. Для отрубей из зерна линий КЗ и ФЗ были определены их влажность и кислотность. Влажность отрубей составляла в среднем 15.5 % для обеих проб и снизилась при хранении в течение месяца на 2 %. Кислотность пробы отрубей из зерна линии КЗ составляла в среднем 10 градусов, а из зерна линии ФЗ – 15.5 градусов. В процессе хранения (один месяц) кислотность отрубей из зерна обеих линий практически не менялась.

В процессе пробной выпечки изготовлено и проанализировано два варианта хлеба пшеничного и четыре варианта хлебцев докторских (см. табл. 1).

Результаты определения показателей качества теста и готовых изделий приведены в табл. 3. Органолептический анализ выполнен по методу 20-балльной оценки на основе следующих показателей: форма и состояние поверхности, цвет корки, характер пористости, цвет мякиша, состояние мякиша, запах, разжевываемость.

Окраска мякиша изделий из зерна линии ФЗ имела фиолетовый оттенок. В мякише наблюдались темные вкрапления частиц отрубей (рис. 1). Используемый метод 20-балльной оценки предназначен для изделий из пшеничной муки высшего и первого сорта, которая не содержит окрашенных частиц, полученная балльная оценка проб из зерна линии ФЗ с отрубями была меньше таковой для зер-

Table 2. Quality parameters of flour samples assessed by standard methods (GOST 27676-88, GOST 27839-2013)

Parameters	High quality flour, GOST 52189-2003	Flour from the control (red-grained) wheat line		Flour from the purple-grained line	
		fresh	1-month old	fresh	1-month old
Moisture, %	13.0	15.4	13.6	14.9	12.0
Acidity, degree	3.0	4.3	4.4	4.7	4.9
Whiteness, scale units	56	33	33	27	27
Falling Number, seconds	185	402	400	386	408
Wet gluten content, %	33	48	48	47	51
Wet gluten indices:					
Color of wet gluten	light	light	light beige	light beige	light beige
Extensibility, cm	15	21	21	25	26
Gluten deformation, scale units	85	110	105	106	100
Group	2 (satisfactory, weak)	3 (poor, weak)	3 (poor, weak)	3 (poor, weak)	2 (satisfactory, weak)
Hydration capacity, %	179	186	175	171	186
Gas-producing power, mL/100g	1360	980	970	–	–

Table 3. Quality indices of dough and bakery products

Parameters	Bread without bran		Bread with bran (BB)			
	Bread I	Bread II	Bread III	Bread IV	Bread V	Bread VI****
Dough humidity, %	45.2	45.2	40.4	41.8	41.2	40.4
Final acidity, degree	3.2	3.4	4.6	5.0	4.6	4.8
Fermentation, min	6	5	3	2	3	2
Shape stability, H:D*	0.32	0.33	0.40	0.41	0.35	0.48
Score**	15.5	16.0	18.0	17.5	18.5	17.5
Score***	15.1	15.7	16.4	16.7	16.4	16.9

* H:D, loaf height to diameter ratio.

** 20-point scale.

*** 20-point scale without considering the crumb color.

**** For description of Bread I...VI, see Table 1.

на линии КЗ в связи с влиянием отрубей на цвет мякиша. Поэтому была выполнена оценка качества продукции без учета цвета мякиша. В результате балльная оценка проб изделий без учета цвета мякиша у проб из зерна линии ФЗ была выше, чем у проб из зерна линии КЗ (см. табл. 3).

Важным потребительским свойством изделий является их устойчивость к заболеваниям в процессе хранения. Изделия после выпечки и охлаждения помещали в провокационные условия, способствующие развитию плесневых грибов и прорастанию спор картофельной палочки. Первые признаки плесневения у пробы из изделия «Хлеб/КЗ-мука» выявлены через 48 ч хранения, а у пробы из изделия «Хлеб/ФЗ-мука» они не появились в течение всего срока годности (72 ч). Через 168 ч хранения у пробы из изделия «Хлеб/КЗ-мука» появились признаки картофельной болезни, которых у изделия «Хлеб/ФЗ-мука» обнару-

жено не было. Признаки заболеваний у проб продукции с отрубями (хлебцы докторские из муки и отрубей обеих линий КЗ и ФЗ) в течение срока годности (48 ч) не выявлены.

Результаты оценки содержания антоцианов в муке, отрубях, смесях муки и отрубей и готовых изделиях представлены на рис. 2.

Наиболее высокое содержание антоцианов, как и следовало ожидать, наблюдается в отрубях линии ФЗ – 33.2 мг/кг. В отрубях линии КЗ их примерно в 4 раза меньше. Наименьшее содержание наблюдается в муке высшего сорта (ГОСТ 52189-2003) – 0.86 мг/кг. Доля антоцианов в муке, полученной из зерна линий КЗ и ФЗ, в 4 и 5 раз выше, чем в муке высшего сорта (видимо, за счет попадания частиц отрубей при помол). Добавление отрубей из зерна линии ФЗ в муку (в такой же пропорции, как для

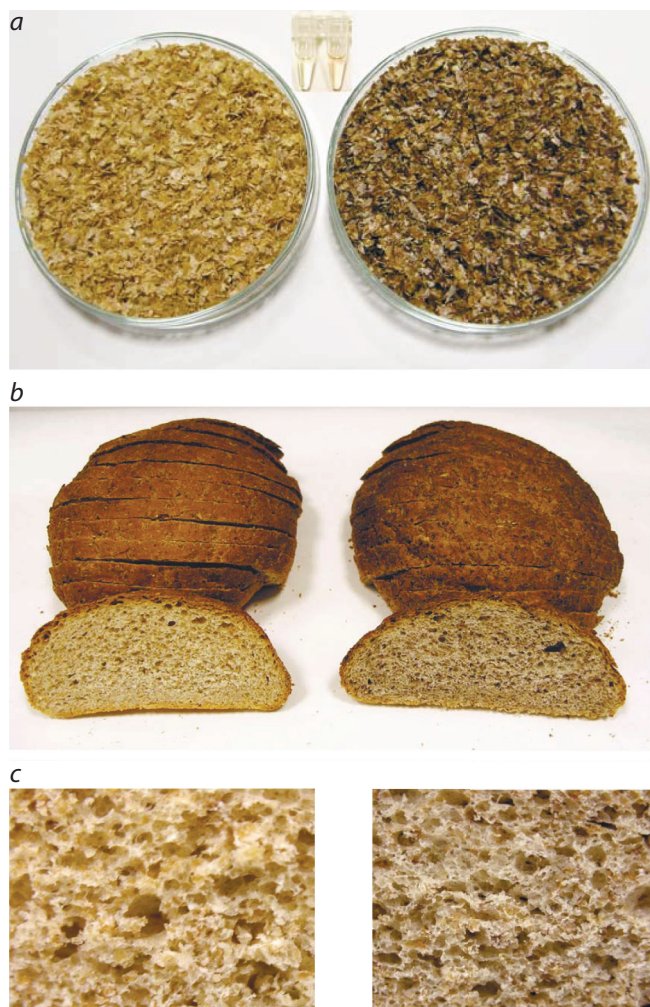


Fig. 1. (a) Bran and samples of extracts from bran, (b) bakery products "Bread III" (left) and "Bread IV" (right), (c) crumbs of these products.

Left column: bran and products from the control (red-grained) wheat line; right column, from the purple-grained line.

приготовления теста) существенно повышает содержание антоцианов: в 9 раз при добавлении отрубей линии ФЗ к муке высшего сорта и в 2.5 раза при добавлении отрубей ФЗ к муке этой же линии. Добавление отрубей линии КЗ к муке высшего сорта повышает содержание антоцианов в 4 раза, а при добавлении их к муке этой же линии увеличивается содержание антоцианов в 1.3 раза.

Исходя из соотношения массы муки с отрубями и подсушенного готового изделия 1 : 0.95 ожидалось, что содержание антоцианов в подсушенном изделии «Хлеб/ФЗ-мука» составит 3.94 мг/кг. Наблюдаемая величина 3.86 сходна с ожидаемой, что говорит о незначительном влиянии технологического процесса приготовления хлеба из зерна линии ФЗ на сохранность антоцианов. В случае линии КЗ наблюдалось разрушение антоцианов до 1.33 мг/кг против ожидаемых 3.23 мг/кг.

С учетом соотношения массы муки с отрубями и подсушенного готового изделия 1 : 1.04 (в случае хлебцев докторских) выявлено, что в изделиях «Хлебцы/ГОСТ-мука + КЗ-отр», «Хлебцы/ГОСТ-мука + ФЗ-отр» и «Хлебцы/КЗ-мука + КЗ-отр» технологическая обработка не имеет отрицательного действия на сохранность антоцианов, в одном варианте хлебцев докторских («Хлебцы/ФЗ-мука + ФЗ-отр») наблюдалось снижение до 7.67 мг/кг против ожидаемых 10.67 мг/кг. В целом установлено, что во всех изделиях из отрубей и муки линии ФЗ содержание антоцианов существенно превышало таковое для соответствующих изделий из зерна линии КЗ, это свидетельствует об устойчивости антоцианов к факторам технологической обработки.

Результаты оценки содержания антиоксидантов в муке, отрубях, смесях муки и отрубей и готовых изделиях представлены на рис. 3. Наиболее высокой массовой долей антиоксидантных соединений отличаются отруби, наименьшей – мука. Добавление отрубей к муке, а также процесс технологической обработки повышают антиоксидантную активность. Вклад антоцианов в увеличение антиоксидантной активности не отмечен.

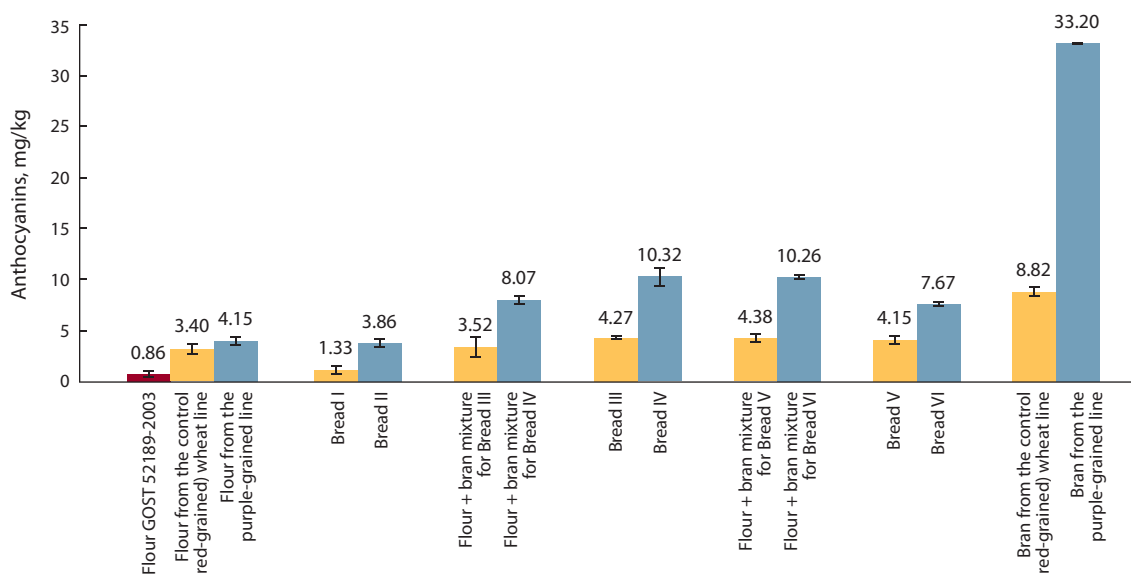


Fig. 2. Anthocyanin contents (expressed as mg cyanidin-3-glucoside/kg) in flour, bran, mixtures of flour and bran, and dried bakery products. For description of Bread I...VI, see Table 1.

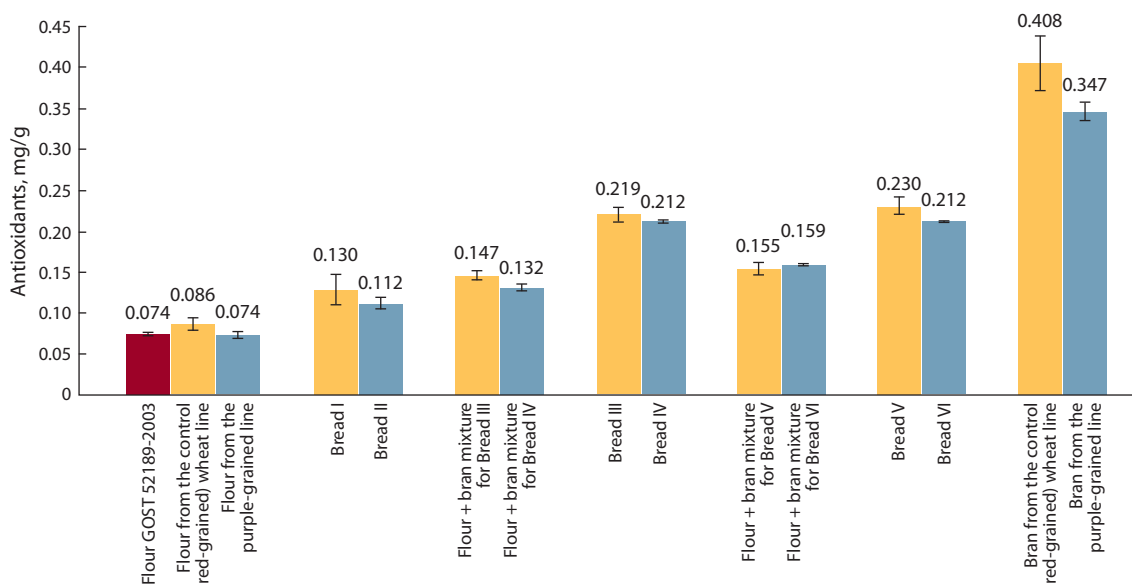


Fig. 3. Antioxidant contents expressed as mg gallic acid/g in flour, bran, mixtures of flour and bran, and bakery products. For description of Bread I...VI, see Table 1.

Обсуждение

В работе проведены изготовление и оценка продукции из зерна, содержащего биофлавоноидные пигменты антоцианы. Для исследования вклада именно этой биохимической компоненты зерна в свойства конечной продукции была существенна информация о генетических различиях исследуемых линий, и важно, чтобы эти различия были минимизированы и включали только разные варианты генов, контролирующих синтез антоцианов. У пшеницы в эндосперме накапливаются неокрашенные флавоноидные соединения, тогда как в алейроновом слое, семенной кожуре и перикарпе встречаются флавоноидные пигменты – антоцианы и проантоцианидины (Adzhieva et al., 2016). Краснозерные сорта пшеницы – результат отбора генотипов, несущих гены *R-1*, контролирующие синтез проантоцианидинов в семенной кожуре. Синтез антоцианов в алейроновом слое (ген *Ba*) и перикарпе (гены *Pp3* и *Pp-1*) обеспечивает голубую и фиолетовую окраску зерна соответственно (Khlestkina et al., 2015).

В нашем исследовании для сравнительной оценки использованы почти изогенные линии пшеницы, различающиеся лишь небольшим участком хромосомы 2A, содержащим ген-регулятор биосинтеза антоцианов *Pp3/TaMycl* (Tereshchenko et al., 2012; Shoeva et al., 2014; Gordееva et al., 2015). Известно, что комплекс технологических свойств зерна, муки, теста и конечных продуктов контролируется десятками генетических локусов на различных хромосомах пшеницы, из них только два относятся к хромосоме 2A (Хлесткина и др., 2016), но по своей локализации они не совпадают с участком, по которому отличаются тестируемые нами линии (Gordееva et al., 2015), поэтому можно полагать, что наблюдаемые в настоящей работе различия между двумя линиями пшеницы связаны именно с последствиями действия гена *Pp3* и синтезом антоцианов.

Специфика локализации пигментов в зерновке (Adzhieva et al., 2016) подразумевает, что обогащенные биофла-

воноидами функциональные пищевые продукты из зерна пшеницы – это, в первую очередь, продукты, полученные из отрубей или с добавлением отрубей. При выборе рецептуры изделий из пшеницы, зерно которой содержит антоцианы, нужно учитывать, что они синтезируются в оболочках, т.е. остаются в отрубях при помоле зерна. Следовательно, отруби, содержащие антоцианы, потенциально влияют на потребительские свойства изделий, их биологическую и пищевую ценность и рекомендуются к использованию для производства изделий специального и диетического назначения. С учетом хлебопекарных свойств исследуемой муки для обеспечения более высоких потребительских свойств предпочтительно применять ее для изготовления булочных изделий, в рецептуру которых включен сахар.

В результате проведенного исследования выявлены значительные отличия продуктов, произведенных из двух линий пшеницы, по содержанию антоцианов. При этом отличия были как в продуктах, подвергшихся минимальной обработке (отруби) (см. рис. 2), так и в готовых изделиях, которые прошли цикл технологической обработки, включая выпечку при повышенной температуре. Во всех случаях продукты из фиолетового зерна (линия Ф3) давали значительно более высокие показатели, чем соответствующие изделия из красного зерна (линия К3) (см. рис. 2). При этом важно отметить, что по остальным критериям, предъявляемым к хлебу и хлебопродуктам при оценке качества, продукция из зерна линии Ф3 не уступала, а в отдельных случаях превышала соответствующие параметры изделий из зерна линии К3 (см. табл. 2).

Выявленная нами массовая доля антоцианов в отрубях линии Ф3 (см. рис. 2) ниже в 2–7.5 раза, чем показано в работах E.S. Abdel-Aal, P. Hucl (1999) и E. Ivanišová с коллегами (2014), которые использовали спиртовые растворители для экстракции антоцианов из отрубей фиолетового зерна. Применяемый нами способ экстракции антоцианов менее эффективен, но он моделирует условия, наиболее

близкие к таковым в процессе усвоения пищи в ЖКТ. Проведенная таким образом оценка количества доступных при употреблении в пищу антоцианов показала, что при приеме 100 г хлебцев докторских, изготовленных из муки с добавлением отрубей фиолетового зерна пшеницы, употребление антоцианов достигает 1.03 мг. В составе 100 г отрубей организм получит до 3.32 г антоцианов (см. рис. 2).

Повышенное содержание доступных антоцианов, их устойчивость к технологической обработке в сочетании с известными данными об их благотворном влиянии на здоровье могут служить основанием для включения продукции из зерна пшеницы, окрашенного антоцианами, в перечень продуктов для диетического питания. Выявленная нами устойчивость изделий из окрашенного зерна к хранению также повышает привлекательность развития данного направления.

Роль биофлавоноидов для профилактики ряда заболеваний связывают с тем, что данные соединения способны участвовать в регуляции генов и передаче клеточных сигналов, могут воздействовать на клеточные рецепторы и белки острой фазы, ингибировать действие ферментов, оказывать гипогликемический эффект, укреплять кровеносные сосуды (Tsuda et al., 2003; Lila, 2004; Williams et al., 2004; Aggarwal, Shishodia, 2006; Tadera et al., 2006; Virgili, Marino, 2008; Shobana et al., 2009; Nile, Park, 2014). Среди свойств антоцианов нередко упоминается и антиоксидантная активность, однако в настоящей работе вклад антоцианов в повышение антиоксидантной активности не отмечен (см. рис. 3).

Несмотря на то что содержание антоцианов в фиолетовом зерне ниже, чем в темно-окрашенных плодах и ягодах (de Pascual-Teresa et al., 2010), использование именно зерновых как источника этих соединений привлекательно в связи с возможностью продолжительного хранения зерна, большей доступностью и повседневным употреблением в пищу зерновых продуктов по сравнению с плодами и ягодами.

Маркер-контролируемое получение и производство форм пшеницы с повышенным уровнем биофлавоноидов в зерне можно предложить как новое направление для расширения внутреннего и экспортного потенциала рынка зерна в связи с новыми возможностями получения продукции повышенной пищевой ценности. На внутреннем рынке России в условиях увеличения доли зерна с более низкими качественными показателями отмечается тенденция роста применения пищевых добавок и улучшителей в качестве корректоров хлебопекарных свойств муки, что зачастую приводит к потере традиционного вкуса хлеба и снижению его пищевой ценности (Усенко и др., 2016). Как показывают результаты данного исследования, расшифровка геномов растений и современные биотехнологические подходы открывают новые перспективы получения традиционных и новых продуктов повышенной ценности с высокими сроками хранения без применения химических добавок и улучшителей. Использование данных разработок сельхозпредприятиями и агрохолдингами может способствовать позитивным структурным изменениям на рынке продовольственного зерна. С точки зрения экспортного потенциала расширение экспортной номенклатуры

имеет особую значимость в условиях реализации задачи по повышению доходности от российского экспорта зерна. Россия в основном поставляет в другие страны пшеницу четвертого класса, представляющую собой продовольственную пшеницу средних кондиций (Россия продает больше зерна..., 2015), обеспечивая посредством экспорта пшеницы снабжение в массовых объемах по приемлемой цене развивающиеся страны Северной Африки и Ближнего Востока. Однако высокие урожаи, большие запасы и высокая конкуренция среди экспортеров на мировом рынке зерна пшеницы влияют на движение цен в сторону их понижения, обуславливают уменьшение относительного дохода от экспорта пшеницы. При этом конъюнктура мирового рынка сельскохозяйственного сырья отличается нестабильностью и непредсказуемостью кратко- и среднесрочных изменений. Кроме того, изменение образа жизни и структуры питания в развивающихся странах, и прежде всего переход от режима питания с преобладанием зерновых к более разнообразному рациону, приводит к изменению номенклатуры торговли, поскольку мировое потребление тяготеет к продукции с добавленной стоимостью, включая продукты, прошедшие технологическую обработку, а доля развивающихся стран в мировом потреблении растет. Поэтому в интересах обеспечения роста доходов от экспорта и формирования новых конкурентных преимуществ перспективно развитие и внедрение новых научно-технических решений, позволяющих осуществить изменение структуры экспорта в сторону продуктов переработки зерна пшеницы с новыми свойствами, позволяющими создавать продукцию, имеющую повышенную пищевую ценность и более высокий уровень добавленной стоимости.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-29-12877. Acquisition of the plant material was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0001.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdel-Aal E.S., Hucl P. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* 1999;76(3):350-354. DOI 10.1094/CCHEM.1999.76.3.350.
- Adzhieva V.F., Babak O.G., Shoeva O.Y., Kilchevsky A.V., Khlestkina E.K. Molecular genetic mechanisms of the development of fruit and seed coloration in plants. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(5): 537-552. DOI 10.1134/S2079059716050026.
- Aggarwal B.B., Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2006;71(10): 1397-1421. DOI 10.1016/j.bcp.2006.02.009.
- Bruschi V., Teuber R., Dolgoplova I. Acceptance and willingness to pay for health-enhancing bakery products – Empirical evidence for young urban Russian consumers. *Food Quality and Preference.* 2015;46:79-91. DOI 10.1016/j.foodqual.2015.07.008.
- Cassidy A., O'Reilly E.J., Kay C., Sampson L., Franz M., Forman J.P., Curhan G., Rimm E.B. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011;93(2):338-347. DOI 10.3945/ajcn.110.006783.
- de Pascual-Teresa S., Moreno D.A., Garcia-Viguera C. Flavonols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 2010;11(4):1679-1703. DOI 10.3390/ijms11041679.

- Ficco D.B.M., de Simone V., Colecchia S.A., Pecorella I., Platani C., Nigro F., Finocchiaro F., Papa R., de Vita P. Genetic variability in anthocyanin composition and nutritional properties of blue, purple, and red bread (*Triticum aestivum* L.) and durum (*Triticum turgidum* L. ssp. *turgidum* convar. *durum*) wheats. J. Agric. Food Chem. 2014;62(34):8686-8695. DOI 10.1021/jf5003683.
- Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of *Pp* (purple pericarp) alleles. Euphytica. 2015;203:469-476. DOI 10.1007/s10681-014-1317-8.
- GOST R 52189-2003. Muka pshenichnaya. Obshchie tekhnicheskie usloviya [State Standard R 52189-2003. Flour. General specifications]. Moscow: Standartinform Publ., 2008. (in Russian)
- GOST R 52349-2005. Produkty pishchevye. Produkty pishchevye funktsionalnye. Terminy i opredeleniya [State Standart R 52349-2005. Foodstuffs. Functional foods. Terms and definitions]. Moscow: Standartinform Publ., 2008. (in Russian)
- GOST 27676-88. Zerno i produkty ego pererabotki. Metod opredeleniya chisla padeniya [State Standart 27676-88. Cereals and cereal milled products. Method for determination of falling number]. Moscow: Standartinform Publ., 2009. (in Russian)
- GOST 27839-2013. Muka pshenichnaya. Metody opredeleniya kolichestva i kachestva kleykoviny [State Standart 27839-2013. Wheat flour. Methods of determination of gluten quantity and quality]. Moscow: Standartinform Publ., 2014. (in Russian)
- Howard B.V., Kritchevsky D. Phytochemicals and cardiovascular disease a statement for healthcare professionals from the American heart association. Circulation. 1997;95(11):2591-2593. DOI 10.1161/01.CIR.95.11.2591.
- Ivanišová E., Ondrejovič M., Chmelova D., Maliar T., Havrlentova M., Rückschloss L. Antioxidant activity and polyphenol content in milling fractions of purple wheat. Cereal Res. Commun. 2014;42(4):578-588. DOI 10.1556/CRC.2014.0008.
- Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Usenko N.I., Otmakhova Yu.S. Prospective applications of molecular genetic approaches to control technological properties of wheat grain in the context of the "grain–flour–bread" chain. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):511-527. DOI 10.18699/VJ15.140. (in Russian)
- Khlestkina E.K., Shoeva O.Y., Gordeeva E.I. Flavonoid biosynthesis genes in wheat. Russ. J. Genet. Appl. Res. 2015;5(3):268-278. DOI 10.1134/S2079059715030077.
- Lila M.A. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. J. Biomed. Biotechnol. 2004;2004(5):306-313. DOI 10.1155/S111072430440401X.
- Nile S.H., Park S.W. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. Nutrition. 2014;30(2):134-144. DOI 10.1016/j.nut.2013.04.007.
- Puchkova L.I. Laboratornyy praktikum po tekhnologii khlebopekarnogo proizvodstva [Laboratory manual on baking technology]. St. Petersburg: GIOR Publ., 2004. (in Russian)
- Romanov A.S., Davydenko N.A., Shatnyuk L.N., Matveeva I.V., Poznyakovskiy V.M. Ekspertiza khleba i khlebobulochnykh izdeliy. Kachestvo i bezopasnost: uchebnoe posobie [Examination of bread and bakery products: quality and safety, a textbook]. Ed. by V.M. Poznyakovskiy. Saratov: Vuzovskoe obrazovanie Publ., 2014. (in Russian)
- Rossiya prodada bolshe zerna, chem oruzhiya (2015) [Russia sells more grains than weapons (2015)]. Available at: <http://www.pravda.ru/economics/agriculture/farming/14-10-2015/1277717-grain-0/> (in Russian)
- Rynok funktsional'nykh produktov pitaniya (2014) [The functional food market (2014)]. Available at <http://sfera.fm/articles/rynok-funktsionalnykh-produktov-pitaniya> (in Russian)
- Shobana S., Sreerama Y.N., Malleshi N.G. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. Food Chem. 2009;115(4):1268-1273. DOI 10.1016/j.foodchem.2009.01.042.
- Shoeva O.Y., Khlestkina E.K., Berges H., Salina E.A. The homoeologous genes encoding chalcone-flavanone isomerase in *Triticum aestivum* L.: Structural characterization and expression in different parts of wheat plant. Gene. 2014;538(2):334-341.
- Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka T. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 2006;52(2):149-153. DOI 10.3177/jnsv.52.149.
- Tereshchenko O., Gordeeva E., Arbuzova V., Börner A., Khlestkina E. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat. Cereal Res. Commun. 2012;40(3):334-341. DOI 10.1556/CRC.40.2012.3.2.
- Tsuda T., Horio F., Uchida K., Aoki H., Osawa T. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. J. Nutr. 2003;133(7):2125-2130.
- Usenko N.I., Poznyakovskiy V.M., Otmakhova Y.S. Structural and qualitative transformations in the bread market (analysis of the current state and development problems). EKO (Vserossiyskiy ekonomicheskii zhurnal) = ECO Journal (Novosibirsk). 2016;1:109-124. (in Russian)
- Virgili F., Marino M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med. 2008;45(9):1205-1216. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.001.
- Williams R.J., Spencer J.P., Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radic. Biol. Med. 2004;36(7):838-849. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001.

Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro*

Д.С. Мурасева , Н.С. Звягина, Т.И. Новикова, О.В. Дорогина

Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Разработана эффективная система микроразмножения и сохранения в коллекции *in vitro* эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst и проведена оценка генетической стабильности регенерантов после депонирования. Установлена эффективность использования сегментов луковичных чешуй в качестве первичных эксплантов. Наиболее оптимальной питательной средой на этапах инициации культуры *in vitro* и размножения являлась среда BDS, дополненная 5.0 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 2.0 мкМ 1-нафтилуксусной кислоты (НУК). Коллекция микрорастений поддерживается в условиях активного ($+23 \pm 2^\circ\text{C}$) и замедленного роста ($+7^\circ\text{C}$). При переводе микроклонов *F. sonnikovae* в условия замедленного роста при температуре $+7^\circ\text{C}$ период беспересадочного субкультивирования удалось увеличить до 9–12 мес. Оценка регенерационного потенциала микрорастений при последующем культивировании сегментов чешуй на питательной среде BDS, дополненной 5.0 мкМ БАП и 2.0 мкМ НУК, позволила выявить стимулирующий эффект хранения при низких температурах: в первом пассаже после депонирования частота регенерации составила 93 %, количество адвентивных побегов – 6.9 ± 1.7 шт./эксп. Однако дальнейшее субкультивирование приводило к снижению активности побегообразования, и к третьему пассажу регенерация достигала уровня до депонирования. На основании анализа ISSR-ПЦР-фрагментов установлено генетическое соответствие материнских растений и регенерантов, полученных в ходе прямого органогенеза в первом пассаже после депонирования (12 мес.).

Ключевые слова: *Fritillaria sonnikovae*; коллекция *in vitro*; ISSR-анализ; соматическая изменчивость; депонирование *in vitro*; сохранение биоразнообразия.

Conservation of the West Sayan endemic *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) in *in vitro* collection

D.S. Muraseva , N.S. Zvyagina, T.I. Novikova, O.V. Dorogina

Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia

An effective system of micropropagation and *in vitro* conservation of the West Sayan endemic *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst was developed and the genetic stability of regenerants after slow-growth storage was assessed. The efficiency of bulb scale segments as primary explants was established. The optimum nutrient medium for stages of *in vitro* culture initiation and multiplication was BDS supplemented with BAP (5.0 μM) and NAA (2.0 μM). The microplant collection was maintained in active-growth ($+23 \pm 2^\circ\text{C}$) and slow-growth ($+7^\circ\text{C}$) conditions. The period of subculturing at $+7^\circ\text{C}$ was prolonged to 9–12 months when microclones of *F. sonnikovae* were transferred to slow-growth conditions. Assessment of microplant regeneration potential in further cultivation of bulb scales on BDS nutrient medium supplemented with BAP (5.0 μM) and NAA (2.0 μM) revealed a stimulating effect of conservation at low temperatures: the regeneration rate reached 93 % and the number of bulblets per explant was 6.9 ± 1.7 at the first passage after slow-growth storage. However, further cultivation led to decrease of shoot development, and the regeneration rate reached the level before slow-growth storage at the third passage. The genetic fidelity of regenerants obtained during direct organogenesis at the first passage after slow-growth storage (12 months) was established by analysis of ISSR-PCR-fragments.

Kew words: *Fritillaria sonnikovae*; *in vitro* collection; ISSR; somaclonal variation; slow-growth storage; biodiversity conservation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Мурасева Д.С., Звягина Н.С., Новикова Т.И., Дорогина О.В. Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):554-560. DOI 10.18699/VJ17.272

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Muraseva D.S., Zvyagina N.S., Novikova T.I., Dorogina O.V. Conservation of the West Sayan endemic *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) in *in vitro* collection. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):554-560. DOI 10.18699/VJ17.272 (in Russian)

Решение проблемы сохранения биоразнообразия растений на современном этапе невозможно без поиска новых стратегий и подходов. В связи с этим в последние десятилетия отмечено развитие перспективного направления – биотехнологии сохранения растений (Benson, 2002; Cruz-Cruz et al., 2013). Это новая междисциплинарная наука, основная задача которой – дополнение традиционных методов сохранения биоразнообразия *ex situ* современными биотехнологическими инструментами, обеспечивающими возможность устойчивого управления генетическими ресурсами. В рамках этого направления многие ботанические сады помимо банков семян и пыльцы, полевых коллекций создают коллекции *in vitro* редких и эндемичных растений, а также видов, находящихся под угрозой исчезновения.

Основу методов сохранения биоразнообразия *in vitro* составляет поддержание коллекции культур, их регенерационного потенциала путем периодического пересаживания на свежие питательные среды. При этом для коллекций *in vitro* характерна различная продолжительность периода хранения: от 25–30 сут в условиях активного роста (краткосрочное хранение) до четырех лет в беспересадочной культуре в условиях замедленного роста (среднесрочное хранение, депонирование). Депонирование характеризуется сокращением вегетативной активности сохраняемого материала, что приводит к увеличению интервалов между пересадками (от нескольких месяцев до одного года и более) (Jain, Ochatt, 2010; Новикова, 2013; Cordeiro et al., 2014). Наиболее изученным фактором, обеспечивающим среднесрочное хранение коллекций *in vitro*, является температура. Культивирование при низкой положительной температуре (для растений умеренной зоны +2–5 °C, для тропических видов +15–20 °C) эффективно замедляет ростовые процессы растений большинства таксонов (Bell, Reed, 2002; Engelmann, 2011). Так, среднесрочное хранение при низких температурах успешно применяли для культур *Gladiolus imbricatus* L. (Rakosy-Tican et al., 2012), а также Восточных и Азиатских гибридов лилий (Bonnier, Van Tuyl, 1997). В целом данный тип хранения генетического материала применяется во многих лабораториях.

Важным аспектом хранения коллекций *in vitro* является контроль генетической стабильности регенерантов. Необходимо учитывать, что риск появления полиморфизма у регенерантов в культуре *in vitro* повышается при наличии каллусной стадии, использовании регуляторов роста, а также при увеличении периода культивирования (Bairu et al., 2011). Для идентификации соматоклональной изменчивости, имеющей эпигенетическую или генетическую природу, используют разнообразные методы, включающие оценку как морфологических признаков, так и молекулярно-генетических маркеров (Rani et al., 1995; Bublyk et al., 2012). Одним из эффективных методов, востребованных в этих исследованиях, является ISSR-анализ (inter simple sequence repeats), основанный на амплификации межмикросателлитных участков геномной ДНК (Liu, Yang, 2012; Al Khateeb et al., 2013). Популярность данного метода объясняется высокой воспроизводимостью, удобством, чувствительностью и экономичностью (Bairu et al., 2011).

Среди представителей рода *Fritillaria* L. (рябчик) много эндемичных и редких видов. Так, недавно описанный эн-

демик *F. sonnikovae* Schaulo et A. Erst имеет узколокальный ареал в пределах Западного Саяна (Шауло, Эрст, 2010). Ограниченность ареала повышает риск исчезновения данного вида, являющегося предположительно неморальным реликтом конца третичного периода Алтае-Саянской флористической провинции (Шауло, Эрст, 2010). Поскольку многие природные виды рябчиков находятся под угрозой исчезновения из-за нерегулируемого сбора луковиц и цветущих побегов, необходим поиск новых эффективных подходов для их сохранения. С учетом преимуществ методов биотехнологии наши исследования направлены на изучение особенностей микроразмножения и депонирования *in vitro* эндемичного вида *F. sonnikovae*.

Цель исследования – разработать эффективную систему микроразмножения и сохранения в коллекции *in vitro* эндемичного вида *F. sonnikovae* и провести оценку генетической стабильности регенерантов после депонирования.

Материалы и методы

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* послужили луковицы эндемичного вида *F. sonnikovae*, полученные из естественных мест произрастания (Россия, Красноярский край, хребет Борус).

Инициация культуры *in vitro*. Перед введением в культуру *in vitro* интактные луковицы выдерживали при пониженной температуре (+5±2 °C) в течение 3–4 нед для преодоления периода покоя, характерного для всех геофитов. Луковицы перед поверхностной стерилизацией тщательно очищали от загрязнений и промывали в проточной воде в течение 1 ч. Стерилизацию проводили по предложенной ранее методике последовательным погружением в 70 % этанол (30 с), затем в 0.1 % раствор хлорида ртути (HgCl₂) с добавлением Tween 80 (30 мин) и трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой (Кульханова и др., 2015). Стерильные чешуи в асептических условиях разделяли на сегменты размером 5 × 5 мм и использовали в качестве первичных эксплантов. Сегменты чешуй помещали раневой поверхностью на питательную среду по 4–5 шт. в каждый культуральный сосуд.

На этапе введения в культуру *in vitro* использовали среды по прописям B₅ (Gamborg, Eveleigh, 1968) и BDS (Dunstan, Short, 1977), дополненные 5.0 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 2.0 мкМ 1-нафтилуксусной кислоты (НУК). Длительность первого пассажа составила 50–60 сут. Полученные адвентивные микролуковички отделяли от тканей первичного экспланта и переносили на среды для размножения.

В качестве контроля на всех этапах использовали безгормональные питательные среды.

Размножение *in vitro*. На этапе оптимизации стадии собственно размножения использовали агаризованные питательные среды по прописям B₅ или BDS, дополненные экзогенными регуляторами роста: цитокининами (БАП и тидиазурон (ТДЗ) в концентрациях 0.1–10.0 мкМ) и ауксином НУК в концентрации 2.0 мкМ (табл. 1; протокол представлен в Доп. материалах¹).

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx8.pdf>

Table 1. Modifications of nutrient media employed in *F. sonnikovae* propagation proper

Mineral base		Growth regulator, μM		
		BAP	NAA	TDZ
BDS	B ₅	–	–	–
BDS	B ₅	0.1	–	–
BDS	B ₅	0.5	–	–
BDS	B ₅	5.0	–	–
BDS	B ₅	5.0	2.0	–
BDS	B ₅	10.0	2.0	–
–	B ₅	–	–	0.1
BDS	B ₅	–	–	0.5
–	B ₅	–	–	5.0
BDS	B ₅	–	2.0	5.0
BDS	B ₅	–	2.0	10.0

Культивирование микрорастений проводили в условиях свето-культуральной комнаты: интенсивность освещения 3.5–4.0 клк, фотопериод – 16 ч свет, 8 ч темнота, температура $+23 \pm 2$ °C. Продолжительность пассажа 35–40 сут.

Морфологию структур, сформированных *de novo*, анализировали с помощью стереомикроскопа Stereo Discovery V 12 (Carl Zeiss, Германия) на базе Центра коллективного пользования ЦСБС СО РАН.

Коллекция *in vitro*. Для депонирования отбирали выровненные микрорастения с луковичками не менее 4–5 мм, имеющие 1–2 листа, которые поддерживали в условиях замедленного роста при температуре $+7$ °C, фотопериоде 16/8, интенсивности освещения 1.5–3.0 клк (световой термостат RuMed, Германия). На данном этапе использовали безгормональные питательные среды 1/2 BDS и 1/2 B₅, содержащие 30.0 г/л сахарозы и 0.5 г/л активированного угля.

По завершении депонирования проводили оценку регенерационного потенциала микрорастений. Для этого у лукович, находящихся на хранении в течение 12 мес., изолировали луковичные чешуи, разделяли их на сегменты (5×5 мм) и культивировали в стандартных условиях ($+23 \pm 2$ °C, длительность пассажа 35–40 сут). В эксперименте использовали среды, отмеченные как наиболее оптимальные на стадии собственно размножения.

На этом этапе проводили также оценку генетической стабильности регенерантов, полученных в первом пассаже после депонирования. Анализировали сформированные микролуковички (регенеранты) и сегменты чешуй материнских растений (контроль). Для выявления генетической стабильности регенерантов первого поколения применили ISSR-анализ.

Экстракция ДНК и ISSR-анализ. Экстракцию ДНК проводили с помощью набора для выделения ДНК из пищевых продуктов и сырья (BioSilica, Россия). Чистоту (соотношение величин оптической силы при длине волн 260 и 280 нм) и концентрацию полученных экстрактов

ДНК определяли на спектрофотометре BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, Германия), используя микрокювету $\mu\text{Cuvette G1.0}$ (Eppendorf, Германия).

В исследовании испытано 12 ISSR-праймеров: (CA)₆GT, (CA)₆AG, (CT)₈TG, (CAC)₃GC, (CTC)₃GC, (AC)₈CG, (AC)₈YG, (CA)₆AC, (CA)₆GG, (GA)₈YC, (GAA)₆, (GACAC)₄. Однако только первые пять праймеров, характеризующихся репрезентативностью ISSR-паттерна и наиболее высоким полиморфизмом амплифицированных фрагментов, были привлечены для идентификации стабильности регенерантов. Реакционная ПЦР-смесь объемом 25.0 мкл содержала 2.7 mM MgCl₂, 1.25 mM праймера, 0.4 mM мононуклеотидов, 1×PCR-буфер, 1.5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Медиген, Россия) и 5.0 нг матрицы. Программа амплификации состояла из следующих этапов: денатурация ДНК – 1.30 мин при 94 °C; 35 циклов амплификации – 0.40 мин при 94 °C, 0.45 мин отжига праймера при 42–51 °C и 1.30 мин при 72 °C; заключительный этап пролонгирования нуклеотидной цепи – 5 мин при 72 °C. ПЦР проводили в C 1000 Thermal Cycler (BioRad Laboratories, США). Оптимальная температура отжига ($T_{\text{опт.}}$) подобрана эмпирически в ходе предыдущих исследований (Zvyagina et al., 2016). Полученные ISSR-фрагменты окрашивали SYBR-Green (Медиген, Россия). Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1.5 % агарозном геле в 1×TBE-буфере. Размер ISSR-фрагментов определяли путем сравнения их подвижности с маркером молекулярного веса (Медиген, Россия). ISSR-профиль изучаемых образцов визуализировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ и анализировали с использованием программного обеспечения Image Lab Software (BioRad Laboratories, США). Каждый амплифицированный фрагмент рассматривали как доминантный маркер и для изучаемых образцов отмечали его присутствие (1) либо отсутствие (0).

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводили трижды, по 7–10 эксплантов в каждом опыте. Обработывали полученные данные с помощью пакета программ Microsoft Office Excel 2007. На диаграммах приведены средние арифметические величины и доверительные интервалы. Обсуждаются различия, достоверные при 95 % уровне значимости.

Статистический анализ вариабельности регенерантов проводили в программе TFPGA (Miller, 1997) методами расчета генетического расстояния (genetic distance, D) и генетического сходства (genetic identity, I), предложенными М. Nei (1972).

Результаты и обсуждение

Введение в культуру *in vitro* подземных органов растений осложняется высокой степенью грибной и микробной контаминации, поэтому при использовании луковичных чешуй в качестве источников первичных эксплантов мы применили наиболее эффективный способ стерилизации, обеспечивающий высокий выход неинфицированных и жизнеспособных эксплантов (Кульханова и др., 2015). Используемый режим поверхностной стерилизации луковичных чешуй оказался оптимальным, доля асептических эксплантов составила 96 %. Развития каллусной ткани на этапе инициации культуры *in vitro* не происходило, наблю-

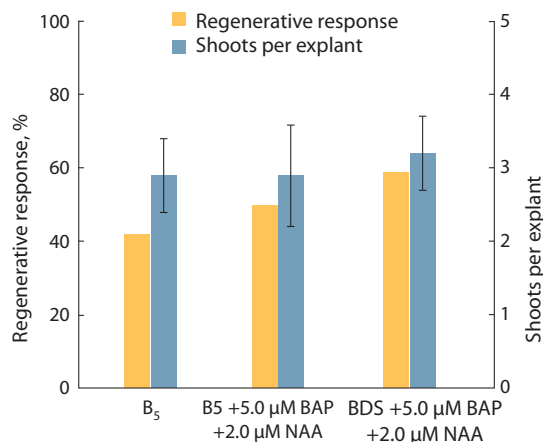


Fig. 1. Effect of nutrient medium composition on the regeneration of *F. sonnikovae* adventitious shoots from primary explant tissues (bulb scales).

дали исключительно прямую регенерацию адвентивных микролуковичек.

Наиболее эффективно использование питательной среды BDS, дополненной 5.0 мкМ БАП и 2.0 мкМ НУК (рис. 1). Разделение луковичной чешуи на сегменты стимулировало процессы морфогенеза. Подобные результаты положительного влияния поранений можно объяснить активацией клеточных делений в области повреждений, что составляет одну из основ регенерации (Song et al., 2011). В то же время не отмечали более активной регенерации в области донца. При этом наши результаты расходятся с данными, полученными другими исследователями. Так, согласно (Joshi et al., 2007), при культивировании сегментов луковичных чешуй *Fritillaria roylei* Hook базальная часть чешуи отличалась более высоким морфогенетическим потенциалом в сравнении с дистальной. Подобные результаты получены и для других геофитов, например, *Lilium longiflorum* Thunb. (Marinangeli et al., 2003) и декоративных луков подрода *Melanocrommyum* Webb et Berthel. (Полубоярова, Новикова, 2013).

Полученные на этапе инициации культуры *in vitro* луковички использовали для оптимизации стадии собственно размножения. Согласно нашим данным, основной тип морфогенного ответа в культуре ткани *F. sonnikovae* – прямой геммогенез. Установлено, что добавление в питательную среду BDS 5.0 мкМ БАП и 2.0 мкМ НУК индуцировало формирование адвентивных почек *de novo* и обеспечивало активную регенерацию микролуковичек: количество микролуковичек на эксплант 4.6 ± 0.4 шт., частота регенерации – 56 %. Данная среда являлась оптимальной. Культивирование *F. sonnikovae* на средах с низким содержанием цитокининов (0.1 и 0.5 мкМ) вызывало образование желто-зеленого каллуса (38 %), длительное пассирование (более 5 нед) которого приводило к закладке адвентивных микропочек. Однако частота регенерации побегов на поверхности каллусной ткани не превышала 28 %. Данная тенденция особенно ярко прослеживалась на питательной среде BDS, дополненной 0.5 мкМ ТДЗ: несмотря на высокий процент регенерации и количество

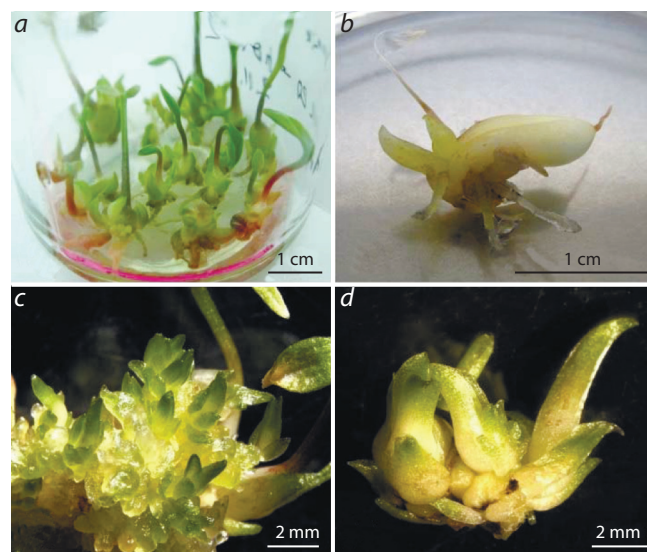


Fig. 2. *Fritillaria sonnikovae* microplants: a, before deposition; b, in the course of deposition; c, d, shoot formation in the first and third passages after 12-month storage, respectively. Nutrient medium: BDS + 5.0 µM BAP + 2.0 µM NAA.

закладающихся почек (до 11 шт.), в результате развития конгломерата удавалось получить лишь 3.1 ± 1.2 шт. хорошо сформированных микролуковичек.

Использование ТДЗ на этапе размножения приводило к образованию адвентивных микропочек, однако частота и скорость развития побегов из этих почек оставались низкими. При этом наблюдали формирование гипергидратированных почек со слабой дифференциацией листовых примордиев. Ранее негативное влияние ТДЗ на регенерацию различных видов и сортов лилий, выражающееся в морфологических аномалиях побегов и замедлении их развития, отмечалось в работах (Vacchetta et al., 2003; A. Parić et al., 2011).

В результате проведенной работы получены микрорастения, составляющие коллекцию *in vitro*. Растения поддерживали в условиях активного роста при температуре $+23 \pm 2$ °C и фотопериоде (16/8) и длительности пассажа 35–40 сут, что обеспечивало поддержание регенерационного потенциала на высоком уровне.

При переводе микроклонов *F. sonnikovae* в условия замедленного роста (депонирование) при температуре $+7$ °C на фотопериоде длительность беспересадочного субкультивирования достигла 9–12 мес. При этом жизнеспособность микрорастений после хранения составляла 87 %. Легкость депонирования можно объяснить физиологическими механизмами, характерными для геофитов в период зимнего покоя (Jevremović et al., 2010).

Отмечено, что для микрорастений, находящихся в условиях минимального роста, характерны гипергидратация луковичных чешуй, отмирание имеющихся ее листьев, продолжение роста луковичи и увеличение ее размеров до двух раз к концу субкультивирования (рис. 2). На протяжении всего пассажа (9–12 мес.) наблюдали закладку единичных побегов в базальной части луковички, однако частота побегообразования не превышала 11 %.

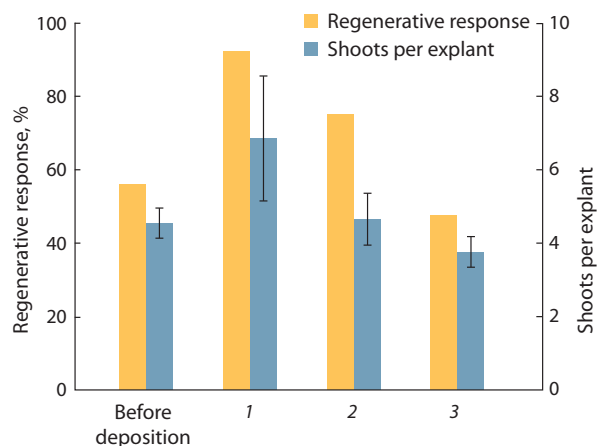


Fig. 3. Variation of the regenerative response of *F. sonnikovae* after deposition (12 months).

Nutrient medium: BDS + 5.0 μ M BAP + 2.0 μ M NAA; 1–3, passages.

Длительность депонирования ограничивалась не только жизнеспособностью микроклонов, но также истощением питательной среды и, как следствие, уменьшением ее объема. Это указывает на необходимость постоянного контроля объема среды в культуральных сосудах. По завершении этапа хранения (+7 °C) микрорастения переносили на свежие питательные среды и культивировали при +23 ± 2 °C. В дальнейшем при необходимости начинали очередной цикл хранения.

На основании оценки регенерационного потенциала микрорастений при последующем культивировании сегментов чешуй на питательной среде BDS, дополненной 5.0 мкМ БАП и 2.0 мкМ НУК, выявлен стимулирующий эффект хранения при низких температурах: в первом пассаже частота регенерации составила 93 %, количество адвентивных побегов 6.9 ± 1.7 шт./эксп. Высокий морфогенетический потенциал отмечали и на безгормональной питательной среде BDS. На данных средах развития каллуса не происходило, наблюдали разрастание ткани луковичной чешуи и образование плотных конгломератов побегов, формирующиеся луковички имели размер не более 2–3 мм. Однако при дальнейшем субкультивировании активность побегообразования снижалась и к третьему пассажу достигала уровня регенерации до депонирования (рис. 3).

Активацию побегообразования после депонирования в условиях низких положительных температур можно объяснить физиолого-морфологическими механизмами, протекающими в тканях геофитов в осенне-зимние месяцы (Kamenetsky, Okubo, 2013). Смена температурного режима, аналогичная смене сезонов года (при переводе культур из режима +7 °C в условия +23 ± 2 °C), индуцирует процессы морфогенеза *in vitro* в тканях луковичных чешуй и стимулирует развитие геофитов после относительного зимнего покоя. Усиление роста после периода низких температур наблюдала М. Nikolić с коллегами (2008) при оценке влияния температуры культивирования на преодоление покоя и накопление углеводов в луковичах *F. meleagris* L., полученных в культуре *in vitro*.

Согласно литературным данным, наиболее доступными способами создания коллекций растений *in vitro*, находящихся в состоянии замедленного роста, являются снижение температуры культивирования и уменьшение концентрации минеральных компонентов среды (Engelmann, 2011). Подобные меры (температура +4–6 °C, 1 % сахара) позволили сохранить в беспересадочной культуре микроклоны *F. meleagris* в течение 18 мес. (Таварткиладзе, Вечернина, 1999). Также имеются работы, свидетельствующие об успешном длительном хранении представителей родов *Allium* L. и *Lilium* L. при температуре –2 °C (Keller, 1992; Bonnier, Van Tuyt, 1997).

Для идентификации генетической стабильности культивируемых растений осуществлен компаративный анализ ISSR-регионов геномной ДНК материнских растений и соответствующих регенерантов. В результате ISSR-ПЦР-амплификаций матриц, выполненных с пятью праймерами, получено от 14 до 23 амплифицированных фрагментов размером от 200 до 1800 п.н. Температура отжига праймеров варьировала в диапазоне от 42 до 51 °C (табл. 2).

При анализе матриц не выявлен полиморфизм амплифицированных ISSR-ПЦР-фрагментов (рис. 4). Установлено отсутствие ($D = 0$) генетической изменчивости у регенерантов, сформированных в ходе прямого органогенеза в первом пассаже, следующим за депонированием в течение 12 мес. Таким образом, не обнаружено генетических различий между материнскими растениями и регенерантами *F. sonnikovae*.

В недавних исследованиях отсутствие соматической изменчивости установлено в работах с *Moringa peregrina* (Forsk.) Fiori (Al Khateeb et al., 2013), а также с Восточными гибридами лилий (Liu, Yang, 2012). При этом генетическая однородность регенерантов объясняется тем, что формирование растений происходит в результате неполового процесса, включающего только митотическую активность клеток (Vasil, Thorpe, 1994; Bairu et al., 2011).

В ряде работ отмечено, что частота соматической изменчивости возрастает у растений, полученных после длительного хранения *in vitro* (Vinci, Parekh, 2003; Bairu et al., 2006). Однако депонирование не всегда приводит к генетической неоднородности регенерантов. Так, с использованием RAPD-анализа установлено полное генетическое соответствие между материнскими растениями различных видов рода *Lilium* и регенерантами, полученными из сегментов луковичных чешуй, хранящихся *in vitro* в течение 6 и 18 мес. (Varshney et al., 2001). Длительное хранение *in vitro* также не вызывало изменений в структуре ДНК у 14 сортов картофеля (Антонова и др., 2004). Наше исследование культуры *F. sonnikovae* подтверждает сведения о том, что длительное депонирование не приводит к возникновению соматической изменчивости и может использоваться для создания коллекций *in vitro* с целью сохранения биоразнообразия флоры.

В результате разработанных систем клонального микро-размножения коллекция *in vitro* лаборатории биотехнологии ЦСБС СО РАН пополнена эндемичным видом Западного Саяна *F. sonnikovae*. В настоящее время коллекция в условиях активного роста насчитывает более 150 растений-регенерантов *F. sonnikovae*, а в условиях замед-

Table 2. ISSR primers used in the study

ISSR primer, 5'–3'	Annealing temperature, °C	Number of amplified fragments	ISSR fragment lengths, bp
(CA) ₆ GT	48	23	200–1400
(CAC) ₃ GC	42	21	470–1600
(CA) ₆ AG	48	18	620–1100
(CT) ₈ TG	51	15	480–1200
(CTC) ₃ GC	42	14	600–1800

ленного роста – 50 образцов. В процессе изучения особенностей среднесрочного хранения *in vitro* нам удалось увеличить период беспересадочного субкультивирования до 9–12 мес., с использованием наиболее доступных приемов по замедлению ростовых процессов – снижение температуры культивирования и уменьшение концентрации минеральных компонентов питательной среды. При этом проведенный ISSR-анализ позволил установить генетическое соответствие материнских растений и регенерантов, полученных после депонирования.

Коллекции *in vitro* служат не только для сохранения уязвимых таксонов в условиях *ex situ*, но также для репатриации *in situ* (Reed et al., 2011). Подобные реинтродукционные мероприятия проводят во многих странах мира для восстановления естественных популяций растений (Krishnan et al., 2011). Однако при осуществлении этих работ необходимо учитывать, что прямое высаживание ограниченного количества генотипов может привести к снижению генетического разнообразия природных популяций. В дальнейших исследованиях планируется предварительная оценка внутривидовой изменчивости выборки растений *F. sonnikovae* из природных популяций с целью отбора полиморфных генотипов и их массового размножения с помощью разработанного протокола как для расширения банка гермоплазмы *in vitro*, так и для репатриации в естественные местообитания.

Acknowledgments

This study was supported by the Integrated Program of Basic Research, Siberian Branch of the RAS, project II.2P/VI.52-1.

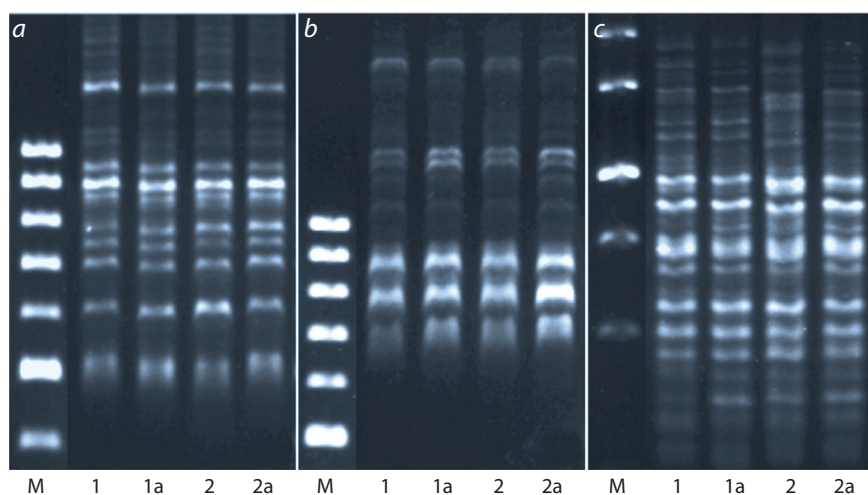


Fig. 4. Electrophoretic resolution of ISSR fragments obtained by PCR with primers: (a) (CAC)₃GC, (b) (CTC)₃GC, (c) (CA)₆GT.

1, 2, Maternal plants; 1a, 2a, first generation of *F. sonnikovae* regenerants. M, molecular weight ladder. Nutrient medium: BDS + 5.0 μM BAP + 2.0 μM NAA.

The authors are grateful to D.N. Shaulo and A.S. Erst, who provided *F. sonnikovae* plants for the experiments.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Al Khateeb W., Bahar E., Lahham J., Schroeder D., Hussein E. Regeneration and assessment of genetic fidelity of the endangered tree *Moringa peregrina* (Forsk.) Fiori using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2013;19(1):157-164. DOI 10.1007/s12298-012-0149-z.
- Antonova O.Yu., Truskinov E.V., Frolova D.V., Gavrilenko T.A. Analysis of the genetic stability of potato samples stored under *in vitro* conditions. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2004;6:25-30. (in Russian)
- Bacchetta L., Remotti P.C., Bernardini C., Saccardo F. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. *Plant. Cell Tiss. Org. Cult.* 2003;74:37-44. DOI 10.1023/A:1023315321931.
- Bairu M.W., Aremu A.O., Van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 2011;63:147-173. DOI 10.1007/s10725-010-9554-x.
- Bairu M.W., Fennell C.W., Van Staden J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa AAA* cv. "Zelig"). *Sci. Hortic.* 2006;108(4):347-351. DOI 10.1016/j.scienta.2006.01.039.
- Bell R.L., Reed B.M. *In vitro* tissue culture of pear: Advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. *Proc. 8th IS on Pear*. 2002;412-418.
- Benson E.E. *Plant Conservation Biotechnology*. L.; Philadelphia P.A.: Taylor and Francis, 2002.

- Bonnier F.J.M., Van Tuyl J.M. Long term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1997;49:81-87. DOI 10.1023/A:1005810728215.
- Bublyk O.M., Andreev I.O., Spiridonova K.V., Kunakh V.A. Genetic variability in regenerated plants of *Ungernia victoris*. *Biologia Plantarum*. 2012;56(2):395-400. DOI 10.1007/s10535-012-0106-2.
- Cordeiro S.Z., Simas N.K., Henriques A.B., Sato A. *In vitro* conservation of *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae): short-term storage and encapsulation-dehydration of nodal segments. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2014;50:326-336. DOI 10.1007/s11627-014-9600-x.
- Cruz-Cruz C.A., González-Arnan M.T., Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*. 2013;2:73-95. DOI 10.3390/resources2020073.
- Dunstan D.J., Short K.C. Improved growth of tissue cultures of the onion *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 1977;41(1):70-72.
- Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2011;47:5-16. DOI 10.1007/s11627-010-9327-2.
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 1968;46(5):417-421.
- Jain S.M., Ochatt S.J. Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants, methods in molecular biology. New Jersey: Humana Press, 2010. DOI 10.1007/978-1-60327-114-1.
- Jevremović S., Petrić M., Zivković S., Trifunović M., Subotić A. Superoxide dismutase activity and isoenzyme profiles in bulbs of snake's head fritillary in response to cold treatment. *Arch. Biol. Sci.* 2010; 62(3):553-558. DOI 10.2298/ABS1003553J.
- Joshi S.K., Dhar U., Andola H.C. *In vitro* bulblet regeneration and evaluation of *Fritillaria roylei* Hook. – a high value medicinal herb of the Himalaya. *Acta Hort.* 2007;756:75-84. DOI 10.17660/ActaHortic.2007.756.8.
- Kamenetsky R., Okubo H. Ornamental geophytes: from basic science to sustainable production. Boca Raton, F.L.: CRC Press, 2013.
- Keller J. Influence of different temperature treatments on viability of *in vitro* cultivated *Allium* shoots and bulblets. *Acta Hort.* 1992;319:307-312. DOI 10.17660/ActaHortic.1992.319.47.
- Krishnan P.N., Decruse S.W., Radha R.K. Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through *in vitro* technology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2011;47:110-122. DOI 10.1007/s11627-011-9344-9.
- Kul'khanova D.S., Erst A.A., Novikova T.I. *In vitro* regeneration from bulbous scales of *Fritillaria sonnikovae*, an endemic species. *Ontogenez = Ontogenesis* (Moscow). 2015;46(4):259-266. DOI 10.7868/S0475145015040059. (in Russian)
- Liu X., Yang G. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2012;48:172-179. DOI 10.1007/s11627-012-9429-0.
- Marinangeli P.A., Hernandez L.F., Pellegrini C.P., Curvetto N.R. Bulblet differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2003;128(3):324-329.
- Miller M.P. Tools for populations genetic analyses (TFPGA) 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Available at <http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem09/docs/TFPGADOC.PDF>.
- Nei M. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 1972;106:283-292.
- Nikolić M., Misić D., Maksimović V., Jevremović S., Trifunović M., Subotić A. Effect of low temperature on rooting rate and carbohydrate content of *Fritillaria meleagris* bulbs formed in culture *in vitro*. *Arch. Biol. Sci., Belgrade.* 2008;60(1):5-6. DOI 10.2298/ABS080105PN.
- Novikova T.I. Use of biotechnological approaches for the conservation of plant biodiversity. *Rastitelnyy mir Aziatskoy Rossii = Plant Life of Asian Russia*. 2013;2(12):119-128. (in Russian)
- Parić A., Cakar J., Muratović E., Karalić E. Induction of bulblets on leaf and bulb explants of endangered *Lilium bosniacum* (G. Beck) G. Beck ex Fritsch. *Botanica Serbica*. 2011;35(1):31-35.
- Poluboyarova T.V., Novikova T.I. Clonal micropropagation of ornamental onions of the subgenus *Melanocrommyum* from flower organs. *Byulleten Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada = Bulletin of the State Nikitskiy Botanical Gardens*. 2013;107:46-52. (in Russian)
- Rakosy-Tican E., Bors B., Szatmari A.-M. *In vitro* culture and medium-term conservation of the rare wild species *Gladiolus imbricatus*. *African J. Biotech.* 2012;11(81):14703-14712. DOI 10.5897/AJB12.784.
- Rani V., Parida A., Raina S. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant. Cell. Report.* 1995;14:459-462. DOI 10.1007/BF00234055.
- Reed B.M., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V.C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant.* 2011;47:1-4. DOI 10.1007/s11627-010-9337-0.
- Shaulo D.N., Erst A.S. A new species of *Fritillaria* L. (Liliaceae) from West Sayan. *Turczaninowia*. 2010;13(3):46-49. (in Russian)
- Song J.Y., Mattson N.S., Jeong B.R. Efficiency of shoot regeneration from leaf, stem, petiole and petal explants of six cultivars of *Chrysanthemum morifolium*. *Plant. Cell Tiss. Org. Cult.* 2011;107:295-304. DOI 10.1007/s11240-011-9980-0.
- Tavartkiladze O.K., Vechernina N.A. Conservation of the plant gene pool in *in vitro* culture collections. *Izvestiya Altayskogo gosudarstvennogo universiteta = Izvestiya of the Altai State University*. 1999;5:13-15. (in Russian)
- Varshney A., Lakshmikumaran M., Srivastava P.S., Dhawan V. Establishment of genetic fidelity of *in vitro*-raised *Lilium* bulblets through RAPD markers. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2001;37:227-231. DOI 10.1007/s11627-001-0040-z.
- Vasil I.K., Thorpe T.A. Plant cell and tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994.
- Vinci V.A., Parekh S.R. Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial and plant cells. New Jersey: Humana Press, 2003. DOI 10.1007/978-1-59259-346-0.
- Zvyagina N.S., Dorogina O.V., Krasnikov A.A. Genetic differentiation and karyotype variation in *Hedysarum chajrakanicum*, an endemic species of Tuva Republic, Russia. *Indian J. Experim. Biol.* 2016; 54(5):338-344.



Криобанк генетических ресурсов кошачьих

С.Я. Амстиславский¹✉, В.И. Мокроусова^{1, 2}, В.В. Кожевникова^{1, 2}, Е.А. Кизилова^{1, 2}, Е.Ю. Брусенцев¹,
К.А. Окотруб³, В.А. Напримеров^{1, 4}, С.В. Найденов⁵

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт автоматики и электрометрии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

⁵ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

Многие из существующих видов кошачьих находятся под угрозой исчезновения или уязвимы. Остальные представители этого семейства включают в себя исчезающие подвиды. Лишь очень немногие из кошачьих, кроме домашней кошки, не входят в группу риска. Криоконсервация эмбрионов и гамет является современным подходом к сохранению генетических ресурсов млекопитающих *ex situ*. Замораживание семени было применено к домашнему коту и более чем к 25 диким представителям этого семейства. Однако криоконсервация эмбрионов и ооцитов была успешной для небольшого числа видов кошек. Только у домашнего кота и у четырех диких представителей семейства кошачьих получено потомство после криоконсервации и последующей трансплантации эмбрионов. В отношении ооцитов разные способы замораживания и криоконсервации до сих пор экспериментально отрабатываются только на домашней кошке. В Новосибирске в ИЦиГ СО РАН создан криобанк генетических ресурсов, содержащий замороженные образцы семени дальневосточного лесного кота, красной и евразийской рыси. В результате разработаны оригинальные методы замораживания семени кошачьих. Заморожены эмбрионы домашней кошки, разрабатываются подходы к замораживанию ооцитов кошачьих. По отношению к эмбрионам и гаметам кошачьих использованы биологические и физические методы. В частности, в ходе процесса замораживания эмбрионов и ооцитов ведется мониторинг происходящих в них изменений при помощи метода комбинационного рассеяния света. В данном исследовании использованы различные способы оценки жизнеспособности замороженно-оттаянных сперматозоидов и эмбрионов, включающие в себя прижизненное окрашивание и последующие флуоресцентную и световую микроскопию, а также гетерологичное экстракорпоральное оплодотворение.

Ключевые слова: кошачьи; криоконсервация генетических ресурсов; комбинационное рассеяние света; репродуктивные технологии.

Genome resource banking in the family Felidae

S.Ya. Amstislavsky¹✉, V.I. Mokrousova^{1, 2},
V.V. Kozhevnikova^{1, 2}, E.A. Kizilova^{1, 2},
E.Yu. Brusentsev¹, K.A. Okotrub³,
V.A. Naprimerov^{1, 4}, S.V. Naidenko⁵

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Automation and Electrometry SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

⁵ Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russia

Many of the extant Felidae species are endangered or vulnerable. Others being not endangered as a whole species contain endangered subspecies. Only a very few cat species, besides domestic cats, are not in the risk group. Cryopreservation of embryos and gametes is a modern approach for *ex situ* mammalian genetic resources conservation. Freezing of semen has been successfully applied to the domestic cat and to more than 25 wild members of this family. However, embryos/oocytes cryopreservation was successful for only a small number of felids. Domestic cat and four wild Felidae species produced offspring after cryopreservation and subsequent embryo transfer. Regarding freezing of oocytes, so far different cryopreservation methods are still being experimentally tried exclusively for domestic cat. Genome Resource Bank (GRB) containing frozen semen of Amur leopard cat, bobcat and Eurasian lynx was established at the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk. As a result of this project, original methods of feline semen freezing have been developed; embryos of domestic cat have been successfully frozen as well. Approaches to freeze domestic cat's oocytes have also been tried. During this work, we combined biological and physical methods. In particular, the process of freezing embryos and oocytes was monitored with Raman spectroscopy. Different methods of frozen-thawed spermatozoa and embryonic viability testing were used in this study, including vital staining and subsequent fluorescent and light microscopy, and heterologous *in vitro* fertilization.

Key words: Felidae; cryopreservation of genome resources; Raman spectroscopy; reproductive technologies.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Амстиславский С.Я., Мокроусова В.И., Кожевникова В.В., Кизилова Е.А., Брусенцев Е.Ю., Окотруб К.А., Напримеров В.А., Найденов С.В. Криобанк генетических ресурсов кошачьих. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):561-568. DOI 10.18699/VJ17.27-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Amstislavsky S.Ya., Mokrousova V.I., Kozhevnikova V.V., Kizilova E.A., Brusentsev E.Yu., Okotrub K.A., Naprimerov V.A., Naidenko S.V. Genome resource banking in the family Felidae. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):561-568. DOI 10.18699/VJ17.27-o (in Russian)

Received 17.01.2017

Accepted for publication 06.02.2017

Online 23.06.2017

© AUTHORS, 2017

Домашняя кошка – пожалуй, самый распространенный питомец, в мире обитает более 600 млн представителей этого вида. В семейство кошачьих (Felidae) помимо домашней кошки входят еще дикие виды. Систематика семейства кошачьих разработана достаточно подробно (Johnson et al., 2006; O'Brien et al., 2008). Из 38 видов современных диких кошачьих имеется только семь крупных кошек, пять из которых составляют «большую пятерку» и объединены в род пантер: ирбис, леопард, ягуар, лев, тигр (вес от 55 кг у ирбиса, до 300 кг и более – у тигра), к ним примыкают по размеру пума и гепард (их вес достигает 40–60 кг). Поскольку для больших кошек необходима достаточно обширная территория для охоты и обитания, становится понятным, почему такие крупные виды кошачьих, как тигр, азиатский лев, ирбис и некоторые подвиды леопарда, стали исчезающими. Фонды сохранения диких животных оказывают основное внимание этим большим кошкам. Остальные представители диких кошек имеют вес тела не более 30 кг (Mattern, McLennan, 2000). Средним и мелким кошкам уделяется несравненно меньше средств и усилий со стороны научного сообщества и фондов, занимающихся сохранением дикой природы, хотя 13 из 31 вида мелких кошачьих находятся под угрозой вымирания (Brodie, 2009).

Традиционные способы сохранения популяций исчезающих видов, к сожалению, не всегда применимы для кошачьих. Разведение их в неволе крайне трудоемко, более того, выращенные в неволе животные теряют способность выживать в дикой природе (Amstislavsky et al., 2008). Для создания же охраняемых территорий обитания кошачьим необходимо выделить очень большие площади, что затруднительно в условиях расширяющейся хозяйственной деятельности человека. Выходом в такой ситуации может быть криоконсервация генетических ресурсов, благодаря которой можно сохранять генетическое разнообразие диких видов кошачьих *ex situ* (Абрамова и др., 2014; Амстиславский и др., 2017).

Замороженные сперматозоиды – основа криобанка кошачьих

Успешная криоконсервация семени домашнего кота была впервые продемонстрирована еще в 1970-е годы прошлого столетия. В первом эксперименте семя замораживали в гранулах, охлаждая его при температуре сухого льда, без какого-либо контейнера, и после этого погружали в жидкий азот (Platz et al., 1978). Семя кошачьих обычно подвергают замораживанию и криоконсервации в специальных соломинах, изготовленных из пластика, выдерживающего охлаждение до температуры жидкого азота (Gañán et al., 2009a, b; Амстиславский и др., 2017).

К настоящему времени было заморожено семя не только от домашних, но и от многих видов диких кошачьих (таблица). Однако, поскольку с дикими видами работать приходится вне привычного окружения лаборатории, это может создавать определенные сложности.

В настоящее время в ИЦиГ СО РАН (Новосибирск) активно ведутся работы по созданию криобанка генетических ресурсов кошачьих. Кроме семени нескольких пород домашних котов, здесь в замороженном виде сохраняется семя дальневосточного лесного кота, рыжей и евразийской

рыси. Семя получено и заморожено нами в содружестве с группой С.В. Найдено (ИПиЭ РАН им. А.Н. Северцова, Москва) и помещено в криобанк в Новосибирске. При замораживании семени этих видов мы успешно использовали криопротекторные смеси, разработанные для других млекопитающих. Так, CaniPlusFreeze (Minitube, Германия) была изначально разработана для замораживания семени псовых, а SpermFreeze (FertiPro, Бельгия) используют в клиниках экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) для замораживания семени человека. Обе криопротекторные смеси были впервые применены нами по отношению к кошачьим.

Качество семени оценивали как до, так и после замораживания. В своей практике мы использовали методы оценки сперматозоидов кошачьих с помощью компьютеризированного анализатора спермы (Абрамова и др., 2014), а также применяли методы двойной окраски – флуорохромами (SYBR Green I и PI) с последующей конфокальной микроскопией либо эозином-нигрозином в сочетании со световой микроскопией. Последний метод наиболее удобен для использования в полевых условиях, в которых иногда приходится работать с дикими котами. В настоящее время окрашивание эозином-нигрозином используется нами применительно к семени домашнего кота, дальневосточного лесного кота, красной и евразийской рыси (рис. 1).

Для оценки оплодотворяющей способности семени проводится тестовое гомологическое или гетерологическое оплодотворение яйцеклеток своего или близкородственного вида соответственно. Существует два метода такого оплодотворения – искусственное осеменение (ИО) предварительно простимулированной гормонами самки и экстракорпоральное оплодотворение яйцеклеток, извлеченных из яичника. Тестовое оплодотворение наиболее точно показывает жизнеспособность семени и успешность его криоконсервации.

Криоконсервация эмбрионов кошек

Эмбриотехнологии, используемые на кошачьих, ориентированы главным образом на сохранение исчезающих видов этого семейства. Соответственно, работы по криоконсервации эмбрионов Felidae сводятся к их получению, хранению и трансплантации.

Общий период преимплантационного развития у домашней кошки чуть менее двух недель, т.е. имплантация происходит через 12 дней после спаривания или на 11-й день после овуляции яйцеклетки (Denker et al., 1978; Swanson et al., 1994). Хорошо известна динамика развития эмбрионов домашней кошки в течение первой недели, за этот период они успевают достичь стадии морулы и бластоцисты. Первый цикл дробления завершается через сутки после оплодотворения. Затем дробление становится асинхронным, и на следующие сутки можно видеть эмбрионы, состоящие из 3, 4 и 5 клеток. На 5–6-е сут культивирования эмбрионы становятся многоклеточными. При развитии *in utero* на 6-е сутки после спаривания эмбрионы достигают морулы и даже ранней бластоцисты и попадают из яйцеводов в матку (Swanson et al., 1994). Сходный график развития сохраняется при получении и культивировании эмбрионов *in vitro* (Roth et al., 1994).

Wildlife felids whose semen was cryopreserved

Species/subspecies	Reference
Lion (<i>Panthera leo</i>)	Thuwanut et al., 2013
Snow leopard (<i>Panthera uncia</i>)	Fickel et al., 2007
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	Swanson et al., 2003
Tiger (<i>Panthera tigris</i>)	Donoghue et al., 1993
Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	Thuwanut et al., 2013
North-Chinese leopard (<i>Panthera pardus japonensis</i>)	Fickel et al., 2007
Amur leopard (<i>Panthera pardus orientalis</i>)	»
Clouded leopard (<i>Neofelis nebulosa</i>)	Pukazhenthii et al., 2006
Fishing cat (<i>Prionailurus viverrinus</i>)	Thiangtum et al., 2006
Flat-headed cat (<i>Prionailurus planiceps</i>)	Thuwanut et al., 2011
Leopard cat (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	Ha et al., 2011
Amur leopard cat (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>)	Amstislavsky et al., 2017
Eurasian lynx (<i>Lynx lynx</i>)	Fickel et al., 2007; Amstislavsky et al., 2017
Iberian lynx (<i>Lynx pardinus</i>)	Gañán et al., 2009a
Bobcat (<i>Lynx rufus</i>)	Gañán et al., 2009b; Amstislavsky et al., 2017
Cougar (<i>Puma concolor</i>)	Swanson et al., 2003
Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	Terrell et al., 2012
Jaguarundi (<i>Herpailurus yagouaroundi</i>)	Swanson et al., 2003
Ocelot (<i>Leopardus pardalis</i>)	Swanson et al., 2003; Stoops et al., 2007; Baudi et al., 2008
Oncilla (<i>Leopardus tigrinus</i>)	Swanson et al., 2003; Baudi et al., 2008
Colocolo (<i>Leopardus colocolo</i>)	Swanson et al., 2003
Margay (<i>Leopardus wiedii</i>)	»
Geoffroy's cat (<i>Leopardus geoffroyi</i>)	»
Pallas's cat (<i>Felis manul</i>)	Fickel et al., 2007
Black-footed cat (<i>Felis nigripes</i>)	Herrick et al., 2010
Sand cat (<i>Felis margarita</i>)	»
Jungle cat (<i>Felis chaus</i>)	Thuwanut et al., 2013

С целью криоконсервации эмбрионов кошачьих обычно применяют медленное программное замораживание (Dresser et al., 1988; Gómez et al., 2003; Swanson, Brown, 2004; Pope et al., 2012). В первом эксперименте по замораживанию эмбрионов кошачьих, проведенном нами в нашей лаборатории по модифицированному протоколу программного замораживания, предложенного М.С. Gómez с коллегами (2003), заморожено пять эмбрионов домашней кошки. Эмбрионы были получены после гомологического оплодотворения и последующего культивирования в течение двух суток. После оттаивания два эмбриона были окрашены флуорохромами FDA/PI для оценки их жизнеспособности. Один из двух эмбрионов, как показано на рис. 2, после процедуры замораживания-оттаивания остался живым (флуоресцентный сигнал в бластомерах).

Наряду с относительно медленным программным замораживанием, в настоящее время очень популярным

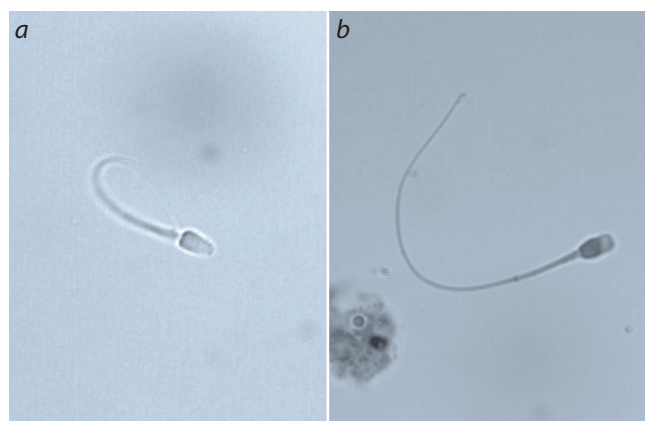


Fig. 1. Example of eosin-nigrosine staining of semen after cryopreservation: (a) Living spermatozoon of the Amur leopard cat (not stained), (b) dead spermatozoon of the Eurasian lynx (stained).

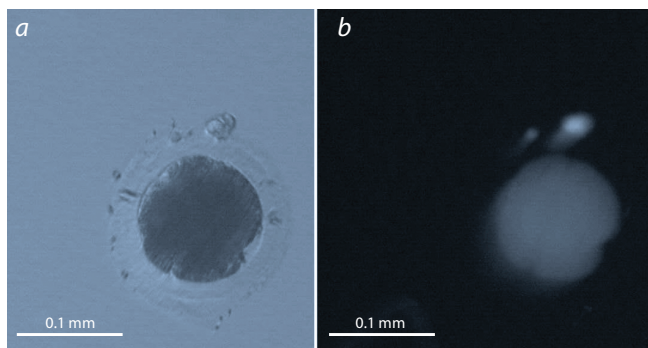


Fig. 2. Embryo of the domestic cat obtained after IVF with cryopreserved domestic cat semen, frozen on the second day of development, thawed, and stained with a mixture of fluorochromes (FDA and PI):

(a) Light microscopy, (b) fluorescence microscopy after double staining with FDA/PI.

является сверхбыстрое охлаждение, называемое витрификацией. Несмотря на то что при витрификации используют обычно такие же криопротекторы, как и при программном замораживании, концентрация их в 4–5 раз выше (Shaw, Jones, 2003). Если при программном замораживании скорость охлаждения составляет обычно один градус в минуту или даже десятые доли градуса в минуту, то при витрификации скорость охлаждения биологического материала составляет обычно от 200 до 20 тыс. градусов в минуту (Shaw, Jones, 2003). По отношению к эмбрионам домашней кошки программное замораживание пока дает лучшие результаты, чем витрификация (Pore et al., 2012). Возможной причиной этого является повышенная чувствительность эмбрионов кошачьих к высоким дозам криопротектора, что, по всей видимости, обусловлено высоким содержанием липидных гранул в цитоплазме эмбрионов и ооцитов кошачьих (Karja et al., 2006).

В первой успешной работе по замораживанию кошачьих эмбрионов (Dresser et al., 1988) применяли глицерин в качестве криопротектора и стандартную программу замораживания эмбрионов, используемую для домашнего скота (Leibo, Songsasen, 2002). В наши дни для криоконсервации эмбрионов кошачьих чаще всего применяют этиленгликоль (Swanson, Brown, 2004) или пропиленгликоль (Gómez et al., 2003). Эти два криопротектора лучше проникают через клеточные мембраны, чем глицерин (Pedro et al., 2005).

В дальнейшем успешной криоконсервации подвергались эмбрионы домашней кошки (Dresser et al., 1988), африканской дикой кошки (Pore, 2000), оцелота (Conforti et al., 2008), каракала (Pore et al., 2006). Относительно недавно опубликован результат работы по успешной криоконсервации эмбрионов исчезающего вида кошачьих, обитающего на юге Африки, – черноногий кошки (*Felis nigripes*), причем после криоконсервации эмбрионы были успешно трансплантированы реципиентам не только своего, но и другого вида, т.е. домашней кошке (Pore et al., 2012). После криоконсервации эмбрионы были разморожены и трансплантированы самкам-реципиентам, что закончилось получением живого потомства.

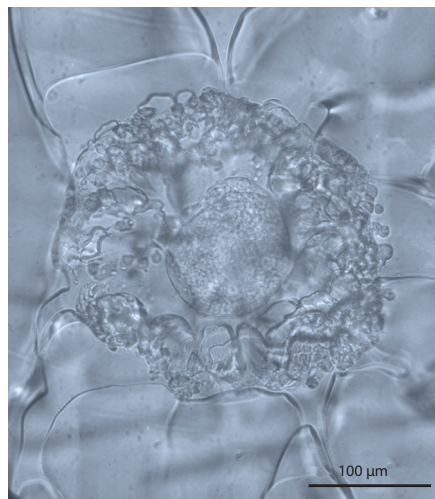


Fig. 3. A domestic cat oocyte surrounded by cumulus cells (cumulus-oocyte complex, COC) in the process of freezing and studying by Raman spectroscopy. Ice crystals are visible around the oocyte ($T = -47^\circ\text{C}$).

Замораживание яйцеклеток кошек: технология будущего

Криоконсервация ооцитов для всех видов млекопитающих обычно менее эффективна, чем криоконсервация эмбрионов. Одно из осложнений при этом – затвердевание прозрачной оболочки, что препятствует успешному проникновению спермиев при проведении последующего ЭКО (Амстиславский и др., 2015). Однако существуют и другие осложнения; для зрелых ооцитов наиболее существенно нарушение веретена деления (Амстиславский и др., 2017). С незрелыми ооцитами проблем еще больше. Они окружены несколькими слоями кумулюсных клеток (рис. 3). В данном случае низкая проницаемость мембраны и наличие слоев кумулюса препятствуют насыщению их криопротектором, что осложняет процесс замораживания (Cocchia et al., 2010). Кроме того, для незрелых ооцитов серьезным негативным последствием криоконсервации может быть нарушение связей между ооцитом и клетками кумулюса, окружающими и питающими ооцит. Ооциты кошачьих содержат большое количество липидных капель, которые тоже могут негативно влиять на результаты криоконсервации.

Несмотря на описанные сложности криоконсервации яйцеклеток кошек, имеются отдельные обнадеживающие работы. Так, например, С.Е. Поре с коллегами из центра по исследованию исчезающих видов (Новый Орлеан, США) удалось успешно витрифицировать созревшие ооциты домашней кошки, затем оплодотворить их при помощи интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) и после трансплантации реципиентам получить живых котят (Pore et al., 2012). Недавно при помощи традиционного ЭКО и трансплантации эмбрионов реципиенту удалось получить живого котенка из подвергнутого липидной поляризации и витрификации ооцита (Galiguis et al., 2014).

Криоконсервация незрелых ооцитов представляет собой наиболее заманчивую возможность для сохранения

генетических ресурсов, так как у самок большинства видов млекопитающих именно в виде незрелых ооцитов находится до 99 % всего запаса гамет. По некоторым оценкам, в яичнике молодой кошки имеется около 75000 ооцитов, из них лишь менее 1 % ооцитов находится в составе растущих фолликулов (Jewgenow, Paris, 2006). На практике же нам удавалось из двух яичников кошки извлекать в среднем 30–50 КОК, которые могут дозреть *in vitro*. Такое большое число способных к созреванию ооцитов объясняет, почему замораживание незрелых ооцитов весьма перспективно при криоконсервации женских гамет кошачьих. Интересно, что сравнение витрификации и программного замораживания незрелых ооцитов домашней кошки, проведенное в лаборатории Г.С. Лювони в Милане (Италия), свидетельствует в пользу программного замораживания (Luciano et al., 2009), так же как и при криоконсервации эмбрионов.

Криоконсервация клетки неразрывно связана с физическими процессами, протекающими при глубоком охлаждении материалов. Таким образом, совершенно естественным подходом является привлечение физических методов для изучения криоконсервации гамет и эмбрионов кошачьих.

В настоящее время наиболее перспективной физической методикой для исследования замораживаемых клеток представляется спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС; в англоязычной литературе обычно используется термин “Raman spectroscopy”). Эффект КРС заключается в том, что если облучить исследуемое вещество монохроматическим излучением, то некоторая небольшая часть рассеянного света меняет свою длину волны. Это изменение вызвано молекулярными колебаниями, и, если измерить длины волн, то можно делать выводы о том, на каких частотах колеблются молекулы в исследуемом веществе. Поскольку спектры для многих веществ уже изучены, путем сравнения можно отслеживать концентрацию криопротектора, изучить агрегатное состояние и фазовые переходы замораживаемого вещества непосредственно в области, на которую направлен монохроматический лазерный луч. Поскольку свет можно сфокусировать в очень малый объем, метод КРС используют для исследования вещества, причем с высоким пространственным разрешением. Спектроскопия КРС хорошо сочетается с криомикроскопией и позволяет одновременно наблюдать за эмбрионом или ооцитом (см. рис. 3, 4) и получать дополнительную информацию о том, что с ним происходит на субклеточном уровне. В частности, с помощью КРС возможно изучать изменения, происходящие в отдельных липидных каплях эмбрионов.

На рис. 4 показаны спектры КРС от липидной капли эмбриона кошки, измеренные в начале процесса заморозки ($T = +10\text{ }^{\circ}\text{C}$) и на промежуточном этапе ($T = -35\text{ }^{\circ}\text{C}$). В спектроскопии КРС принято строить спектры не в длинах волн (нанометрах), а в частотах, причем частоты измеряют в обратных сантиметрах (1 см^{-1} составляет 30 ГГц). При сравнении двух спектров видно, что при охлаждении возникает острый пик на частоте 2880 см^{-1} . Эта линия, а также линия на 2850 см^{-1} относятся к двум колебаниям C-H_2 связи в липидах. Но если линия на 2850 см^{-1} (и соответствующее колебание) практически

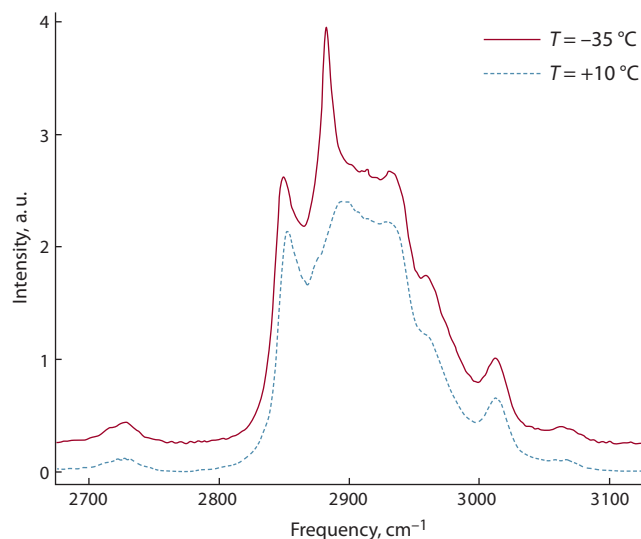


Fig. 4. Raman spectra measured from lipid drops of the cat embryo at various stages of the freezing process.

не чувствительна к температуре, то пик на 2880 см^{-1} при плюсовых температурах незаметен, а с понижением температуры он становится более узким и визуально «заостряется». Наблюдаемый эффект объясняется тем, что с понижением температуры происходит упорядочение неполярных углеродных цепочек липидов, а когда все цепочки оказываются в приблизительно одинаковом конформационном состоянии, то и их колебания попадают на одну и ту же частоту (2880 см^{-1}). То есть происходит фазовый переход липидов внутриклеточной липидной капли из состояния «флюид» в состояние «гель».

Эту информацию невозможно получить с помощью криомикроскопии, но она крайне важна, поскольку нормальное функционирование клеток происходит только при условии, если липиды (и в жировых каплях, и в мембранах) находятся в так называемом флюидном, неупорядоченном состоянии. Для понимания внутриклеточных процессов, происходящих в отдельных клетках эмбриона, очень важно знать, при каких температурах происходит это конформационное изменение состояния липидов жировых капель и мембран. Особенно это важно для кошачьих, поскольку в эмбрионах кошачьих таких липидных капель очень много и от их состояния зависит правильность хода процессов замораживания и криоконсервации.

В настоящее время имеется только небольшое число работ по исследованию процессов, происходящих на субклеточном уровне в ходе программного замораживания или витрификации эмбрионов и ооцитов кошачьих. Перспективным способом «заглянуть внутрь» процесса замораживания является развиваемый нами подход с применением комбинационного рассеяния света как метода изучения замораживаемых объектов (Karpagina et al., 2016). В данном случае физический метод КРС помогает понять процессы, имеющие место в липидах мембран и внутриклеточных жировых каплях, но с помощью этого метода можно исследовать многие другие процессы в

клетках, например изменения во внутриклеточной дыхательной цепи, происходящие в ходе замораживания эмбрионов или ооцитов. Таким образом, спектроскопия КРС позволяет значительно расширить возможности в исследовании процесса замораживания преимплантационных эмбрионов и ооцитов кошачьих.

Гибридизация – создание новых кошачьих пород и сохранение диких кошек

В зоопарках мира часто получают межвидовые гибриды крупных кошек, такие как лигр (гибрид льва и тигрицы), тигон (гибрид тигра и львицы), леопон (гибрид леопарда и львицы), и многие другие. Гибриды за пределами рода пантер известны меньше, но, тем не менее, возникают в самых различных комбинациях, в тех случаях, когда человек намеренно стремится их получить. Довольно часто эти случаи остаются неподтвержденными, однако имеются подтвержденные, описанные в научных журналах, случаи гибридизации, например, между самцом оцелота и самкой пумы (Dubost, Royère, 1993) или между самцом льва и самкой леопарда (Florio, 1983). При этом попытки получить межвидовой гибрид почти всегда сопряжены со сложностями, связанными с поведенческими и репродуктивными барьерами.

Межвидовая гибридизация кошачьих встречается не только в неволе, но и в дикой природе. Так, на севере США, в штате Миннесота часто обнаруживают гибриды канадской и рыжей рыси (Schwartz et al., 2004). В Южной Америке, в Бразилии, происходит гибридизация двух местных видов – онциллы и кота Жоффруа – там, где ареалы этих видов пересекаются (Trigo et al., 2013). Во многих европейских странах отмечается гибридизация домашнего и европейского дикого лесного кота (Oliveira et al., 2008; Randi, 2008).

Поскольку в настоящее время репродуктивные технологии применительно к кошачьим бурно развиваются, удалось получить гибриды кошачьих *in vitro* – в виде эмбрионов – путем гетерологического оплодотворения семенем одного вида кошачьих яйцеклеток другого вида. В подавляющем большинстве современных работ гетерологическое оплодотворение рассматривается лишь как тест для проверки оплодотворяющей способности семени диких видов кошачьих. Описаны дробящиеся гибридные эмбрионы при проведении ЭКО яйцеклеток домашней кошки семенем манула, леопарда, гепарда, рыжей рыси. Особый интерес представляют работы, выполненные с участием исчезающих видов кошачьих, таких как пиренейская рысь (*Lynx pardinus*), кот-рыболов (*Prionailurus viverrinus*), суматранская кошка (*Prionailurus planiceps*). В этих случаях получены гибридные эмбрионы, развившиеся *in vitro* до стадии морулы и даже бластоцисты (Thiangtum et al., 2006; Gañán et al., 2009a, b; Thuwanut et al., 2011).

Данный способ может стать со временем одним из важных инструментов выведения новых гибридных пород, поскольку таким путем удается преодолеть межвидовые репродуктивные этологические барьеры. Наши собственные эксперименты по получению межродовых гибридов путем ЭКО семенем дальневосточного лесного кота яйцеклеток домашней кошки недавно увенчались успехом (рис. 5).

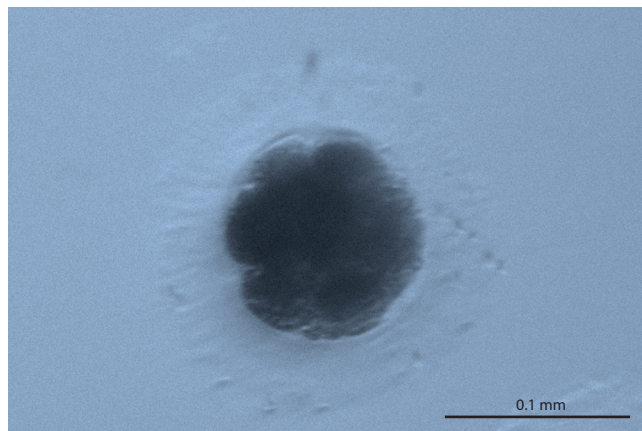


Fig. 5. A hybrid embryo between domestic cat and Amur leopard cat produced *in vitro* at the Sector of Cryopreservation and Reproduction Technologies ICG SB RAS.

Как показано экспериментально, межвидовая трансплантация у кошачьих может приводить к рождению живого потомства (Gómez, 2009; Pope et al., 2012), однако эффективность этого метода весьма низкая. Межвидовые гибриды можно использовать для восстановления видов, поскольку, как показали наши собственные исследования на куньих (Amstislavsky et al., 2004) и мохноногих хомячках (Brusentsev et al., 2015), гибридные самки являются идеальными реципиентами для трансплантации эмбрионов обоих родительских видов, в том числе взятых из криобанка. При таком подходе (трансплантации эмбрионов межвидовым гибридам) метод становится эффективным и результативность достигает 50 % (Amstislavsky et al., 2004; Brusentsev et al., 2015), т. е. во много раз выше, чем во всех работах без применения гибридов. Особенно эффективен этот подход при наличии криобанка. Таким образом, криоконсервация генетических ресурсов в сочетании с набором других репродуктивных технологий – перспективный метод сохранения исчезающих видов кошачьих.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects 15-04-03258 and 16-04-01221, and State Budgeted Project 0324-2016-0002. The keeping of animals at the research station in Chernogolovka was supported by the project “Living collections of wild animals”.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abramova T.O., Kizilova E.A., Maslennikova S.O., Rozhkova I.N., Bayborodin S.I., Brusentsev E.Y., Naydenko S.V., Amstislavsky S.Y. Feline semen cryopreservation. *Biofizika zhivoy kletki* = *Living Cell Biophysics*. 2014;10:17-19. (in Russian)
- Amstislavsky S., Aalto J., Järvinen M., Lindeberg H., Valtonen M., Zudova G., Ternovskaya Y. Transfer of European mink (*Mustela lutreola*) embryos into hybrid recipients. *Theriogenology*. 2004;62(3):458-467. DOI 10.1016/j.theriogenology.2003.10.011.
- Amstislavsky S.Y., Brusentsev E.Y., Okotrub K.A., Rozhkova I.N. Embryo and gamete cryopreservation for the conservation of labora-

- tory animal genetic resources. *Ontogenez* = *Ontogenesis* (Moscow). 2015;46(2):67-81. DOI 10.7868/S0475145015020020. (in Russian)
- Amstislavsky S.Y., Kozhevnikova V.V., Muzyka V.V., Kizilova E.A. Reproductive biology and genome resource bank of Felidae. *Ontogenez* = *Ontogenesis* (Moscow). 2017;48(2):93-106. DOI 10.7868/S0475145017020021. (in Russian)
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Aalto J., Kennedy M.W. Conservation of the European mink (*Mustela lutreola*): focus on reproduction and reproductive technologies. *Reprod. Dom. Anim.* 2008;43(4):502-513. DOI 10.1111/j.1439-0531.2007.00950.x.
- Baudi D.L.K., Jewgenow K., Pukazhenth B.S., Spercoski K.M., Santos A.S., Reghelin A.L.S., Candido M.V., Javorouski M.L., Muller G., Morais R.N. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive *in vitro* binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*. 2008;69(2):204-211. DOI 10.1016/j.theriogenology.2007.09.013.
- Brodie J.F. Is research effort allocated efficiently for conservation? Felidae as a global case study. *Biodivers. Conserv.* 2009;18(11):2927-2939. DOI 10.1007/s10531-009-9617-3.
- Brusentsev E., Abramova T.O., Rozhkova I.N., Igonina T.N., Naprimerov V.A., Feoktistova N., Amstislavsky S. Cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Reprod. Dom. Anim.* 2015;50(4):677-683. DOI 10.1111/rda.12564.
- Cocchia N., Ciani F., Russo M., El Rass R., Rosapane I., Avallone L., Tortora G., Lorizio R. Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSS) using a cryoprotectant mixture. *Cryobiology*. 2010;60(2):229-234. DOI 10.1016/j.cryobiol.2010.01.003.
- Conforti V.A., Adania C.H., Gonzalez P.G., de Oliveira C., Swanson W.F. 155 novel recipient synchronization regimens for successful embryo transfer in the Brazilian ocelot following long-term frozen embryo storage. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008;21(1):176-177. DOI 10.1071/RDv21n1Ab155.
- Denker H.W., Eng L.A., Hamner C.E. Studies on the early development and implantation in the cat. *Anat. Embryol.* 1978;154(1):39-54. DOI 10.1007/BF00317953.
- Donoghue A.M., Johnston L.A., Armstrong D.L., Simmons L.G., Wildt D.E. Birth of a Siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination. *J. Zoo Wild. Med.* 1993;24(2):185-189. DOI 10.1638/1042-7260(2000)031[0566:BOSTPT]2.0.CO;2.
- Dresser B.L., Gelwicks E.J., Wachs K.B., Keller G.L. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. *J. Exp. Zool.* 1988;246(2):180-186. DOI 10.1002/jez.1402460210.
- Dubost G., Royère J.Y. Hybridization between ocelot (*Felis pardalis*) and puma (*Felis concolor*). *Zoo Biol.* 1993;12(3):277-283. DOI 10.1002/zoo.1430120305.
- Fickel J., Wagener A., Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur. J. Wildlife Res.* 2007;53(2):81-89. DOI 10.1007/s10344-007-0089-z.
- Florio P.L. Birth of a lion × leopard hybrid in Italy. *Int. Zoo News.* 1983;178(30/2):4-6.
- Galiguis J., Gómez M.C., Leibo S.P., Pope C.E. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized *in vitro* matured oocytes. *Cryobiology*. 2014;68(3):459-466. DOI 10.1016/j.cryobiol.2014.02.012.
- Gañán N., González R., Garde J.J., Martínez F., Vargas A., Gomen-dio M., Roldan E.R. Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 2009a;21(7):848-859. DOI 10.1071/RD08226.
- Gañán N., González R., Sestelo A., Garde J.J., Sánchez I., Aguilar J.M., Gomen-dio M., Roldan E.R.S. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous *in vitro* fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology*. 2009b;72(3):341-352. DOI 10.1016/j.theriogenology.2009.03.002.
- Gómez M.C., Pope E., Harris R., Mikota S., Dresser B.L. Development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology*. 2003;60(2):239-251. DOI 10.1016/S0093-691X(03)00004-9.
- Ha A.N., Jo A.R., Kim Y.G., Yoon J.H., Bang J.I., Deb G.K., Fakruz-zaman M., Lim Y.M., Yong H.Y., Kong I.K. Establishment of cryo-preservation of leopard cat semen collected by electro-ejaculation method. *J. Embryo Transfer*. 2011;26(4):245-250. DOI 10.1292/jvms.15-0439.
- Herrick J.R., Campbell M., Levens G., Moore T., Benson K., D'Agostino J., West G., Okeson D.M., Coke R., Portacio S.C., Kreider C., Polumbo P.J., Swanson W.F., Leiske K. In vitro fertilization and sperm cryopreservation in the black-footed cat (*Felis nigripes*) and sand cat (*Felis margarita*). *Biol. Reprod.* 2010;82(3):552-562. DOI 10.1095/biolreprod.109.081034.
- Jewgenow K., Paris M.C. Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. *Theriogenology*. 2006;66(1):93-100. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.03.010.
- Johnson W.E., Eizirik E., Pecon-Slaterry J., Murphy W.J., Antunes A., Teeling E., O'Brien S.J. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science*. 2006;311(5757):73-77. DOI 10.1126/science.1122277.
- Karja N.W.K., Otoi T., Wongsrikeao P., Murakami M., Agung B., Fahrudin M., Nagai T. *In vitro* development and post-thaw survival of blastocysts derived from delipidated zygotes from domestic cats. *Theriogenology*. 2006;65(2):415-423. DOI 10.1016/j.theriogenology.2005.04.029.
- Karpegina Y.A., Okotrub K.A., Brusentsev E.Y., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V. Cryoprotectant redistribution along the frozen straw probed by Raman spectroscopy. *Cryobiology*. 2016;72(2):148-153. DOI 10.1016/j.cryobiol.2016.01.002.
- Leibo S.P., Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*. 2002;57(1):303-326. DOI 10.1016/S0093-691X(01)00673-2.
- Luciano A.M., Chigioni S., Lodde V., Franciosi F., Luvoni G.C., Modina S.C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology*. 2009;59(1):90-95. DOI 10.1016/j.cryobiol.2009.05.002.
- Mattern M.Y., McLennan D.A. Phylogeny and speciation of felids. *Cladistics*. 2000;16(2):232-253. DOI 10.1111/j.1096-0031.2000.tb00354.x.
- O'Brien S.J., Johnson W., Driscoll C., Pontius J., Pecon-Slaterry J., Menotti-Raymond M. State of cat genomics. *Trends Genet.* 2008;24(6):268-279. DOI 10.1016/j.tig.2008.03.004.
- Oliveira R., Godinho R., Randi E., Ferrand N., Alves P.C. Molecular analysis of hybridisation between wild and domestic cats (*Felis silvestris*) in Portugal: implications for conservation. *Conserv. Genet.* 2008;9(1):1-11. DOI 10.1007/s10592-007-9297-z.
- Pedro P.B., Yokoyama E., Zhu S.E., Yoshida N., Valdez Jr. D.M., Tanaka M., Edashige K., Kasai M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *J. Reprod. Dev.* 2005;51(2):235-246. DOI 10.1262/jrd.16079.
- Platz C.C., Wildt D.E., Seager S.W.J. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1978;52(2):279-282. DOI 10.1530/jrf.0.0520279.
- Pope C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*. 2000;53(1):163-174. DOI 10.1016/S0093-691X(99)00249-6.
- Pope C.E., Gómez M.C., Dresser B.L. In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. *Theriogenology*. 2006;66(6):1518-1524. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.01.026.
- Pope C.E., Gómez M.C., Galiguis J., Dresser B.L. Applying embryo cryopreservation technologies to the production of domestic and black-footed cats. *Reprod. Dom. Anim.* 2012;47(s6):125-129. DOI 10.1111/rda.12053.
- Pukazhenth B., Laroe D., Crosier A., Bush L.M., Spindler R., Pelican K.M., Bush M., Howard J.G., Wildt D.E. Challenges in cryopre-

- servation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. Theriogenology. 2006;66(6):1790-1796. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.02.020.
- Randi E. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. Mol. Ecol. 2008;17(1):285-293. DOI 10.1111/j.1365-294X.2007.03417.x.
- Roth T.L., Howard J.G., Donoghue A.M., Swanson W.F., Wildt D.E. Function and culture requirements of snow leopard (*Panthera uncia*) spermatozoa *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 1994;101(3):563-569. DOI 10.1530/jrf.0.1010563.
- Schwartz M.K., Pilgrim K.L., McKelvey K.S., Lindquist E.L., Claar J.J., Loch S., Ruggiero L.F. Hybridization between Canada lynx and bobcats: genetic results and management implications. Conserv. Genet. 2004;5(3):349-355. DOI 10.1023/B:COGE.0000031141.47148.8b.
- Shaw J.M., Jones G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. Hum. Reprod. Update. 2003;9(6):583-605. DOI 10.1093/humupd/dmg041.
- Stoops M.A., Bond J.B., Bateman H.L., Campbell M.K., Levens G.P., Bowsher T.R., Shannon T.F., Swanson W.F. Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous *in vitro* fertilisation success in the ocelot (*Leopardus pardalis*). Reprod. Fertil. Dev. 2007;19(5):685-694. DOI 10.1071/RD06078.
- Swanson W.F., Brown J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. Anim. Reprod. Sci. 2004;82:21-34. DOI 10.1016/j.anireprosci.2004.05.008.
- Swanson W.F., Johnson W.E., Cambre R.C., Citino S.B., Quigley K.B., Brousset D.M., Morais R.N., Moreira N., O'Brien S.J., Wildt D.E. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for *ex situ* conservation. Zoo Biol. 2003;22(5):421-441. DOI 10.1002/zoo.10093.
- Swanson W.F., Roth T.L., Wildt D.E. *In vivo* embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. Biol. Reprod. 1994;51(3):452-464.
- Terrell K.A., Wildt D.E., Anthony N.M., Bavister B.D., Leibo S.P., Penfold L.M., Marker L.L., Crosier A.E. Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa. Cryobiology. 2012;64(2):110-117. DOI 10.1016/j.cryobiol.2011.12.006.
- Thiangtum K., Swanson W.F., Howard J., Tunwattana W., Tongthainan D., Wichasilpa W., Patumrattanathan P., Pinyopoommintr T. Assessment of basic seminal characteristics, sperm cryopreservation and heterologous *in vitro* fertilisation in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*). Reprod. Fertil. Dev. 2006;18(3):373-382. DOI 10.1071/RD05098.
- Thuwanut P., Chatdarong K., Bergqvist A.S., Söderqvist L., Thiangtum K., Tongthainan D., Axné E. The effects of antioxidants on semen traits and *in vitro* fertilizing ability of sperm from the flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*). Theriogenology. 2011;76(1):115-125. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.01.024.
- Thuwanut P., Srisuwatanasagul S., Wongbandue G., Tanpradit N., Thongpakdee A., Tongthainan D., Manee-In S., Chatdarong K. Sperm quality and the morphology of cryopreserved testicular tissues recovered post-mortem from diverse wild species. Cryobiology. 2013;67(2):244-247. DOI 10.1016/j.cryobiol.2013.07.002.
- Trigo T.C., Schneider A., de Oliveira T.G., Lehugeur L.M., Silveira L., Freitas T.R., Eizirik E. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. Curr. Biol. 2013;23(24):2528-2533. DOI 10.1016/j.cub.2013.10.046.



Роль условий среды пренатального роста плодов в формировании массы новорожденной особи у домашних свиней

С.В. Никитин¹✉, С.П. Князев², В.И. Ермолаев¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный аграрный университет, кафедра разведения, кормления и частной зоотехнии, Новосибирск, Россия

В настоящее время массу новорожденной особи у домашних свиней не причисляют к селекционно-значимым хозяйственно ценным континуальным количественным признакам сельскохозяйственных животных, хотя она и обладает всеми необходимыми для этого атрибутами. Последнее, в совокупности с тем, что масса новорожденного поросенка не подвергается стандартизирующему отбору, делает ее удобной моделью для изучения особенностей данной группы признаков. Настоящее исследование показало, что относительный вклад условий среды пренатального роста плодов в вариацию массы новорожденных поросят составляет 0.4717, генотипической компоненты – 0.4032, взаимодействия условий среды с неоднозначностью связи генотип–фенотип – 0.0846, неопределенности фенотипической реализации генотипов однопомётников – 0.0405. Вероятно, среди факторов, формирующих условия среды пренатального роста, главную роль играет материнский ресурс, направляемый на рост и развитие плодов. Ресурс этот ограничен, а так как делится он между всеми плодами, то, чем их больше, тем меньше доля отдельного индивидуума. Как следствие, должен существовать верхний предел значений признака, который и будет определять среднюю массу новорожденной особи в помёте. Зависимость массы новорожденной особи у домашних свиней от условий пренатального роста плодов существенно сказывается на оценке успешности прогнозирования параметров данного признака. Оказывается, что для прогнозирования среднего значения и стандартного отклонения массы новорожденной особи у домашних свиней, соблюдение идентичности условий среды имеет большее значение, чем идентичность генотипов в исходной и результирующей (прогнозируемой) группах особей. Положительный эффект идентичности условий среды превосходит в четыре раза эффект идентичности среднего генотипа группы при прогнозе среднего значения и в полтора раза – при прогнозе стандартного отклонения. Поскольку многие количественные продуктивные признаки, подобно массе новорожденной особи у домашних свиней, имеют одностороннее ограничение диапазона вариации, неудивительно, что соблюдению условий содержания сельскохозяйственных животных уделяется внимания не меньше, чем собственно селекции.

Ключевые слова: условия среды; пренатальный рост; масса новорожденной особи; домашние свиньи; коэффициент повторяемости; успешность прогнозирования.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Никитин С.В., Князев С.П., Ермолаев В.И. Роль условий среды пренатального роста плодов в формировании массы новорожденной особи у домашних свиней. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):569-575. DOI 10.18699/VJ17.273

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Nikitin S.V., Knyazev S.P., Ermolayev V.I. The influence of prenatal environmental conditions on the weight of newborn domestic pigs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):569-575. DOI 10.18699/VJ17.273 (in Russian)

The influence of prenatal environmental conditions on the weight of newborn domestic pigs

S.V. Nikitin¹✉, S.P. Knyazev², V.I. Ermolayev¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

The weight of newborn piglets in domestic pigs depends on the maternal environment. Using an original algorithm based on the comparison of the coefficients of correlation between the half-nests (the same average genotype and the same conditions of the embryonic environment) and the twin sockets (the same genotype, different conditions of the embryonic environment), it was possible to estimate the relative contribution of the various components to the weight of the newborn in the domestic pigs. Our investigation found that the relative contribution of environmental conditions during prenatal development into newborn weight variation is equal to 0.4717, the contribution of genotypic component is 0.4032; the contribution of interaction between environmental conditions and ambivalence of the "genotype–phenotype" relationships is 0.0846, indeterminacy of phenotypic realization of the littermate's genotypes is 0.0405. Maternal resource plays the main role amongst factors forming the environmental conditions of prenatal development. The gene pool will remain unchanged in any number of generations, despite a change in the population parameters of the trait. In principle, it can be assumed that when a population reaches a certain level, when the mean value of the trait and the gene pool are optimal (the selection pressure vectors are mutually balanced), selection becomes less effective in transforming the average phenotype than changing environmental conditions. Obviously, therefore, livestock maintenance and feeding are paid as much attention as breeding, and breeds of farmed animals are zoned.

Key words: environment conditions; prenatal development; newborn weight; domestic pigs; coefficient of repeatability; forecast's successfulness.

Масса новорожденной особи у домашних свиней – типичный для данного вида сельскохозяйственных животных континуальный количественный полилокусный признак роста, в генетическом контроле которого могут участвовать от семи до двадцати трех или более локусов (Rottschild et al., 2007; NCBI Map Viewer, 2011). Молекулярно-генетические исследования, направленные на обнаружение все новых локусов, контролирующих вариацию массы новорожденного поросенка, успешно продолжают и в настоящее время (Wang et al., 2016). Помимо того, на массу новорожденного поросенка существенно влияют условия внутриутробной среды материнского организма и неопределенность фенотипической реализации генотипа, обусловленная неоднозначностью связи генотип–фенотип (Nikitin et al., 2014a, b). Очевидно поэтому, несмотря на возможность участия в формировании признака значительного числа локусов (NCBI Map Viewer, 2011), непосредственный вклад генотипов родительской пары обеспечивает менее половины его вариации у потомков (Nikitin et al., 2014a). При этом данная оценка не зависит ни от принадлежности к крупной или мелкой форме домашней свиньи, ни от числа полиморфных локусов, контролирующих массу новорожденных в изучаемой популяции (Князев и др., 2013; Никитин, Князев, 2015). Это несомненный результат условий внутриутробной среды, неоднозначности связи генотип–фенотип, неопределенности фенотипической реализации генотипов и взаимодействия этих факторов. Неоднозначность связи генотип–фенотип означает, что каждому отдельному генотипу соответствует множество фенотипов, а отдельному фенотипу – множество генотипов (Knyazev, Nikitin, 2011; Nikitin et al., 2012). Неопределенность фенотипической реализации генотипа заключается в том, что любой из генотипов по локусам, контролирующим признак, способен случайным образом реализоваться в виде любого из его биологически возможных в данных условиях значений (Nikitin et al., 2014b; Никитин, Князев, 2015). Таким образом, фенотип особи в первую очередь будет зависеть от условий среды, определяющих границы диапазона вариации признака (в нашем исследовании – массы новорожденной особи), и только во вторую – от генотипа особи и, соответственно, числа полиморфных локусов, контролирующих признак в популяции.

Целью настоящего исследования является оценка относительного вклада условий внутриутробной среды в формирование массы новорожденной особи у домашних свиней.

Материалы и методы

Исследование проводилось на выборке гнезд свиней породы ландрас с числом взвешенных при рождении особей не менее восьми, родившихся в период с 1964 по 1986 г. в Экспериментальном хозяйстве СО АН СССР. (Гнездо – специальный термин, обозначающий в свиноводстве группу однопомётников.) При принятой в хозяйстве системе воспроизводства это составило 46 туров опоросов – по два опороса в год на свиноматку. Общее число гнезд равно 2680, число новорожденных особей – 29481. В каждом гнезде определили среднее значение массы особи при рождении и стандартное отклонение от него.

Далее каждое гнездо было случайным образом разделено на две части и построен корреляционный ряд из 2680 пар полугнезд. Во второй корреляционный ряд вошли 270 пар гнезд, в каждой из которых повторялись оба родителя. В полугнездах и парных гнездах были вычислены средние значения и стандартные отклонения признака и определены коэффициенты корреляции для каждого из этих параметров.

Стандартное отклонение и среднее значение признака – параметры, первый из которых описывает ширину диапазона вариации признака, а второй – указывает положение «центра тяжести» этого диапазона на шкале возможных для данного признака значений. Используя генетическую терминологию, среднее значение признака можно определить как *средний фенотип* группы особей. Однако существование среднего фенотипа автоматически подразумевает и существование такого абстрактного, чисто формального понятия, как *средний генотип* группы особей. Сопоставляя эти два понятия, можно сказать, что средний генотип группы описывает то, что может быть (потенциальное значение признака), а средний фенотип – то, что из этого получилось (реализованное значение признака). Стандартное отклонение признака является величиной, описывающей ширину области, в которой находятся индивидуальные фенотипы, формирующие средний фенотип группы. Тогда разнообразию выборочных фенотипов будет соответствовать разнообразие выборочных генотипов, формирующих средний генотип группы.

Пары полугнезд и парные гнезда являются сопряженными группами с одинаковыми или почти одинаковыми средними генотипами. Различие между ними заключается в том, что пренатальный рост особей, составляющих пары полугнезд, проходил в идентичных условиях, а парных гнезд – в различных.

Чтобы уравновесить и, таким образом, нивелировать погрешности, обусловленные неравномерным распределением генотипов и влиянием других случайных факторов, исходные ряды преобразовали в симметричные. Для этого в исходной последовательности пар меняли местами ряды, после чего исходную и обратную ей измененную последовательность объединяли в один ряд вдвое большей численности. В результате генетическая корреляция в парных группах sibсов равна единице, расположение значений на графике симметрично относительно линии генетической корреляции, коэффициент линейной регрессии равен коэффициенту корреляции (рис. 1). В сущности, все это просто графическая интерпретация формулы $r = \sqrt{b_{yx} b_{xy}}$, где r – коэффициент корреляции, b_{yx} и b_{xy} – коэффициенты регрессии. Достоверность коэффициентов корреляции и статистическую значимость различий между ними оценивали критерием Стьюдента после z-преобразования Фишера (Лакин, 1990). При оценке достоверности коэффициентов корреляции в симметричных рядах использовали исходное (не удвоенное) число пар сравнения.

Оценка успешности прогнозирования внутригнездового среднего значения и стандартного отклонения массы новорожденной особи основывается на предположении о том, что полученный результат, при соблюдении определенных условий, может быть воспроизведен повторно.

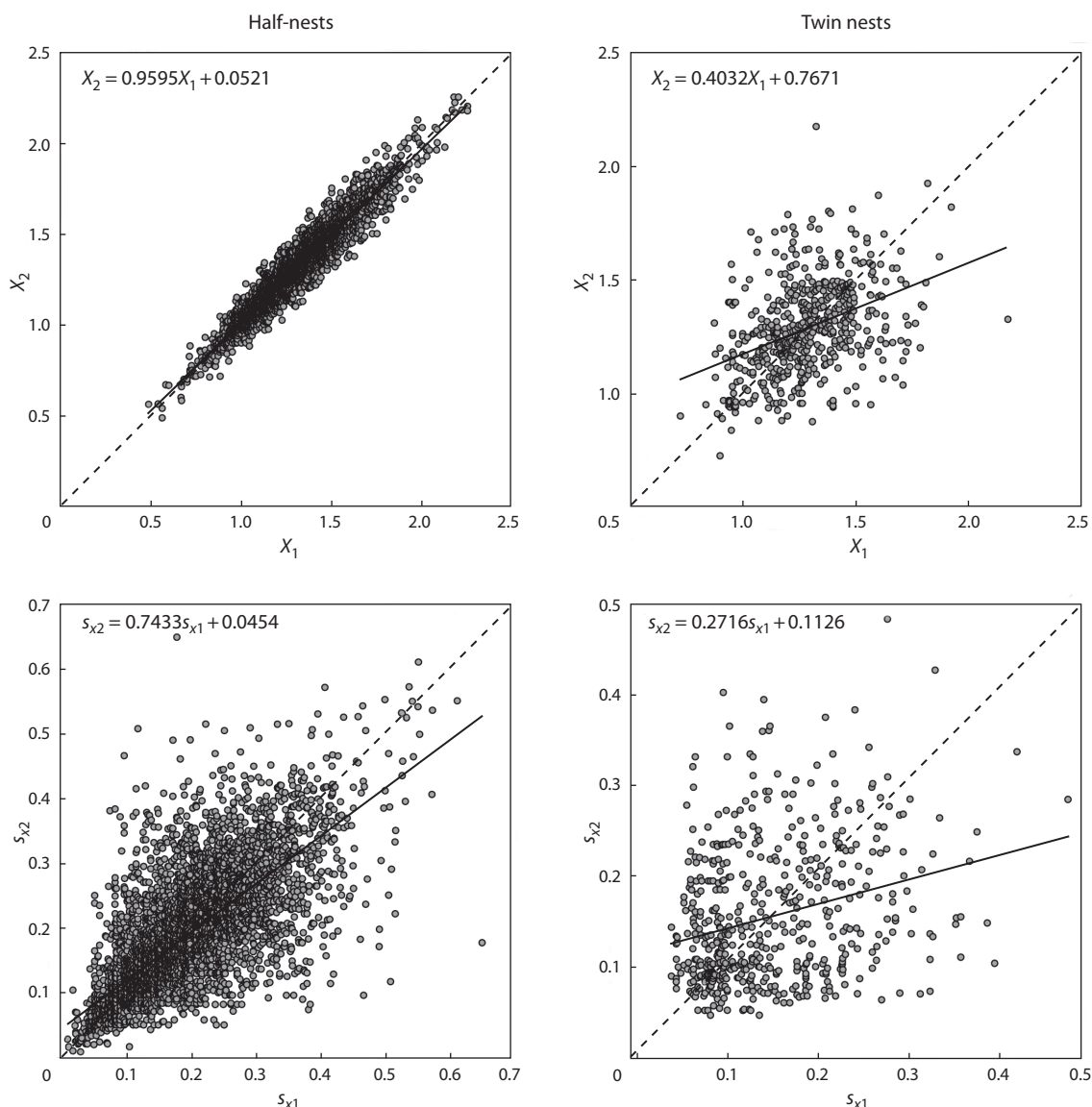


Fig. 1. Deviations of plots of phenotypic correlations of mean values (X_1 and X_2) and standard deviations (s_{x1} and s_{x2}) of piglet weight at birth in half-nests and twin nests (solid lines) from genetic correlation curves (dashed line).

Для такой оценки можно использовать уже известные эмпирические параметры признака в сравниваемых группах особей. Одну из этих групп (любую) можно принять как условно исходную – ее данные принимаются в качестве прогноза, другую – как условно результативную, в ней этот прогноз должен осуществиться (или не осуществиться). В качестве оценки исполнения прогноза использовали 5%-й порог достоверности различий в парах сравнения. Если различие недостоверно – статистически незначимо ($P > 0.05$), прогноз исполнился, если различие достоверно ($P < 0.05$), прогноз не исполнился. В данном случае «достоверность» сама по себе не имеет какого-либо значения, а соответствующий критерий применяется как показатель, по которому результат прогноза может быть отнесен к одной из двух групп.

Успешность прогнозирования параметров признака оценивали по частоте пар, разница между которыми была

статистически незначимой, в представительной выборке пар сравнения. В анализе были использованы три такие выборки: 1) контроль – в паре сравнения различны и средние генотипы, и условия пренатального роста (в контрольной выборке гнезда были объединены в пары случайным образом); 2) парные гнезда – в паре сравнения идентичны средние генотипы, но различны условия пренатального роста; 3) пары полугнезд – в паре сравнения идентичны и средние генотипы, и условия пренатального роста.

Достоверность различий в парах сравнения оценивали для средних значений критерием Стьюдента, для стандартных отклонений, после преобразования в дисперсии, – критерием Фишера (Лакин, 1990). Ошибку доли при значении равно единице считали по формуле $m_{p=0} = m_{p=1} = \frac{1}{n+1}$, где n – объем выборки (Плохинский, 1969). В остальных случаях ошибки считали общепри-

нятыми методами (Лакин, 1990). Частоты успешных прогнозов близкие к 0.5 (вероятность успешного прогноза равна вероятности неуспешного прогноза) сравнивали с этой величиной, используя ее как генеральную долю. Для оценки достоверности различия частот применяли критерий Стьюдента (Лакин, 1990).

Результаты

Коэффициенты регрессии–корреляции внутригнездовых средних значений и стандартных отклонений массы новорожденной особи являются коэффициентами повторяемости, а это означает, что они представляют собой верхнюю границу наследуемости – генетически детерминированной доли вариации в общей вариации указанных параметров признака (Никоро и др., 1968). Таким образом, коэффициенты повторяемости внутригнездовых средних значений и стандартных отклонений могут быть использованы для получения оценок относительного вклада факторов, участвующих в формировании массы новорожденной особи у домашних свиней.

В полугнездах влияние условий среды пренатального роста на повторяемость средних значений и стандартных отклонений массы новорожденной особи исключено, так как эти условия в каждой паре идентичны. В парных гнездах это влияние присутствует, следовательно, коэффициенты повторяемости внутригрупповых параметров в парных гнездах будут ниже, чем в парах полугнезд. Стандартное отклонение признака более чувствительно к флуктуациям, вносимым единичными особями, чем среднее значение, так как значение признака у отдельной особи зависит от неопределенности фенотипической реализации ее генотипа значительно сильнее, чем средний фенотип группы особей с идентичными генотипами. Поэтому повторяемость стандартных отклонений как в полугнездах, так и в парных гнездах должна быть ниже повторяемости средних значений.

Исследование показало статистическую значимость положительных коэффициентов повторяемости средних значений и стандартных отклонений массы новорожденной особи в полугнездах и парных гнездах, а также их достоверное отличие от коэффициента генетической корреляции (табл. 1). Как и ожидалось, в полугнездах коэффициенты повторяемости оказались достоверно выше, чем в парных гнездах, а повторяемость средних значений достоверно выше повторяемости стандартных отклонений (см. табл. 1).

Применение симметричных рядов нивелировало все источники случайной неравномерности в корреляционных парах, в том числе и неравномерность распределения генотипов. Поэтому разность коэффициентов повторяемости среднего значения и стандартного отклонения можно трактовать как вклад генотипического разнообразия в вариацию признака. Превосходство величины, полученной в полугнездах, над величиной, полученной в парных гнездах, является следствием влияния условий среды на ширину реализованного диапазона вариации признака. Массе новорожденной особи у домашних свиней свойственна неоднозначность связи генотип–фенотип: разные генотипы могут быть реализованы в виде одного и того же фенотипа, а один и тот же генотип – в виде разных

фенотипов (Knyazev, Nikitin, 2011). Вызванное условиями среды сужение диапазона вариации признака, снижая число возможных для реализации фенотипов, имитирует снижение генотипического разнообразия, тогда как увеличение диапазона вариации будет, наоборот, имитировать его увеличение. Таким образом, полученная в полугнездах (где влияние среды исключено) величина $\Delta_r = 0.2162$ (см. табл. 1) объединяет в себе две компоненты: генетического разнообразия и взаимодействия неоднозначности связи генотип–фенотип с условиями среды. В то же время величина $\Delta_r = 0.1316$ (см. табл. 1), полученная в парных гнездах (где влияние среды присутствует), содержит только компоненту генотипического разнообразия. Следовательно, разность этих величин, равная 0.0846, показывает относительный вклад взаимодействия неоднозначности связи генотип–фенотип и условий среды в вариацию массы новорожденной особи у домашних свиней. В свою очередь, коэффициент повторяемости стандартных отклонений парных гнезд, равный 0.2716 (см. табл. 1), может быть принят как относительная величина собственно генетической компоненты вариации массы новорожденной особи.

В выборке полугнезд разность коэффициентов генетической корреляции и повторяемости среднего значения признака $1-r = 0.0405$ (см. табл. 1) представляет собой компоненту неопределенности фенотипической реализации среднего генотипа или, другими словами, средний для группы генотипов вклад неопределенности фенотипической реализации в вариацию признака. В парных гнездах коэффициенты повторяемости средних значений и стандартных отклонений статистически значимо меньше, чем в полугнездах (см. табл. 1), а их разности с коэффициентом генетической корреляции соответственно больше, так как содержат компоненту влияния условий среды. Приняв, что полученные на парах полугнезд оценки относительного вклада различных компонент в вариацию массы новорожденной особи применимы и для парных гнезд, вычисляем вклад условий среды в вариацию массы новорожденной особи у домашних свиней как разность коэффициентов повторяемости стандартных отклонений в полугнездах и парных гнездах, равную 0.4717 (см. табл. 1).

Таким образом, наибольшее воздействие на массу новорожденной особи оказывают условия пренатального роста. Это влияние содержит две компоненты: первую, определяющую границы доступного для реализации диапазона вариации признака (0.4717), и вторую, представляющую взаимодействие этих условий с неоднозначностью связи генотип–фенотип (0.0846) и определяющую фенотипическую реализацию конкретных генотипов. Второе место занимает влияние генотипов однопомётников, которое также включает две компоненты: собственно генетическую информацию группы индивидуумов (0.2716) и генотипическое разнообразие этой группы (0.1316). На последнем месте находится независимая от условий среды неопределенность фенотипической реализации среднего генотипа (0.0405).

Важным прикладным аспектом генетических исследований сельскохозяйственных животных является оценка прогнозируемости хозяйственно полезных признаков. Собственно говоря, это главное, а возможно, и единст-

Table 1. Repeatability of weight at birth under identical and nonidentical prenatal growth conditions

Repeatability factor	Half-nests		Twin nests		Difference (Δ_r)
	r	$1-r$	r	$1-r$	
Mean values	0.9595, $P < 0.001$	0.0405, $P < 0.01$	0.4032, $P < 0.001$	0.5968, $P < 0.001$	0.5563, $P < 0.001$
Standard deviations	0.7433, $P < 0.001$	0.2567, $P < 0.001$	0.2716, $P < 0.001$	0.7284, $P < 0.001$	0.4717, $P < 0.001$
Difference (Δ_r)	0.2162, $P < 0.001$		0.1316, $P < 0.01$		0.0846

Table 2. Success of the prediction of mean values and standard deviations of weight at birth in domestic pigs

Group	Number of pairs	Frequency of pairs with insignificant differences	
		Mean value	Standard deviation
Control	2680	0.446 ± 0.0096	0.428 ± 0.0096
Twin nests	270	0.552 ± 0.0303	0.630 ± 0.0294
Half-nests	2680	1.000 ± 0.0004	0.976 ± 0.0030

венное, что интересует селекционеров-практиков в исследованиях такого рода. Масса новорожденной особи у домашних свиней обладает атрибутами, присущими хозяйственно полезным количественным признакам, но, в отличие от них, не подвергается стандартизирующему отбору. Последнее особенно важно, так как позволяет избежать искажений, вносимых этой формой отбора в результаты исследований селекционно-значимых продуктивных признаков (Князев, Никитин, 2011; Бекенёв и др., 2012; Никитин и др., 2014; Никитин, Князев, 2015). Именно поэтому мы использовали массу новорожденной особи у домашних свиней в качестве модели, на которой оценивали успешность прогноза для среднего значения и стандартного отклонения количественного, полилокусного признака, подверженного влиянию условий внешней среды.

Исследование показало, что в контрольной группе, где пары составлены из неродственных гнезд, частота пар с недостоверным различием наименьшая, а различие по данному показателю между средним значением и стандартным отклонением признака незначимо (табл. 2). Частота пар с недостоверным различием статистически значимо больше нуля (критерий Стьюдента t_ϕ равен 46.47 и 44.58 для среднего значения и стандартного отклонения соответственно), но статистически значимо меньше генеральной доли, равной 0.5 (5.4 %, $t_\phi = 5.59$, $P < 0.001$ и 7.2 %, $t_\phi = 7.45$, $P < 0.001$ для среднего значения и стандартного отклонения соответственно).

В выборке парных гнезд частота пар с недостоверным различием статистически значимо выше, чем в контрольной группе: $t_\phi = 3.33$ ($P < 0.001$) для среднего значения и $t_\phi = 7.46$ ($P < 0.001$) для стандартного отклонения признака. Для стандартных отклонений частота пар с недостоверным различием несколько выше, чем для средних значений, однако это превышение недостоверно ($t_\phi = 1.85$). Таким образом, идентичность средних генотипов в исходной и результативной группе может обеспечить определенный успех в прогнозировании признака, но это

успех только по сравнению с контрольной группой (см. табл. 2). Сравнение с генеральной долей, равной 0.5, показывает, что для среднего значения превышение частоты пар с недостоверным различием составляет всего 5.2 %, что статистически незначимо ($t_\phi = 1.74$). Для стандартного отклонения это превышение достоверно ($t_\phi = 4.35$, $P < 0.001$) и составляет 13.0 %. Таким образом, положительное влияние идентичности средних генотипов на эффективность прогнозов средних значений невелико. Частота пар с недостоверным различием в выборке полугнезд для среднего значения равна, а для стандартного отклонения близка к единице (см. табл. 2). Она достоверно выше, чем в парных гнездах, для обоих параметров массы новорожденной особи ($t_\phi = 14.78$, $P < 0.001$ и $t_\phi = 11.71$, $P < 0.001$ соответственно для среднего значения и стандартного отклонения признака), в связи с чем нет необходимости в сравнениях с контрольной группой и генеральной долей.

В целом исследование показывает, что у домашних свиней успешность прогнозирования внутригруппового среднего значения и стандартного отклонения массы новорожденной особи в большей степени зависит от идентичности условий среды пренатального роста, чем от идентичности средних генотипов (рис. 2). При прогнозировании среднего значения эффект идентичности условий среды в четыре раза превосходит эффект идентичности средних генотипов. Для стандартного отклонения это превосходство менее существенно – всего в полтора раза.

В связи со спецификой изучаемого признака в исследовании отсутствует выборка пар, где в исходной и результативной группе разные средние генотипы, но идентичные условия пренатального роста. Попытаемся оценить возможную частоту пар с недостоверным различием средних значений и стандартных отклонений в такой гипотетической выборке. В качестве эффекта идентичности условий среды может быть принята разность частот пар с недостоверным различием между полугнездами и парными гнездами. Вместе с вычисленной обще-

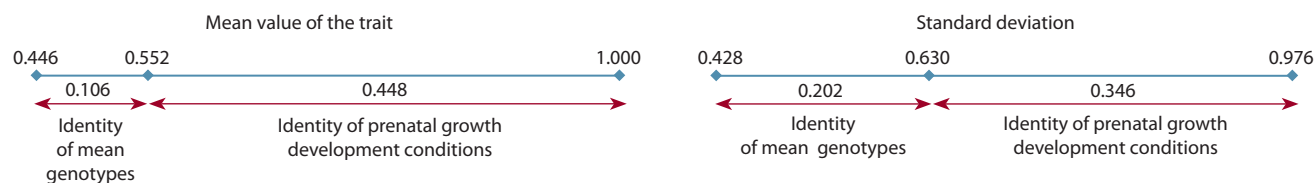


Fig. 2. Effect of the identity of mean genotypes and prenatal development conditions on the frequency of pairs with insignificant differences of the mean value and standard deviation of weight at birth in domestic pigs.

Relative contributions are shown as fractions of unity.

принятым методом ошибкой она составит: для средних значений 0.448 ± 0.0303 , для стандартных отклонений – 0.346 ± 0.0296 . Приняв, что характеристикам базовой совокупности, в которой отсутствуют идентичность средних генотипов и условий среды, соответствует контрольная выборка, вычисляем характеристики совокупности, где в сопряженных группах разные средние генотипы, но идентичные условия пренатального роста. В такой совокупности частота пар с недостоверным различием средних значений составит 0.894 ± 0.0318 , а с недостоверным различием стандартных отклонений – 0.774 ± 0.0311 . То есть эти показатели статистически значимо превосходят показатели выборки парных гнезд, в которой идентичны средние генотипы, но различны условия пренатального роста ($t_{\phi} = 7.79$, $P < 0.001$ и $t_{\phi} = 3.36$, $P < 0.001$ соответственно для среднего значения и стандартного отклонения).

Проведенное моделирование позволяет сделать два предположения. Первое из них, чисто утилитарное, заключается в том, что для признаков, подобных массе новорожденной особи у домашних свиней, стабильности в ряду поколений проще и легче добиться соблюдением постоянства технологических условий содержания и кормления, что, собственно, и происходит в промышленном свиноводстве. Второе предположение носит теоретический характер. Заключается оно в том, что в процессе пренатального онтогенеза оптимизация массы новорожденной особи у домашних свиней осуществляется материнским организмом, а генетический потенциал потомков имеет второстепенное значение. Это предположение вполне согласуется с полученными ранее результатами, показывающими, что на вклад родительской пары в генотипы потомков не влияет ни принадлежность к крупной или мелкой форме домашних свиней, ни число полиморфных локусов, контролирующих признак в популяции (Князев и др., 2013; Nikitin et al., 2014a; Назарова и др., 2015; Nikitin, Князев, 2015). Таким образом, вектор отбора, направленный на совершенствование материнского механизма оптимизации массы новорожденных потомков, подавляет действие описанного ранее вектора отбора, направленного на увеличение массы новорожденных поросят у домашних свиней (Назарова и др., 2015), что и приводит к стабильности данного признака в популяциях домашней формы *S. s. domesticus* вида *Sus scrofa*.

Обсуждение

Масса новорожденной особи у домашних свиней – признак, зависимый от условий материнской среды (Knott et al., 1998; Wada et al., 2000; Bidanel et al., 2001), который имеет полилокусную детерминацию (Rothschild et al.,

2007; NCBI Map Viewer, 2011) и выраженное приспособительное значение (Князев, Никитин, 2014; Nikitin et al., 2014b; Никитин, Князев, 2015). Кроме того, данному признаку свойственны неоднозначность связи генотип–фенотип и неопределенность фенотипической реализации генотипов (Nikitin et al., 2014a, b; Никитин, Князев, 2015). Перечисленными качествами могут обладать и другие селекционно-значимые адаптивные количественные признаки животных. В ситуациях, связанных с изменением условий среды, взаимодействие случайности фенотипической реализации и обусловленного средой диапазона доступных значений признака способно уже в первом поколении, рожденном в новых условиях, обеспечить появление адаптированных к ним фенотипов (Князев, Никитин, 2014; Никитин, Князев, 2015), а изменения генофонда могут произойти и позднее. Или не произойти, если неопределенность фенотипической реализации полностью компенсирует ущерб, нанесенный изменением среды обитания. В первом случае вероятности реализации генотипов в виде конкретного фенотипа не равны, поэтому доля генотипов, которые чаще реализуются в центральной части нового диапазона значений признака, будет увеличиваться со сменой поколений до момента достижения оптимальной в данных условиях величины. На возможность такого варианта в отношении массы новорожденной особи у домашних свиней указывают выполненные ранее исследования (Князев, Никитин, 2014; Nikitin et al., 2014b; Никитин, Князев, 2015). Во втором случае вероятности реализации генотипов в виде любого фенотипа равны, поэтому генофонд останется неизменным любое число поколений, несмотря на изменение популяционных параметров признака.

Исследование выявило корреляции, отражающие влияние среды пренатального роста плодов на массу новорожденных поросят у домашних свиней. Положительная корреляция между внутригнездовыми средними значениями и стандартными отклонениями обусловлена наличием верхнего предела вариации признака, который синхронно снижает указанные параметры (Князев и др., 2016). Отрицательная корреляция между числом потомков в помёте и минимальной массой новорожденной особи указывает на то, что фактором, ограничивающим внутригнездовые средние значения признака, является материнский ресурс, направляемый на рост и развитие плодов. Поскольку этот ресурс ограничен и делится на всех однопомётников, то, чем их больше, тем меньше «достается» каждому, и тем меньше будет средняя масса новорожденной особи. Очевидно, этим и объясняется описанное в литературе влияние числа новорожденных поросят в гнезде на их

массу, жизнеспособность и рост в ранний постнатальный период (Иоганссон и др., 1970; Кабанов, 1983; Andersen et al., 2011; Князев, Никитин, 2014). Обнаруженные в настоящем исследовании корреляции, вероятно, отражают действие механизма оптимизации средней массы новорожденных поросят, который подавляет действие вектора естественного отбора, направленного у домашних свиней на увеличение массы новорожденной особи (Назарова и др., 2015).

Оценка успешности прогнозирования внутригнездовых средних значений и стандартных отклонений массы новорожденной особи у домашних свиней показала важную роль условий среды, которые могут иметь большее значение, чем генетическое сходство исходной и прогнозируемой групп особей. В принципе, можно предположить, что при достижении популяцией определенного уровня, когда среднее значение признака и генофонд оптимальны (векторы селекционного давления взаимно уравновешены), отбор становится менее эффективным преобразователем среднего фенотипа, чем изменение условий среды. Очевидно поэтому, в животноводстве соблюдению условий содержания и кормления уделяется не меньшее внимание, чем селекции, а породы сельскохозяйственных животных районированы.

Acknowledgments

This work was supported in part by State Budgeted Project 0324-2015-0004.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andersen I.L., Nævdal E., Bøe K.E. Maternal investment, sibling competition, and offspring survival with increasing litter size and parity in pigs (*Sus scrofa*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2011;65(6):1159-167.
- Bekenev V.A., Dement'yev V.N., Ermolaev V.I., Goncharenko G.M., Deeva V.S., Nikitin S.V., Knyazev S.P., Savina M.A., Orlova G.V., Aitnazarov R.B., Yudin N.S., Zabolotnaya A.A., Frolova V.I. *Geneticheskie metody v selektsii sviney* [Genetics Methods in Pig Breeding]. Novosibirsk: SibNIIZh Publ., 2012. (in Russian)
- Bidanel J.-P., Milan D., Iannuccelli N., Amigues Y., Boscher M.-Y., Bourgeois F., Caritez J.-C., Gruand J., Le Roy P., Lagant H., Quintanilla R., Renard C., Gellin J., Ollivier L., Chevalet C. Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genet. Sel. Evol.* 2001;33:289-309.
- Iogansson I., Rendel' Ya., Gravert O. *Genetika i razvedenie domashnikh zhivotnykh* [Genetics and Breeding of Livestock]. Moscow: Kolos Publ., 1970. (in Russian)
- Kabanov V.D. *Povyshenie produktivnosti sviney* [Improvement of Pig Productivity]. Moscow: Kolos Publ., 1983. (in Russian)
- Knott S.A., Marklund L., Haley C.S., Andersson K., Davies W., Ellegren H., Fredholm M., Hansson I., Hoyheim B., Lundstrom K., Moller M., Andersson L. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and Large White pigs. *Genetics*. 1998;149(2):1069-1080.
- Knyazev S.P., Nikitin S.V. Standardizing selection and its consequences for genetic population structure. *Rus. J. Genetics*. 2011;47(1):90-99.
- Knyazev S.P., Nikitin S.V. Changing selection vectors in breeding for piglet birth weight in the formation of a population in a novel environment. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2014;6:86-95. (in Russian)
- Knyazev S.P., Nikitin S.V., Ermolaev V.I. Genetics of large birth weight in pigs: sexual dimorphism and genetic control of birth weight. *Vestnik Novosibirskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University*. 2013;1:46-57. (in Russian)
- Knyazev S.P., Nikitin S.V., Ermolaev V.I. The role of biological limitations of the maximum weight of a newborn piglet in variations of the trait. *Sbornik trudov nauchno-prakticheskoy konferentsii "Aktualnye problemy agropromyshlennogo kompleksa. Tom Selskokhozyaystvennye nauki. Biologicheskie nauki. Veterinarnye nauki"* [Proceedings of the scientific-practical conference "Current Issues in Agroindustry". Volume "Agricultural sciences, biological sciences, and veterinary sciences"]. Novosibirsk: Novosibirsk State Agrarian University Publ., 2016:175-179. (in Russian)
- Lakin G.F. *Biometriya [Biometrics]*. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1990. (in Russian)
- Nazarova G.G., Proskurnjak L.P., Knyazev S.P., Nikitin S.V. Genetic components of birth weight in two multiparous species of mammals. *Nauchnoe obozrenie = Science Review*. 2015;20:26-36. (in Russian)
- NCBI Map Viewer. 2011. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/.
- Nikitin S.V., Knyazev S.P. *Otbor i adaptatsiya v populyatsiyakh domashnikh sviney* [Selection and Adaptation in Domestic Pig Populations]. Saarbrücken: LAP Lambert Publ., 2015. (in Russian)
- Nikitin S.V., Knyazev S.P., Ermolaev V.I. Animal populations: model and reality. *Nauchnoe obozrenie = Science Review*. 2014;9(2):335-342. (in Russian)
- Nikitin S.V., Knyazev S.P., Ermolaev V.I. Genetic components and the uncertainty of the phenotypic realization of the mass of newborns in domestic pigs *Sus scrofa*. *Rus. J. Genetics*. 2014a;50(1):61-70.
- Nikitin S.V., Knyazev S.P., Yermolaev V.I. Weight variations in newborn domestic pigs and the adaptation process. *Rus. J. Genetics: Appl. Res.* 2014b;4(6):498-510.
- Nikoro Z.S., Stakan G.A., Kharitonova Z.N., Vasil'yeva L.A., Ginzburg E.H., Reshetnikova N.F. *Teoreticheskie osnovy selektsii zhivotnykh* [Theoretical Bases of Animal Breeding]. Moscow: Kolos Publ., 1968. (in Russian)
- Plokhinskiy N.A. *Rukovodstvo po biometrii dlya zootekhnikov* [Guide to Biometrics for Livestock Experts]. Moscow: Kolos Publ., 1969. (in Russian)
- Rothschild M.F., Hu J.-L., Jiang Z. Advances in QTL mapping in pigs. *Int. J. Biol. Sci.* 2007;3(3):192-197.
- Wada Y., Akita T., Awata T., Furukawa T., Sugai N., Inage Y., Ishii K., Ito Y., Kobayashi E., Kusumoto H., Matsumoto T., Mikawa S., Miyake M., Murase A., Shimanuki S., Sugiyama T., Uchida Y., Yanai S., Yasue H. Quantitative trait loci (QTL) analysis in a Meishan × Gottingen cross population. *Anim. Genetics*. 2000;31:376-384.
- Wang X., Liu X., Deng D., Yu M., Li X. Genetic determinants of pig birth weight variability. *BMC Genet.* 2016;17(1):15. DOI 10.1186/s12863-015-0309-6.

Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в этнических группах, проживающих на территории Восточной Сибири

Е.В. Беляева , О.А. Ершова, Т.А. Астахова, О.В. Бугун

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия

Роль глутатион-S-трансфераз в жизнедеятельности клетки и всего организма связана с их участием в процессах детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной защите. Генетическая вариабельность генов глутатион-S-трансфераз проявляется в различной ферментативной активности соответствующих белковых продуктов. В работе представлен сравнительный анализ частоты аллелей и генотипов трех генов суперсемейства глутатион-S-трансфераз (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) у подростков из двух этнических групп – русских и бурят. Для этого было проведено генотипирование образцов ДНК методом полимеразной цепной реакции. Показано, что между сравниваемыми группами подростков наблюдаются статистически значимые различия по частоте встречаемости аллелей *A*, *B*, *C* гена *GSTP1* ($p = 0.026$). Аллель «дикого» типа *A*, кодирующий «активный» вариант фермента, чаще встречается у коренного населения, в этногруппе бурят ($p = 0.012$). Аллель *B*, продуктом которого является «медленный» вариант фермента, напротив, чаще отмечается у пришлого населения, в этногруппе русских ($p = 0.014$). По генам *GSTM1* и *GSTT1* статистически значимых различий по частоте встречаемости «нулевых» и «функциональных» генотипов между сравниваемыми группами не обнаружено. Тем не менее отмечена тенденция увеличения частоты «нулевого» генотипа гена *GSTM1* у пришлого населения; кроме этого, частота «нулевого» генотипа одновременно по двум генам, *GSTM1* и *GSTT1*, в этногруппе русских почти в два раза больше. Полученные данные позволяют высказать предположение о том, что в этногруппе бурят, которая относится к коренному населению Восточной Сибири, лучше сформированы адаптационные механизмы, позволяющие глутатион-S-трансферазам эффективно защищать клетку от токсического действия эндогенных и экзогенных соединений.

Ключевые слова: глутатионтрансферазы; полиморфизм генов; этнические группы; подростки.

Glutathione S-transferase polymorphism in ethnic groups living in Eastern Siberia

E.V. Belyaeva , O.A. Yershova, T.A. Astahova, O.V. Bugun

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

The role of glutathione S-transferase for the life of the cell and the entire organism is related to their participation in the processes of detoxification of xenobiotics and antioxidant protection. Genetic variability of glutathione S-transferases appears in the form of different enzymatic activity of the corresponding protein products. In this study, a comparative analysis was conducted on the frequency of genotypes of three genes in the glutathione S-transferases gene superfamily (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) from representatives of two ethnic groups, Russian and Buryat. To this end, genetic typing of DNA samples was performed by polymerase chain reaction. Statistically significant differences in the frequency of occurrence of alleles *A*, *B*, *C* of the *GSTP1* gene ($p = 0.026$) were found between the groups of teenagers compared. It was found that the frequency of the allele *A*, which codes for the active variant enzyme, is significantly higher in the Buryat ethnic group ($p = 0.012$). The allele *B*, the product of which is a "slow" version of the enzyme, was significantly more common in the Russian ethnic group ($p = 0.014$). In the *GSTM1* and *GSTT1* genes, no statistically significant differences in the frequency of occurrence of "zero" and "functional" genotypes between the compared groups of teenagers were found. However, there was a tendency to increase in the frequency of the "zero" genotype of the *GSTM1* gene in the Russian ethnic group. In addition, the frequency of the "zero" genotype in two genes *GSTM1* and *GSTT1* at once was almost two times higher in the Russian ethnic group than in the Buryat ethnic group.

Key words: glutathione S-transferase; gene polymorphism; ethnic groups; teenagers.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Беляева Е.В., Ершова О.А., Астахова Т.А., Бугун О.В. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в этнических группах, проживающих на территории Восточной Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):576-580. DOI 10.18699/VJ17.274

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Belyaeva E.V., Yershova O.A., Astahova T.A., Bugun O.V. Glutathione S-transferase polymorphism in ethnic groups living in Eastern Siberia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):576-580. DOI 10.18699/VJ17.274 (in Russian)

Гены суперсемейства глутатион-S-трансфераз кодируют аминокислотную последовательность ферментов, которые участвуют в защитных метаболических реакциях, протекающих в клетке, играя важнейшую роль в жизнедеятельности всего организма (Кулинский, 1999). У млекопитающих глутатион-S-трансферазы присутствуют практически во всех органах и тканях и начинают экспрессироваться еще в эмбриональном периоде развития (Van Lieshout et al., 1998; Кулинский, Колесниченко, 2009).

Одна из главных функций глутатион-S-трансфераз – участие в процессах детоксикации ксенобиотиков. Так как эти вещества являются чужеродными для организма, в клетке запускаются метаболические реакции, направленные на снижение их активности (Hayes et al., 2005; Tew, Townsend, 2012; Wu, Dong, 2012). Наряду с детоксикацией глутатион-S-трансферазы участвуют в антиоксидантной защите клетки, восстанавливая органические гидроперекиси до спиртов, в результате чего происходит обезвреживание продуктов перекисного окисления липидов и пероксидов ДНК (Hayes et al., 2005). Сохранение оптимального для клетки соотношения восстановленного и окисленного глутатиона важно для ее жизнеспособности (Калинина и др., 2014).

Классификация глутатион-S-трансфераз основана на сходстве их аминокислотной последовательности и включает восемь классов, обозначенных буквами греческого алфавита: α , ζ , θ , κ , μ , π , σ , ω (Hayes et al., 2005; Wu, Dong, 2012). К настоящему времени наиболее изучены следующие классы глутатион-S-трансфераз: *GSTM*, *GSTT* и *GSTP*. Семейства *GSTM* и *GSTT* состоят из кластера генов. В семействе *GSTP* один фермент и, соответственно, один ген. Гены глутатион-S-трансфераз характеризуются наличием полиморфизмов, что приводит к появлению ферментов с измененной аминокислотной последовательностью. Присутствие изоформ ферментов в генотипе человека эволюционно связано с его адаптацией к различным климатическим, экологическим и другим факторам (Спицин, 2008).

В семействах *GSTM* и *GSTT* наиболее изучен инсерционно/делеционный полиморфизм генов *GSTM1* (глутатионтрансфераза класса μ -1) и *GSTT1* (глутатионтрансфераза класса θ -1). Указанный полиморфизм затрагивает структурную часть генов, что приводит к полному отсутствию соответствующих ферментов. Гены *GSTM1* и *GSTT1* картированы на хромосомах 1 (1p13.3) и 22 (22q11.2) соответственно. Частота гомозигот по делетированным аллелям в различных этнических группах варьирует для генов: *GSTM1* от 35 до 50 %, *GSTT1* – от 25 до 52 %.

В гене *GSTP1* (глутатионтрансфераза класса π -1) наиболее изучен полиморфизм, связанный с заменой нуклеотидов в 313-м и 341-м положениях гена. В результате *A313G* замены при синтезе фермента в 105-м положении пептида аминокислота изолейцин меняется на валин (ile/val). Нуклеотидная замена *C341T* приводит к замене аминокислоты аланин на валин (ala/val) в 114-м положении пептида. Обе мутации находятся в активном центре фермента и значительно снижают его функциональную активность (Ishii et al., 1999). Вышеперечисленные нуклеотидные замены приводят к появлению четырех аллелей гена *GSTP1* – *A*, *B*, *C*, *D*. Аллель *A* – «дикого» типа,

кодирует «активный» вариант фермента, аллели *B*, *C*, *D* имеют нуклеотидные замены и кодируют «медленные» варианты белка (Watson et al., 1998). Ген *GSTP1* локализован на хромосоме 11 (11q13).

Так как полиморфные варианты глутатион-S-трансфераз определяют различную ферментативную активность соответствующих белковых продуктов, индивидуумы, в зависимости от особенностей генома, могут обладать повышенной чувствительностью или устойчивостью к действию повреждающих факторов (Мусин и др., 2014). Наличие в организме человека функционально ослабленных вариантов ферментов повышает восприимчивость организма к вредным воздействиям и, как следствие, к увеличению риска развития ряда заболеваний (Сальникова и др., 2008; Генетический паспорт..., 2009; Лабыгина и др., 2009; Шенин и др., 2009; Глыбочко и др., 2013; Полтанова и др., 2013). Клинические проявления мультифакториальных заболеваний могут иметь отличия у представителей разных этнических групп, что связано с разницей в частоте аллелей и генотипов полиморфных генов в популяциях человека (Даренская, 2012). Полиморфизм генов семейства глутатион-S-трансфераз широко изучается в связи с предрасположенностью к ряду заболеваний человека, при этом недостаточно изучена частота аллелей и генотипов этих генов у представителей некоторых этносов. В популяционных исследованиях данные о полиморфизме генов используются при решении вопросов, связанных с эволюцией популяций человека, их происхождением, родством и историческим развитием (Лимборская и др., 2012). Цель нашего исследования – проведение сравнительного анализа частоты генотипов трех генов суперсемейства глутатион-S-трансфераз (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) у представителей двух этнических групп – русских и бурят, – проживающих на одной территории.

Материалы и методы

Группы исследования были сформированы в Усть-Ордынском Бурятском округе, на юго-востоке Иркутской области. Участниками исследования стали 119 подростков 14–17 лет, среди которых 55 были представителями бурятской (коренной) и 64 – русской (пришлой) этногрупп. Сравнимые группы сопоставимы по полу и возрасту. Этническая принадлежность подростков определялась с учетом фенотипических особенностей и данных генеалогического анамнеза. Группы исследования формировали методом случайной сплошной выборки во время проведения профилактических осмотров в школах. В работе с группами подростков соблюдались этические принципы Хельсинской Декларации Всемирной медицинской ассоциации (Бразилия, 2013 г.).

В группах подростков проведено молекулярно-генетическое исследование трех генов глутатион-S-трансфераз: *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*. В генах *GSTM1* и *GSTT1* изучали делеционный полиморфизм, в гене *GSTP1* определяли два полиморфизма, связанных с заменой нуклеотидов *A > G* в 313-м положении и *T > C* в 341-м положении гена. Материалом для исследования полиморфизма генов служили образцы цельной венозной крови, забор которой производился из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА-К3. В дальнейшем из образцов крови

выделяли ДНК с использованием комплекта реагентов «ДНК-Сорб-В» (производитель ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Полиморфизм генов *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* исследовали с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в автоматическом термочиклере «Терцик». Определение генотипов генов *GSTM1*, *GSTT1* осуществляли с использованием наборов реагентов для амплификации ДНК (производитель ГосНИИгенетика, Россия), согласно рекомендациям производителя. Наборы реагентов для выявления генетического полиморфизма в генах *GSTM1*, *GSTT1* позволяли находить гомозиготные по делециям варианты генотипов. Гомозиготные без делеции и гетерозиготные генотипы учитывались вместе. Детекцию продуктов амплификации осуществляли в 2 % агарозном геле с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия. Результаты интерпретировали по наличию или отсутствию специфических фрагментов ДНК: 215, 350, 480 п. н. Фрагмент ДНК 350 п. н. соответствовал внутреннему контролю прохождения ПЦР. «Нулевым» генотипом по гену *GSTM1* считали образцы с фрагментом 350 п. н. и отсутствующим фрагментом 215 п. н., «функциональным» генотипом по гену *GSTM1* – образцы с фрагментами 215 и 350 п. н. «Нулевым» генотипом по гену *GSTT1* считали образцы с фрагментом 350 п. н. и отсутствующим фрагментом 480 п. н., «функциональным» генотипом по гену *GSTT1* – образцы с фрагментами 480 и 350 п. н.

Генотипирование полиморфных вариантов гена *GSTP1* проводили наборами реагентов для амплификации ДНК с последующей рестрикцией (производитель ООО «Центр Молекулярной Генетики», Россия), согласно инструкции производителя. Указанные наборы реагентов позволяли выявлять две нуклеотидные замены в гене *GSTP1* в 313-м и 341-м положениях гена. Интерпретировали результаты по наличию или отсутствию специфических фрагментов ДНК: 112 п. н. – мутация в 341-м положении гена, 131 п. н. – отсутствие мутации в 341-м положении, 152 п. н. – отсутствие мутации в 313-м положении, 174 п. н. – мутация в 313-м положении гена. В зависимости от наличия или отсутствия нуклеотидных замен в двух положениях гена регистрировали аллельные варианты *A*, *B*, *C*. Наличие фрагментов ДНК 152 и 131 п. н. соответствовало аллелю *A* и свидетельствовало об отсутствии мутаций в 313-м и 341-м положениях гена. Наличие фрагментов 174 и 131 п. н. – аллель *B*, нуклеотидная замена в 313-м положении гена и отсутствие мутации в 341-м положении. Наличие фрагментов 174 и 112 п. н. – аллель *C*, нуклеотидные замены в 313-м и 341-м положениях гена. Исследование амплифицированных и рестрицированных фрагментов ДНК гена *GSTP1* проводили в 7 % акриламидном геле. Результаты электрофореза генетических полиморфизмов в генах *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* анализировали в проходящем УФ-свете с использованием трансиллюминатора с кабинетом для просмотра гелей «Биоком» и видеосистемой для регистрации Gel Imager (производитель Helicon, Россия).

Полученные данные были статистически обработаны с использованием программы Biostat и STATISTICA, версия 6.1 (StatSoft Inc., США (правообладатель лицензии – Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции

человека СО РАМН)). При анализе различий между качественными переменными применяли критерий χ^2 . Для оценки разницы долей использовали z-критерий. Нулевую гипотезу об отсутствии статистически значимых различий между группами отклоняли при уровне значимости 5 % (Гланц, 1999).

Результаты и обсуждение

Проведено молекулярно-генетическое исследование полиморфизма трех генов суперсемейства глутатион-S-трансфераз (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) у представителей коренной (бурятской) и пришлой (русской) этногрупп, проживающих в Усть-Ордынском Бурятском округе Иркутской области. По гену *GSTP1* исследован генетический полиморфизм, связанный с заменой нуклеотидов в двух положениях гена – *A313G*, *C341T*. В русской этнической группе частоты аллелей и генотипов находятся в равновесном соотношении в соответствии с законом Харди–Вайнберга как для маркера *A313G* ($\chi^2 = 2.93$; d. f. = 1; $p > 0.05$), так и для маркера *C341T* ($\chi^2 = 0.09$; d. f. = 1; $p > 0.05$). В этнической группе бурят сохраняется равновесие между частотами аллелей и генотипов для маркера *A313G* ($\chi^2 = 0.77$; d. f. = 1; $p > 0.05$), а для маркера *C341T* наблюдается незначительное отклонение от равновесия Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 0.04$; d. f. = 1; $p < 0.05$), которое вызвано отсутствием гомозигот по *T* аллелю. Возможной причиной несоответствия частоты аллелей фактической частоте генотипов полиморфного маркера *C341T* у представителей коренного населения может быть недостаточная численность указанной группы.

Различные комбинации нуклеотидных замен в 313-м и 341-м положениях гена *GSTP1* приводят к появлению трех аллельных вариантов: аллель *A* не имеет нуклеотидных замен – аллель «дикого» типа; аллели *B*, *C* содержат замены. В нашем исследовании частота аллелей *A*, *B*, *C* гена *GSTP1* распределилась следующим образом: в этногруппе бурят она составила 0.809; 0.164; 0.027; в этногруппе русских – 0.657; 0.307; 0.036 соответственно. Таким образом, между сравниваемыми группами наблюдаются статистически значимые различия по частоте встречаемости аллелей гена *GSTP1* ($\chi^2 = 7.301$; d. f. = 2; $p = 0.026$). Так, аллель *A*, кодирующий «активный» вариант фермента, статистически значимо чаще встречается у представителей коренного населения ($z = 2.526$; $p = 0.012$). Аллель *B*, продуктом которого является «медленный» вариант фермента, напротив, статистически значимо чаще встречается у представителей пришлого населения ($z = 2.465$; $p = 0.014$). По частоте встречаемости аллеля *C* статистически значимых различий не обнаружено ($z = 0.039$; $p = 0.969$).

Показано, что суммарная частота встречаемости «медленных» вариантов аллелей гена *GSTP1* (аллели *B*, *C*) в популяциях мира широко варьирует: от 21 % у монголоидов, 33 % у европеоидов до 42 % у негроидов (Garte et al., 2001). Результаты нашего исследования подтверждают эти данные. Так, частота «медленных» вариантов аллелей гена *GSTP1* у коренного населения, которое относится к монголоидам, составила 19.1, а у пришлого населения, относящегося к европеоидам, – 34.3 %. Обнаруженные различия в частоте «медленных» вариантов аллелей гена *GSTP1* статистически значимы ($z = 2.526$; $p = 0.012$).

Гены *GSTM1* и *GSTT1* исследованы по делеционному полиморфизму. В результате обширных делеций в указанных генах синтез соответствующих ферментов не происходит. Возможные варианты генотипов делят на «функциональные», когда фермент образуется, и «нулевой», когда фермент не синтезируется. Частота «нулевого» генотипа у представителей коренного и пришлого населения по гену *GSTM1* составила 48.1 и 60.9 %; по гену *GSTT1* – 22.2 и 18.8 % соответственно (рисунок). Несмотря на то что разность долей по гену *GSTM1* в сравниваемых этнических группах составила 12.8 %, статистически значимых различий по частоте встречаемости «нулевых» генотипов как по гену *GSTM1* ($z = 1.207$; $p = 0.228$), так и по гену *GSTT1* ($z = 0.228$; $p = 0.820$) не обнаружено.

Проведен также сравнительный частотный анализ возможных комбинаций генотипов по генам *GSTM1* и *GSTT1*. Обнаружено, что в этногруппе бурят частота «нулевого» генотипа одновременно по двум этим генам составила 9.2 %, в этногруппе русских – почти в два раза больше, 17.6 %. Тем не менее полученные различия не являются статистически значимыми ($z = 0.517$; $p = 0.605$).

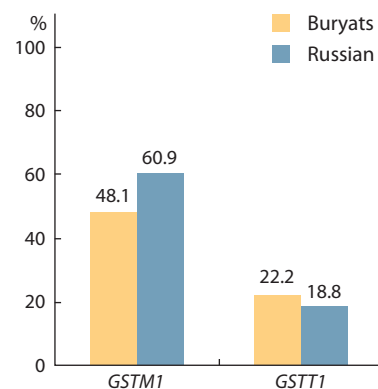
Наши данные о различиях в частоте «нулевых» генотипов в этнических группах подтверждают другие исследования (Hatajima et al., 2000). При изучении полиморфизма гена *GSTM1* в этнических группах, проживающих в двух крупных городах Бразилии – Рио-де-Жанейро и Бразилиа, обнаружена тенденция к снижению частоты «нулевых» генотипов в популяциях чернокожих жителей по сравнению с белокожими. Так, среди чернокожих жителей Рио-де-Жанейро частота «нулевого» генотипа составила 42, а среди белокожих – 49 % ($p = 0.06$) (Hatajima et al., 2000).

Показано, что носительство «нулевого» генотипа по делеционному полиморфизму генов *GSTM1* и *GSTT1* для отдельного индивидуума неблагоприятно, так как отсутствие соответствующих ферментов, участвующих в процессах детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной защите клетки, повышает риск развития некоторых заболеваний (Спицин, 2008; Генетический паспорт..., 2009). Несмотря на это, частота встречаемости «нулевого» генотипа в генах глутатион-S-трансфераз в различных популяциях человека достаточно высока. Вероятно, большинство заболеваний, ассоциированных с носительством «нулевых» генотипов генов *GSTM1* и *GSTT1* и «медленных» вариантов аллелей гена *GSTP1*, проявляется в более позднем возрасте, когда неблагоприятные аллели уже переданы следующему поколению. Таким образом, неблагоприятные аллели генов глутатион-S-трансфераз не попадают под действие биологического отбора и продолжают сохраняться в популяциях человека, встречаясь с большей или меньшей частотой в различных этнических группах.

Закключение

Результаты проведенного исследования выявили различия по частоте встречаемости аллелей и генотипов генов семейства глутатион-S-трансфераз у коренного и пришлого населения, проживающего в Усть-Ордынском Бурятском округе Иркутской области. На протяжении длительного времени данная территория является местом проживания представителей двух этнических групп – бурят и русских, относящихся к монголоидной и европеоидной расам соответственно. Показано, что у представителей коренного населения по сравнению с пришлым больше частота аллеля *A* гена *GSTP1* ($p = 0.012$), кодирующего «активный» вариант фермента, и меньше частота аллеля *B* ($p = 0.014$), продукт которого – «медленный» вариант фермента. При объединении аллелей *B* и *C* гена *GSTP1*, кодирующих «медленные» варианты фермента, обнаружено, что они чаще наблюдаются у пришлого населения ($p = 0.012$). Различия в частоте встречаемости «функциональных» и «нулевых» генотипов генов *GSTM1* и *GSTT1* в сравниваемых этнических группах не имеют статистической значимости. Тем не менее показана тенденция увеличения частоты «нулевого» генотипа гена *GSTM1* в этногруппе русских, где его частота на 12.8 % выше. Кроме этого, частота «нулевого» генотипа одновременно по двум генам, *GSTM1* и *GSTT1*, в этногруппе русских почти в два раза больше.

Таким образом, у коренного населения Восточной Сибири по сравнению с пришлым выше частота полиморфных вариантов генов глутатион-S-



Frequencies of zero genotypes for the *GSTM1* and *GSTT1* genes among ethnic Buryats and Russians.

трансфераз, кодирующих «активные» изоформы ферментов. Полученные данные дают возможность предполагать, что у коренного населения Восточной Сибири лучше сформированы адаптационные механизмы, позволяющие глутатион-S-трансферазам эффективно защищать клетку от токсического действия эндогенных и экзогенных соединений.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Baranov V.S. (Ed.) *Geneticheskiy pasport – osnova individualnoy i prediktivnoy meditsiny* [The Genetic Passport: The Basis of Personalized and Predictive Medicine]. S.-Petersburg: N-L Publ., 2009. (in Russian)
- Chenin V.A., Labygina A.V., Hecrepova D.I., Urybin I.Y., Suturina L.V., Lazareva L.M., Yermolova E.V., Belyaeva E.V. Polymorphism of genes of detoxification system in women with endometriosis and infertility. *Byulleten VSNTs SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center SB RAMS*. 2009;2(66):74-75. (in Russian)
- Darenskaya M.A. *Etnicheskie i regionalnye aspekty patologicheskikh protsessov u cheloveka* [Ethnic and regional features of human pathological processes]. *Byulleten VSNTs SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center SBRAMS*. 2012;2(84):145-151. (in Russian)
- Garte S., Gaspari L., Alexandrie A.K., Ambrosone C., Autrup H., Autrup J.L., Baranova H., Bathum L., Benhamou S., Boffetta P., Bouchardy C., Breskvar K., Brockmoller J., Cascorbi I., Clapper M.L., Coutelle C., Daly A., Dell'Omo M., Dolzan V., Dresler C.M., Fryer A., Haugen A., Hein D.W., Hildesheim A., Hirvonen A., Hsieh L.L., Ingelman-Sundberg M., Kalina I., Kang D., Kihara M., Kiyohara C.,

- Kremers P., Lazarus P., Le Marchand L., Lechner M.C., van Lieshout E.M., London S., Manni J.J., Maugard C.M., Morita S., Nazar-Stewart V., Noda K., Oda Y., Parl F.F., Pastorelli R., Persson I., Peters W.H., Rannug A., Rebbeck T., Risch A., Roelandt L., Romkes M., Ryberg D., Salagovic J., Schoket B., Seidegard J., Shields P.G., Sim E., Sinnet D., Strange R.C., Stücker I., Sugimura H., To-Figueras J., Vineis P., Yu M.C., Taioli E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001;12(10):1239-1248.
- Glantz S.A. *Mediko-biologicheskaya statistika [Biomedical Statistics]*. Moscow: Praktika Publ., 1999. (in Russian)
- Glybochko P.V., Alyaev Yu.G., Chalyy M.E., Usacheva O.A. Influence of polymorphisms in the genes for glutathione S-transferases T1 and M1 on androgenic status and semen quality after surgical treatment of varicocele. *Andrologiya i genitalnaya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery.* 2013;1(14):23-26. (in Russian)
- Hatagima A., Nazare Klautau-Guimaraes M., Penalva da Silva F., Cabello P. Glutathione S-transferase M1(GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. *Genet. Mol. Biol.* 2000;4(23):709-713.
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005;45:51-88.
- Ishii T., Matsuse T., Teramoto S., Matsui H., Miyao M., Hosoi T., Takahashi H., Fukuchi Y., Ouchi Y. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1999;54:693-696.
- Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D. The role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in the regulation of redox-dependent processes. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii = Success of Biological Chemistry.* 2014;54:299-348. (in Russian)
- Kulinskiy V.I. Xenobiotic detoxication. *Sorosovskiy obrazovatelnyy zhurnal = Soros Educational Journal.* 1999;1:8-12. (in Russian)
- Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. Glutathione system I: Synthesis, transport, glutathione transferase, and glutathione peroxidase. *Biomeditsinskaya Khimiya = Biomedical Chemistry.* 2009;3(55):255-277. (in Russian)
- Labygina A.V., Chenin V.A., Urybin I.Yu., Suturina L.V., Nesterova D.I., Kolesnikova L.I., Belyaeva E.V. The variability of genes GSTM1 and GSTT1 in infertile women living in Eastern Siberia. *Sbornik tezisev Vserossiyskoy nauch.-prakt. konferentsii "Ambulatorno-poliklinicheskaya praktika-platforma zhenskogo zdorovya" [Abstracts from the All-Russia research and practical conference "Outpatient management as a platform for women's health"]*. Moscow, 2009:145-146. (in Russian)
- Limberska S.A., Khusnutdinova E.K., Balanovskaya E.V. *Etnogenomika i genogeografiya narodov Vostochnoy Evropy [Ethnogenomics and Genogeography of Peoples of Eastern Europe]*. Moscow: Nauka Publ., 2012. (in Russian)
- Musin A.G., Khazieva A.V., Nigmatullina A.E., Konstantinova E.E., Garipov M.R. Polymorphism of genes of the xenobiotic-detoxicating system: role in the bioconversion of medicines. *Meditinskiy vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal.* 2014;2(9):211-216. (in Russian)
- Poltanova A.A., Agarkova L.A., Bukharina I.Yu. Functional differences among genetically determined variants of the xenobiotic-detoxicating system in the formation of gestational complications. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education.* 2013;6:671. (in Russian)
- Sal'nikova L.E., Smelaya T.V., Moroz V.V., Golubev A.M., Ponasenkov N.Kh., Khomenko R.V., Kharlamova I.V., Lapteva N.Sh., Kuznetsova G.I., Poroshenko G.G., Rubanovich A.V. Xenobiotic detoxication genes and their role in the development of pneumonia. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology.* 2008;6(4):9-15. (in Russian)
- Spitsin V.A. *Ekologicheskaya genetika cheloveka [Environmental Human Genetics]*. Moscow: Nauka Publ., 2008. (in Russian)
- Tew K.D., Townsend D.M. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid. Redox Signal.* 2012;17:1728-1737.
- Van Lieshout E., Knapen M., Lange W. Localization of glutathione S-transferase α and π in human embryonic tissues at 8 weeks gestational age. *Hum. Reprod.* 1998;13:1380-1386.
- Watson M.A., Stewart R.K., Smith G.B.J. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: Relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis.* 1998;19:275-280.
- Wu B., Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 2012;33:656-668.



Genetic polymorphisms and related risk factors of ischemic stroke in a Mongolian population in China

Q. Wu¹, H. Wu¹, Yu.L. Orlov^{2,3}✉, G. Gegentana¹, W. Huo¹, A.O. Bragin², N. Wu^{1,4}, S. Suyalatu¹, F. Zhao¹, J. Zhao¹, L.E. Tabikhanova², M. Chen⁵✉, H. Bai¹✉

¹ Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao, China

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ Northern Virginia Community College, Virginia, USA

⁵ Department of Bioinformatics, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, China

Ischemic stroke is caused by an interruption in the flow of blood to the brain and a risk factor for death and disability. Recent genome-wide association studies have identified more than 40 common sequence variants associated with ischemic stroke. However, the results are not always the same in populations with different genetic backgrounds. In the present study, we evaluated a hypothesis that a North Asian population living in a geographic area with unusually harsh environmental conditions would develop unique genetic risks. We investigated the candidate genes for ischemic stroke and risk factors in a Chinese Mongolian population which has not been explored previously. A total of 167 stroke cases and 176 controls were included in the study. Genotyping was performed by amplicon sequencing. The association was detected with single nucleotide polymorphisms (SNPs) located within genes *NINJ2* (rs12425791) and *ALDH2* (rs2238151) as well as intergenic rs9536591 were significantly associated with ischemic stroke, of which SNP rs12425791 of the *NINJ2* gene was the strongest association. *ALDH2* gene encodes mitochondrial aldehyde dehydrogenase, involved in the oxidative pathway of alcohol metabolism. Sex, age, body mass index and high blood pressure might be the risk factors. The current work also demonstrated genetic heterogeneity exists between Chinese and other populations. Our study provided the new insights into the genetic basis and environmental factors of ischemic stroke in Mongolian population.

Key words: population genetics; human genome; SNPs; Chinese Mongolian population; ischemic stroke.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Wu Q., Wu H., Orlov Yu.L., Gegentana G., Huo W., Bragin A.O., Wu N., Suyalatu S., Zhao F., Zhao J., Tabikhanova L.E., Chen M., Bai H. Genetic polymorphisms and related risk factors of ischemic stroke in a Mongolian population in China. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):581-587. DOI 10.18699/VJ17.275

Received 18.01.2017

Accepted for publication 28.03.2017

© AUTHORS, 2017

Генетический полиморфизм и сопутствующие факторы риска ишемического инсульта в монгольской популяции Китая

Ч. У¹, Х. У¹, Ю.Л. Орлов^{2,3}✉, Г. Гегентана¹, В. Хуо¹, А.О. Брагин², Н. У^{1,4}, С. Суялату¹, Ф. Жао¹, Ж. Жао¹, Л.Э. Табиханова², М. Чен⁵✉, Х. Бай¹✉

¹ Национальный университет Внутренней Монголии, Тунляо, Китай

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ Колледж Северной Вирджинии, Вирджиния, США

⁵ Отдел биоинформатики, Колледж естественных наук, Университет Чжецзян, Ханчжоу, Китай

Ишемический инсульт, вызванный прерыванием потока крови в мозг, представляет серьезную медицинскую проблему, являясь фактором риска смерти и потери трудоспособности. Недавние исследования геномных ассоциаций (genome-wide association studies – GWAS) определили более 40 общих вариантов геномных последовательностей, связанных с ишемическим инсультом. Однако результаты не могут быть одинаково применимы для различных мировых популяций. В данной работе мы рассматриваем гипотезу о том, что население Северной Азии, живущее в суровых условиях окружающей среды, может иметь уникальный спектр генов риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы. Исследованы гены-кандидаты предрасположенности к ишемическому инсульту в популяции монголов Китая, которая не была изучена ранее. В исследовании были включены в общей сложности 167 больных с инсультом и 176 здоровых лиц. Генотипирование выполнено с помощью секвенирования ампликонов. Обнаружена ассоциация развития ишемического инсульта с одиночными нуклеотидными полиморфизмами в генах *NINJ2* (rs12425791) и *ALDH2* (rs2238151), а также в межгенном участке rs9536591. Среди генов-кандидатов наибольший вклад в развитие инсульта вносит *NINJ2* (rs12425791). Ген *ALDH2* кодирует митохондриальный фермент альдегиддегидрогеназу, вовлеченную в оксидативный путь метаболизма алкоголя. Пол, возраст, индекс массы тела и высокое кровяное давление также могут быть факторами риска. Данная работа показала существующую гетерогенность между китайской и другими популяционными выборками. Наше исследование предлагает новый взгляд на взаимодействие генотипа и факторов окружающей среды при развитии ишемического инсульта в монгольском населении.

Ключевые слова: популяционная генетика; геном человека; однонуклеотидные замены; монгольская популяция Китая; ишемический инсульт.

Ischemic stroke, accounts for about 80 % of the stroke population (Dichgans, 2007; Mozaffarian et al., 2016), is a leading cause of mortality and morbidity and presents a serious and growing threat to public health (Krupinski et al., 1994; Lai et al., 1994). Ischemic stroke is a multi-factorial disorder (Hassan, Markus, 2000; Goldstein et al., 2006) associated closely with conventional vascular risk factors and genetic factors which have been accepted as important risk contributors to the development of ischemic stroke (Dichgans, 2007). Animal and epidemiological study has indicated that ischemic stroke has obvious genetic predisposition (Hassan, Markus, 2000).

With the advances of study on ischemic stroke, many susceptibility genes related to stroke have been identified using candidate gene association studies and genome-wide association studies (GWAS) (Matar et al., 2007; Ding et al., 2011; Wan et al., 2011; Bellenguez et al., 2012). The most susceptibility genes for ischemic stroke mainly are related with lipid metabolism, inflammation, renin-angiotensin-aldosterone system, homocysteine metabolism, nitric oxide synthase, and heart disease (Hassan, Markus, 2000; Lindsberg, Grau, 2003; Rubattu et al., 2004; Komitopoulou et al., 2006; Adibhatla, Hatcher, 2008). Besides, numerous potential factors attribute to the development of ischemic stroke, such as age (Wolf et al., 1992; Brown et al., 1996), sex (Brown et al., 1996; Sacco et al., 1998), low birth weight (Barker, Lackland, 2003), race (Gorelick, 1998; Sacco et al., 1998; Wan et al., 2011).

However, the assessing the susceptibility genes remains problematic. This is in part limited by the number of approaches currently available (Hassan, Markus, 2000). And, the ischemic stroke is a polygenic disease with a number of different phenotypes which have different genetic profiles (Hassan, Markus, 2000). Therefore, it is necessary for the discovery of new susceptibility loci in different ethnic groups. The problem of ethnic background predisposition to human diseases including type 2 diabetes is widely discussed (Bai et al., 2015; Nabodita, Sher, 2016; Tiis et al., 2016).

To provide new insights in clinical diagnosis and therapy, the aim of present study was to test 15 candidate SNPs of ischemic stroke and explore genetic risks of ischemic stroke in a relatively large Mongolian ethnicity.

Methods

Ethics Statement. This study was approved by the Institutional Review Board of the Affiliated hospital of Inner Mongolia University for the Nationalities and complied with the Declaration of Helsinki. The written informed consent was obtained from each participant.

Study participants. The subjects included 343 individuals of Chinese Mongolian ethnicity, of whom 167 were patients affected with ischemic stroke at various stages of the disease and 176 were normal controls. Control individuals were not related to the ischemic stroke patients or each other. Nonstroke, healthy, non-relatives persons were selected as control group from the same region.

Peripheral blood samples from all participants were collected into heparinized tubes. Body mass index (BMI), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were measured at the same time for all participants

(Table 1). The significance tests were performed to evaluate the case-control difference in sex, age and seven clinical parameters. Population attributable risks were evaluated by dividing the individuals into 5 groups: 30–39 years, 40–49 years, 50–59 years, 60–69 years and above 70 years old. Sex, age, BMI, high blood pressure (HBP) were selected as risk factors for ischemic stroke. The associations between the risk factors with ischemic stroke were tested using logistic regression.

A multivariate unconditional logistic regression model was employed to analyze the high risk factors of ischemic stroke.

Selection of SNPs. We selected a list of SNPs previously found to be associated with ischemic stroke based on NHGRI GWAS catalog (www.genome.gov/gwastudies, <http://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Candidate SNPs were initially selected with the following considerations: (1) SNPs found to be associated with ischemic stroke in an Asian sample were given higher priority; and (2) subsequently SNPs found to be associated with multiple studies were included. We were able to genotype 15 SNPs located in or near 15 candidate genes.

DNA extraction and sequencing. DNA was extracted from all peripheral blood samples. We estimated the concentration of isolated genomic DNA using Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, USA), and the DNA solution was further diluted to a concentration of 10 ng/μL. We designed the targeted sequencing primers and redesigned the primer sets with dispersed or weak electrophoretic bands. To prepare the chip array, we used a multisample nanodispenser (WaferGen, USA) to disperse DNA and primers into SmartChip MyDesign Chip (WaferGen, USA). Following the polymerase chain reaction (PCR) amplification, we purified PCR products through Agencourt AMPure XP-medium beads to get mixed Illumina pair-end libraries. Insert sizes were calculated by Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent, USA) and concentrations were estimated by Real Time PCR. Sequencing was performed on either Illumina MiSeq. All sequencing steps were in strict accordance with Illumina recommended protocols.

Data processing and statistical analysis. In brief, the final sequencing depth reached >200x, and the length of pair-end reads was 100 bp. Reads with an average base quality of ≥ 20 were kept for further analysis, that corresponds to common practice of sequencing data analysis (Orlov, 2014; Ignatieva et al., 2015). After filtering, we carried out assembly using Burrows-Wheeler Aligner (version 0.5.9) (Li, Durbin, 2009) to map all clean reads against the human reference genome of hg19 allowing ≤ 3 mismatches across a single read.

Samtools mpileup (version 0.1.18) (Li et al., 2009) command was used to obtain SNP genotypes. These genotypes were further filtered according to the following criteria: SNPs with ≥ 5 % of missing call rate across the samples. Samples with ≥ 3 % of missing genotypes (which corresponds to 10 % of missing SNP call rate) were removed. We tested SNPs for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) and excluded SNPs using the criterion (Shi et al., 2009; Muglia et al., 2010): HWE P value $< 1 \cdot 10^{-6}$ in unaffected individuals. Fifteen SNPs of 343 samples (167 cases and 176 controls) passed the quality control filtering, and the overall genotype call rate is 99.3 % or higher across the sample.

We tested association between candidate SNPs and the status of ischemic stroke using logistic regression (likelihood ratio test) by adjusting for the effects of age, sex, BMI,

Table 1. Variables and assignment

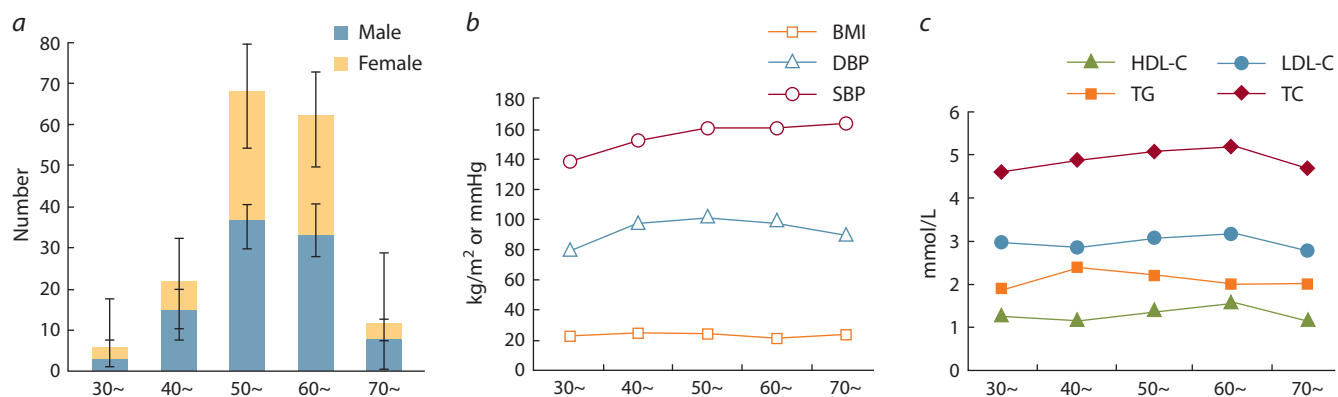
Variable	Assigning	
	Male	Female
Age, years	Continuous variable	Continuous variable
BMI, kg/m ²	<28 = 0	≥28 = 1
HBP, mmHg	SBP <140 or DBP <90.0	SBP ≥140 or DBP ≥90.1
TC, mmol/L	Continuous variable	Continuous variable
TG, mmol/L	»	»
HDL-C, mmol/L	»	»
LDL-C, mmol/L	»	»

Note: Using the cutting standard of obesity in Chinese patients: BMI ≥ 28 kg/m², Male's waist ≥ 90 cm, Female's waist ≥ 85 cm.

Table 2. Clinical characteristics of Mongolian population

Characteristics	Controls	Cases	P-value
Samples, n	176	167	
Sex (Male/Female)	49/127	96/71	0.000
Age, years	50.99 ± 12.07	57.50 ± 9.28	0.000
BMI, kg/m ²	25.35 ± 4.61	27.45 ± 4.61	0.000
SBP, mmHg	120.55 ± 20.08	158.90 ± 35.70	0.000
DBP, mmHg	86.74 ± 23.17	103.20 ± 23.83	0.000
TC, mmol/L	7.97 ± 35.27	5.11 ± 1.09	0.296
TG, mmol/L	2.24 ± 1.86	2.13 ± 1.53	0.563
HDL-C, mmol/L	1.45 ± 0.39	1.39 ± 1.51	0.621
LDL-C, mmol/L	3.08 ± 0.80	3.08 ± 0.88	0.963

Note: Values for continuous variables denote mean ± standard error of mean (SEM).



Age specific means and standard errors for index in a studied sample.

a, distribution of patients by age in the samples; b, distribution of BMI, SBP, DBP by age in the samples; c, distribution of TC, TG, HDL-C and LDL-C by age in the samples.

Table 3. Multivariate logistic regression analysis

Variable	B	SE	Wald	P-value	OR	95 % CI
Sex	-0.980	0.27	13.51	2.37E-04	0.38	0.22-0.63
Age	0.050	0.01	11.88	5.67E-04	1.05	1.02-1.07
BMI	0.900	0.28	10.18	1.42E-03	2.45	1.41-4.25
HBP	1.950	0.3	43.43	4.39E-11	7.05	3.95-12.61

SBP and DBP. We tested association with diabetes related quantitative traits (TC, HDL-C, LDL-C, and TG) across both ischemic stroke cases and controls using linear regression with the age, sex, BMI, and ischemic stroke status as covariates. All quantitative trait measures were normalized by quantile normalization and the normalized values were used in the analyses. Formal statistical tests, including 95 % confidence intervals (CI), were performed using SPSS 13.0.

Differences in population structure between the healthy and control sample were estimated by comparing risk allele frequency and the Wright's fixation index (*F*_{ST}) using plink.

Results

After rigorous sample and marker level quality control filtering, genotypes of 15 SNPs on 343 individuals (including with 167 ischemic stroke cases and 176 stroke ethnically matched controls) were kept for subsequent analyses. Clinical characteristics of the sample are summarized in Table 2. Sex, age, BMI, SBP and DBP were significant difference between patients and normal (Table 2, Figure). Results of this study suggested that age, high blood pressure (HBP) are major risk factors for ischemic stroke in Chinese Mongolian population (Table 3). Table 4 presents the association results

Table 4. SNPs significantly associated with Chinese Mongolian

Chr	Gene	SNP	Minor allele	MAF		OR	95 % CI	P-value (adjusted for age, sex, BMI)
				Cases	Controls			
3	<i>SPSB4</i>	rs16851055	A	0.126	0.128	0.84	0.52–1.36	0.4780
4	<i>NR</i>	rs2200733	T	0.473	0.446	1.06	0.75–1.50	0.7525
4	<i>PITX2</i>	rs6843082	A	0.27	0.335	0.76	0.51–1.15	0.1980
5	<i>ADAMTS12</i>	rs1364044	T	0.422	0.421	1.06	0.74–1.54	0.7406
5	<i>ADAMTS2</i>	rs469568	C	0.174	0.114	1.53	0.99–2.36	0.0570
6	<i>CDC5L</i>	rs556621	T	0.434	0.443	0.59	0.42–0.84	0.0036
6	<i>AIM1</i>	rs783396	A	0.054	0.08	0.79	0.39–1.57	0.4994
7	<i>Intergenic</i>	rs10486776	A	0.057	0.071	0.79	0.41–1.53	0.4824
7	<i>HDAC9</i>	rs2107595	A	0.225	0.335	0.57	0.41–0.81	0.0018
11	<i>TRIM29</i>	rs2084898	A	0.018	0.026	0.78	0.25–2.46	0.6773
12	<i>NINJ2</i>	rs12425791	A	0.374	0.27	1.83	1.21–2.77	0.0044
12	<i>ALDH2</i>	rs2238151	T	0.189	0.139	1.74	1.09–2.79	0.0208
13	<i>Intergenic</i>	rs9536591	A	0.407	0.315	1.52	1.08–2.15	0.0162
16	<i>ZFHX3</i>	rs879324	A	0.293	0.341	0.72	0.48–1.07	0.0991
18	<i>IMPA2</i>	rs7506045	T	0.27	0.21	1.22	0.85–1.77	0.2830

Note: Chr, chromosome; MAF, minor allele frequency; listed *P*-values, odds ratios and 95 % confidence intervals were calculated using the additive model of genetic association.

between the 15 SNPs and ischemic stroke status. Of the 15 SNPs tested, SNPs located within *NINJ2* (rs12425791, $P = 4.4 \cdot 10^{-3}$, OR = 1.83, 95 % CI = 1.21–2.77), *ALDH2* (rs2238151, $P = 2.08 \cdot 10^{-2}$, OR = 1.74, 95 % CI = 1.09–2.79) and intergenic SNP (rs9536591, $P = 1.62 \cdot 10^{-2}$, OR = 1.52, 95 % CI = 1.08–2.15) were significantly associated with ischemic stroke risks (Table 4), of which SNP rs12425791 of the *NINJ2* gene is the strongest association.

Discussion

Environmental factors may increase the risk of ischemic stroke (Huriletemuer et al., 2010), including age and gender and body mass index. We randomly surveyed 167 Mongolian patients with ischemic stroke years. The minimum age of these patients is 32 years old, and 50–60 years of age old group had more patients with ischemic stroke than other groups (Figure). Previous studies showed that the risk of stroke increased along with increasing age (Wolf et al., 1992; Brown et al., 1996; Goldstein et al., 2006). However, the age did show it was a risk factor of ischemic stroke according to the logistic regression analysis in Mongolian population. Traditionally, the weight status is classified according to body mass index. Persons with a BMI of 24 to 28 are classified as being overweight, and those with a BMI of ≥ 28 kg/m² are classified as being obese based on the Chinese obesity standard (Wang et al., 2007). Some large-scale prospective studies showed that increased weight is associated stroke in a dose-response fashion (Rexrode et al., 1997; Kurth et al., 2002; Song et al., 2004). Our study showed that gender and obesity might be a risk factor for ischemic stroke in Chinese Mongolian population. The main diet of Mongolian population is meat and dairy products. Meanwhile, our study showed the high cholesterol

level was present between 50 to 60 years old of Mongolian, and high levels of TG were common in all ages. This might lead to obesity in Mongolian population and increase the risk for ischemic stroke. As a major risk factor of cerebral infarction and intracerebral hemorrhage (Izzo et al., 2003; Fields et al., 2004), hypertension contributes to the attack of stroke (Lewington et al., 2002). Along with the increasing age, blood pressure increase also (Burt et al., 1995). The control of blood pressure is an effective method for prevention of outbreak, development and cure of ischemic stroke (Black et al., 2001; Whelton et al., 2002; Ong et al., 2007). Based on our analysis, the typical clinical features of patients with ischemic stroke have obvious high blood pressure in Mongolian population, further prompt the Chinese Mongolian stroke may be caused by accelerated atherosclerosis.

Several studies have evaluated the association between rs12425791 and risk of ischemic stroke, but the results remain controversial. SNPs rs12425791 locates on chromosome 12p13, close to *NINJ2* gene which encodes ninjurin-2 protein. Ninjurin-2 protein, also named nerve injury-induced protein, is induced expression by nerve injury in Schwann cells (Araki, Milbrandt, 2000). The GWAS analyses showed that rs12425791 is associated with an increased risk of stroke for black and Dutch population (Ikram et al., 2009) and Asian population (Li et al., 2012; Lian et al., 2012). However, rs12425791 didn't show association with ischemic stroke in European ancestry. Previous studies showed that rs12425791 is relative to ischemic stroke risk in Asian population (Lian et al., 2012; Zhang et al., 2016). However, the contradictory studies about association between rs12425791 or *NINJ2* gene and ischemic stroke also emerge in Chinese Han population (Chen et al., 2010; Ding et al., 2011; Tong et al., 2011; Wan

et al., 2011; Gu et al., 2013; Xie et al., 2013). In our study, we found variants rs12425791 of the *NINJ2* gene to be strongest associated with ischemic stroke in Chinese Mongolian ethnicity, and A alleles increase the risk of ischemic stroke, indicating the rs12425791 of the *NINJ2* gene might play function in the insult of ischemic stroke.

ALDH2 gene locates in chromosome 12q24.2 and encodes mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-E2). ALDH-E2 involves in the oxidative pathway of alcohol metabolism (Smith, 1986; Hempel et al., 1987). Substantial evidence indicated that alcohol abuse is sever risk factor for stroke (Gill et al., 1986, 1991; Hillbom et al., 1999; Klatsky et al., 2001; Mazzaglia et al., 2001). *ALDH2* polymorphisms play a pivotal role on hypertension (Hasi et al., 2011; Wang et al., 2013; Yokoyama et al., 2013; Hu et al., 2014), heart disease (Gu, Li, 2014; Mizuno et al., 2015) and stroke (Yao et al., 2011; Lai et al., 2012). The single base mutation (*ALDH2**2) of *ALDH2*, the predominant allele in East Asian populations (around 70 %) (Chen, Yin, 2008), is responsible for acute alcohol-flushing reaction in Asians (Crabb, 1990). Indeed, Mongolian drinks more than other ethnic groups in China (Cochrane et al., 2003). In the present study, SNP rs2238151 of *ALDH2* gene was associated with ischemic stroke in Chinese Mongolian population, indicating rs2238151 take action in ischemic stroke by alcohol metabolism.

In conclusion, we identified SNP rs2238151 of *ALDH2* gene and rs12425791 of *NINJ2* gene associated with ischemic stroke risk in the Chinese Mongolian population. Our discovery also demonstrated genetic heterogeneity exists between Chinese and other populations. Meanwhile, this study has limitations, we had limited power to detect associations with small effect sizes and associations with rare variants.

The studies of genes associated with the human deceases such as predisposition to alcohol have been started at the Institute of Cytology and Genetics SB RAS earlier on animal models (Morozova, Popova, 2010). Such problems of computer modeling in animal genetics were discussed at BGRS\ SB-2016 conference (Orlov et al., 2016) that continue series of collaborative works between the authors from China and Russia (Bai et al., 2015).

Acknowledgments

We thank our study individuals for their generous participation in this study. Authors are grateful to L.P. Osipova and V.N. Babenko for science discussion. This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (81060098 and 31402106), NSFC-RFBR Cooperation and Exchange Projects (81511130050 and RFBR), Scientific Research Project of Inner Mongolia University for Nationalities (NMD1321) and Science and Technology Program Project of Inner Mongolia Autonomous Region (YY150002). Work by YLO, AOB and LET was supported by ICG SB RAS budget project 0324-2016-0003 and RFBR project 15-54-53091.

References

Adibhatla R.M., Hatcher J. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem.* 2008;49:241-268. DOI 10.1007/978-1-4020-8831-5_9.
Araki T., Milbrandt J. Ninjurin2, a novel homophilic adhesion molecule, is expressed in mature sensory and enteric neurons and promotes neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 2000;20(1):187-195.

Bai H., Liu H., Suyalatu S., Guo X., Chu S., Chen Y., Lan T., Borjigin B., Orlov Y.L., Posukh O.L., Yang X., Guilan G., Osipova L.P., Wu Q., Narisu N. Association analysis of genetic variants with type 2 diabetes in a Mongolian population in China. *J. Diabetes Res.* 2015;613236. DOI 10.1155/2015/613236.
Barker D.J., Lackland D.T. Prenatal influences on stroke mortality in England and Wales. *Stroke.* 2003;34(7):1598-1602.
Bellenguez C., Bevan S., Gschwendtner A., Spencer C.C., Burgess A.I., Pirinen M., Jackson C.A., Traylor M., Strange A., Su Z., Band G., Syme P.D., Malik R., Pera J., Norrving B., Lemmens R., Freeman C., Schanz R., James T., Poole D., Murphy L., Segal H., Cortellini L., Cheng Y.C., Woo D., Nalls M.A., Müller-Myhsok B., Meisinger C., Seedorf U., Ross-Adams H., Boonen S., Wloch-Kopce D., Valant V., Slark J., Furie K., Delavaran H., Langford C., Deloukas P., Edkins S., Hunt S., Gray E., Dronov S., Peltonen L., Gretarsdottir S., Thorleifsson G., Thorsteinsdottir U., Stefansson K., Boncoraglio G.B., Parati E.A., Attia J., Holliday E., Levi C., Franzosi M.G., Goel A., Helgadottir A., Blackwell J.M., Bramer E., Brown M.A., Casas J.P., Corvin A., Duncanson A., Jankowski J., Mathew C.G., Palmer C.N., Plomin R., Rautanen A., Sawcer S.J., Trembath R.C., Viswanathan A.C., Wood N.W., Worrall B.B., Kittner S.J., Mitchell B.D., Kissela B., Meschia J.F., Thijs V., Lindgren A., Macleod M.J., Slowik A., Walters M., Rosand J., Sharma P., Farrall M., Sudlow C.L., Rothwell P.M., Dichgans M., Donnelly P., Markus H.S. Genome-wide association study identifies a variant in *HDAC9* associated with large vessel ischemic stroke. *Nat. Genet.* 2012;44(3):328-333. DOI 10.1038/ng.1081.
Black H.R., Elliott W.J., Neaton J.D., Grandits G., Grambsch P., Grimm R.H., Jr., Hansson L., Lacoucière Y., Muller J., Sleight P., Weber M.A., White W.B., Williams G., Wittes J., Zanchetti A., Fakouhi T.D., Anders R.J. Baseline characteristics and early blood pressure control in the CONVINCE trial. *Hypertension.* 2001;37(1):12-18.
Brown R., Whisnant J.P., Sicks J., O'Fallon W.M., Wiebers D.O. Stroke incidence, prevalence, and survival: secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. *Stroke.* 1996;27(3):373-380.
Burt V.L., Whelton P., Roccella E.J., Brown C., Cutler J.A., Higgins M., Horan M.J., Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1991. *Hypertension.* 1995;25(3):305-313.
Chen C.C., Yin S.J. Alcohol abuse and related factors in Asia. *Int. Rev. Psychiatry.* 2008;20(5):425-433. DOI 10.1080/09540260802344075.
Chen K., Xiao Z., Hou S., Zhao R.T., Liu Y.F., Dou H.D., Li G.P., Tao X.M., Li F., Zhou W.Y., Qiu C.C. Strong association between the *NINJ2* gene polymorphism and the susceptibility of stroke in Chinese Han population in Fangshan district. *Beijing Da Xue Xue Bao.* Yi Xue Ban = J. Peking Univ. Health Sci. 2010;42(5):498-502.
Cochrane J., Chen H., Conigrave K.M., Hao W. Alcohol use in China. *Alcohol & Alcoholism.* 2003;38(6):537-542.
Crabb D.W. Biological markers for increased risk of alcoholism and for quantitation of alcohol consumption. *J. Clin. Invest.* 1990;85(2):311-315. DOI 10.1172/JCI114439.
Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurology.* 2007;6(2):149-161. DOI 10.1016/S1474-4422(07)70028-5.
Ding H., Tu X., Xu Y., Xu C., Wang X., Cui G., Bao X., Hui R., Wang Q.K., Wang D.W. No evidence for association of 12p13 SNPs rs11833579 and rs12425791 within *NINJ2* gene with ischemic stroke in Chinese Han population. *Atherosclerosis.* 2011;216(2):381-382. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.005.
Fields L.E., Burt V.L., Cutler J.A., Hughes J., Roccella E.J., Sorlie P. The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000 a rising tide. *Hypertension.* 2004;44(4):398-404. DOI 10.1161/01.HYP.0000142248.54761.56.
Gill J.S., Shipley M.J., Tsementzis S.A., Hornby R.S., Gill S.K., Hitchcock E.R., Beevers D.G. Alcohol consumption – a risk factor for hemorrhagic and non-hemorrhagic stroke. *Am. J. Medicine.* 1991;90(1):489-497.

- Gill J.S., Zezulka A.V., Shipley M.J., Gill S.K., Beevers D.G. Stroke and alcohol consumption. *N. Engl. J. Med.* 1986;315(17):1041-1046. DOI 10.1056/NEJM198610233151701.
- Goldstein L.B., Adams R., Alberts M.J., Appel L.J., Brass L.M., Bushnell C.D., Culebras A., DeGraba T.J., Gorelick P.B., Guyton J.R., Hart R.G., Howard G., Kelly-Hayes M., Nixon J.V., Sacco R.L. Primary prevention of ischemic stroke: A guideline. *Stroke*. 2006; 37(6):1583-1633. DOI 10.1161/01.STR.0000223048.70103.F1.
- Gorelick P.B. Cerebrovascular disease in African Americans. *Stroke*. 1998;29(12):2656-2664.
- Gu J.Y., Li L.W. *ALDH2* Glu504Lys polymorphism and susceptibility to coronary artery disease and myocardial infarction in East Asians: a meta-analysis. *Arch. Med. Res.* 2014;45(1):76-83. DOI 10.1016/j.arcmed.2013.10.002.
- Gu L., Su L., Chen Q., Xie J., Yan Y., Wu G., Tan J., Liang B., Dou W., Chen W., Wu P., Wang J., Tang N. Association between the single-nucleotide polymorphism rs12425791 and ischemic stroke in Chinese populations: new data and meta-analysis. *Int. J. Neurosci.* 2013;123(6):359-365. DOI 10.3109/00207454.2012.761217.
- Hasi T., Hao L., Yang L., Su X.L. Acetaldehyde dehydrogenase 2 SNP rs671 and susceptibility to essential hypertension in Mongolians: a case control study. *Genet. Mol. Res.* 2011;10(1):537-543. DOI 10.4238/vol10-1gm1056.
- Hassan A., Markus H.S. Genetics and ischaemic stroke. *Brain*. 2000; 123(9):1784-1812. DOI http://dx.doi.org/10.1093/brain/123.9.1784.
- Hempel J., Höög J.O., Jörnvall H. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase: Homology of putative targeting sequence to that of carbamyl phosphate synthetase I revealed by correlation of cDNA and protein data. *FEBS Lett.* 1987;222(1):95-98.
- Hillbom M., Numminen H., Juvela S. Recent heavy drinking of alcohol and embolic stroke. *Stroke*. 1999;30(11):2307-2312.
- Hu N., Zhang Y., Nair S., Culver B.W., Ren J. Contribution of *ALDH2* polymorphism to alcoholism-associated hypertension. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*. 2014; 8(3):180-185(6).
- Huriletmuer H., Zhang C., Niu G., Zhao S., Hurile H. Gene polymorphisms and related risk factors in Mongolian hypertensive stroke patients. *Neurosciences*. 2010;15(3):184-189.
- Ignatieva E.V., Podkolodnaya O.A., Orlov Y.L., Vasiliev G.V., Kolchanov N.A. [Regulatory Genomics: Integrated Experimental and Computer Approaches]. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2015;51(4):409-429. DOI 10.7868/S0016675815040062. (in Russian)
- Ikrum M.A., Seshadri S., Bis J.C., Fornage M., DeStefano A.L., Aulchenko Y.S., DeBette S., Lumley T., Folsom A.R., van den Herik E.G., Bos M.J., Beiser A., Cushman M., Launer L.J., Shahar E., Struchalin M., Du Y., Glazer N.L., Rosamond W.D., Rivadeneira F., Kelly-Hayes M., Lopez O.L., Coresh J., Hofman A., DeCarli C., Heckbert S.R., Koudstaal P.J., Yang Q., Smith N.L., Kase C.S., Rice K., Haritunians T., Roks G., de Kort P.L., Taylor K.D., de Lau L.M., Oostra B.A., Uitterlinden A.G., Rotter J.I., Boerwinkle E., Psaty B.M., Mosley T.H., van Duijn C.M., Breteler M.M., Longstreth W.T., Jr., Wolf P.A. Genomewide association studies of stroke. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(17):1718-1728. DOI 10.1056/NEJMoa0900094.
- Izzo J.L., Black H.R., Goodfriend T.L. (Eds.). *Hypertension Primer. The Essentials of High Blood Pressure*. Third ed. From the Council on High Blood Pressure Research, Am. Heart Assoc. Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
- Klatsky A.L., Armstrong M.A., Friedman G.D., Sidney S. Alcohol drinking and risk of hospitalization for ischemic stroke. *Am. J. Cardiol.* 2001;88(6):703-706.
- Komitopoulou A., Platokouki H., Kapsimali Z., Pergantou H., Adamtziki E., Aronis S. Mutations and polymorphisms in genes affecting hemostasis proteins and homocysteine metabolism in children with arterial ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 2006;22(1):13-20. DOI 10.1159/000092332.
- Krupinski J., Kaluza J., Kumar P., Kumar S., Wang J.M. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*. 1994;25(9):1794-1798.
- Kurth T., Gaziano J.M., Berger K., Kase C.S., Rexrode K.M., Cook N.R., Buring J.E., Manson J.E. Body mass index and the risk of stroke in men. *Arch. Intern. Med.* 2002;162(22):2557-2562.
- Lai C.L., Liu M.T., Yin S.J., Lee J.T., Lu C.C., Peng G.S. Heavy binge drinking may increase risk of stroke in nonalcoholic hypertensives carrying variant *ALDH2*2* gene allele. *Acta Neurol. Taiwan*. 2012; 21(1):39-43.
- Lai S.M., Alter M., Friday G., Sobel E. A multifactorial analysis of risk factors for recurrence of ischemic stroke. *Stroke*. 1994;25(5):958-962.
- Lewington S., Clarke R., Qizilbash N., Peto R., Collins R. et al. (Prospective Studies Collaboration). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002; 360(9349):1903-1913.
- Li B.H., Zhang L.L., Yin Y.W., Pi Y., Guo L., Yang Q.W., Gao C.Y., Fang C.Q., Wang J.Z., Li J.C. Association between 12p13 SNPs rs11833579/rs12425791 near *NINJ2* gene and ischemic stroke in East Asian population: evidence from a meta-analysis. *J. Neurol. Sci.* 2012;316(1):116-121. DOI 10.1016/j.jns.2012.01.010.
- Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-1760. DOI 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079. DOI 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Lian G., Yan Y., Jianxiong L., Juanjuan X., Qing C., Guangliang W., Li S. The rs11833579 and rs12425791 polymorphisms and risk of ischemic stroke in an Asian population: a meta-analysis. *Thromb. Res.* 2012;130(3):e95-e102. DOI 10.1016/j.thromres.2012.06.014.
- Lindberg P.J., Grau A.J. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34(10):2518-2532. DOI 10.1161/01.STR.0000089015.51603.CC.
- Matar N.M., Brown W.M., Scholz S., Simón-Sánchez J., Fung H.C., Hernandez D., Gibbs J.R., De Vrieze F.W., Crews C., Britton A., Langefeld C.D., Brott T.G., Brown R.D., Jr., Worrall B.B., Frankel M., Silliman S., Case L.D., Singleton A., Hardy J.A., Rich S.S., Meschia J.F. A genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: initial analysis and data release. *Lancet Neurol.* 2007;6(5):414-420. DOI 10.1016/S1474-4422(07)70081-9.
- Mazzaglia G., Britton A.R., Altmann D.R., Chenet L. Exploring the relationship between alcohol consumption and non-fatal or fatal stroke: a systematic review. *Addiction*. 2001;96(12):1743-1756. DOI 10.1080/09652140120089490.
- Mizuno Y., Harada E., Morita S., Kinoshita K., Hayashida M., Shono M., Morikawa Y., Murohara T., Nakayama M., Yoshimura M., Yasue H. East Asian variant of aldehyde dehydrogenase 2 is associated with coronary spastic angina: possible roles of reactive aldehydes and implications of alcohol flushing syndrome. *Circulation*. 2015;131(19):1665-1673. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013120.
- Morozova M.V., Popova N.K. Effect of alcohol in combination with stress in the prenatal period on adult mice behaviour. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal*. 2010;96(11):1114-1121. (in Russian)
- Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S., Arnett D.K., Blaha M.J., Cushman M., Das S.R., de Ferranti S., Després J.P., Fullerton H.J., Howard V.J., Huffman M.D., Isasi C.R., Jiménez M.C., Judd S.E., Kissela B.M., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Liu S., Mackey R.H., Magid D.J., McGuire D.K., Mohler E.R. 3rd, Moy C.S., Muntner P., Mussolino M.E., Nasir K., Neumar R.W., Nichol G., Palaniappan L., Pandey D.K., Reeves M.J., Rodriguez C.J., Rosamond W., Sorlie P.D., Stein J., Towfighi A., Turan T.N., Virani S.S., Woo D., Yeh R.W., Turner M.B. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):447-454. DOI 10.1161/CIR.0000000000000366.
- Muglia P., Tozzi F., Galwey N.W., Francks C., Upmanyu R., Kong X.Q., Antoniadou A., Domenici E., Perry J., Rothen S., Vandeleur C.L.,

- Mooser V., Waeber G., Vollenweider P., Preisig M., Lucae S., Müller-Myhsok B., Holsboer F., Middleton L.T., Roses A.D. Genome-wide association study of recurrent major depressive disorder in two European case-control cohorts. *Mol. Psychiatry*. 2010;15(6):589-601. DOI 10.1038/mp.2008.131.
- Nabodita K., Sher A. Genes, genetics, and environment in type 2 diabetes: Implication in personalized medicine. *DNA and Cell Biology*. 2016;35(1):1-12. DOI 10.1089/dna.2015.2883.
- Ong K.L., Cheung B.M., Man Y.B., Lau C.P., Lam K.S. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension among United States adults 1999–2004. *Hypertension*. 2007;49(1):69-75. DOI 10.1161/01.HYP.0000252676.46043.18.
- Orlov Y.L. Computer-assisted study of the regulation of eukaryotic gene transcription on the base of data on chromatin sequencing and immunoprecipitation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(1):193-206. (in Russian)
- Orlov Y.L., Baranova A.V., Markel A.L. Computational models in genetics at BGRS/SB-2016: introductory note. *BMC Genetics*. 2016; 17(3):465. DOI 10.1186/s12863-016-0465-3.
- Rexrode K.M., Hennekens C.H., Willett W.C., Colditz G.A., Stampfer M.J., Rich-Edwards J.W., Speizer F.E., Manson J.E. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. *JAMA*. 1997;277(19):1539-1545.
- Rubattu S., Di Angelantonio E., Stanzione R., Zanda B., Evangelista A., Pirisi A., De Paolis P., Cota L., Brunetti E., Volpe M. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and the risk of ischemic stroke: a role of the A1166C/AT1 gene variant. *J. Hypertens*. 2004;22(11):2129-2134.
- Sacco R.L., Boden-Albala B., Gan R., Chen X., Kargman D.E., Shea S., Paik M.C., Hauser W.A. Stroke incidence among white, black, and Hispanic residents of an urban community the Northern Manhattan Stroke Study. *Am. J. Epidemiol.* 1998;147(3):259-268.
- Shi J., Levinson D.F., Duan J., Sanders A.R., Zheng Y., Pe'er I., Durbidge F., Holmans P.A., Whittemore A.S., Mowry B.J., Olincy A., Amin F., Cloninger C.R., Silverman J.M., Buccola N.G., Byerley W.F., Black D.W., Crowe R.R., Oksenberg J.R., Mirel D.B., Kendler K.S., Freedman R., Gejman P.V. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature*. 2009; 460(7256):753-757. DOI 10.1038/nature08192.
- Smith M. Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Adv. Hum. Genet.* 1986;15:249-290.
- Song Y.-M., Sung J., Smith G.D., Ebrahim S. Body mass index and ischemic and hemorrhagic stroke: A prospective study in Korean men. *Stroke*. 2004;35(4):831-836. DOI 10.1161/01.STR.0000119386.22691.1C.
- Tiis R.P., Osipova L.P., Churkina T.V., Tabikhanova L.E., Lichman D.V., Voronina E.N., Filipenko M.L. The *ILE462VAL* polymorphism of the cytochrome *P450 CYP1A1* gene among Tundra Nenets in Yamalo-Nenets Autonomous Okrug, Nganasans in the Taimyr Peninsula and Russians in Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):16-22. DOI 10.18699/VJ16.102. (in Russian)
- Tong Y., Zhang Y., Zhang R., Geng Y., Lin L., Wang Z., Liu J., Li X., Cao Z., Xu J., Chai Y., Fan H., Hu F.B., Lu Z., Cheng J. Association between two key SNPs on chromosome 12p13 and ischemic stroke in Chinese Han population. *Pharmacogenet. Genom.* 2011;21(9):572-578. DOI 10.1097/FPC.0b013e32834911d0.
- Wan X.H., Li S.J., Cheng P., Zhang Q., Yang X.C., Zhong G.Z., Hu W.L., Jin L., Wang X.F. NINJ2 polymorphism is associated with ischemic stroke in Chinese Han population. *J. Neurol. Sci.* 2011; 308(1):67-71. DOI 10.1016/j.jns.2011.06.011.
- Wang Y., Mi J., Shan X.Y., Wang Q.J., Ge K.Y. China facing an obesity epidemic and the consequences? The trends in obesity and chronic disease in China. *Int. J. Obesity (Lond)*. 2007;31(1):177-188. DOI 10.1038/sj.ijo.0803354.
- Wang Y., Zhang Y., Zhang J., Tang X., Qian Y., Gao P., Zhu D. Association of a functional single-nucleotide polymorphism in the *ALDH2* gene with essential hypertension depends on drinking behavior in a Chinese Han population. *J. Hum. Hypertens*. 2013;27(3):181-186. DOI 10.1038/jhh.2012.15.
- Whelton P.K., He J., Appel L.J., Cutler J.A., Havas S., Kotchen T.A., Roccella E.J., Stout R., Vallbona C., Winston M.C., Karimbakas J. Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from the National High Blood Pressure Education Program. *JAMA*. 2002;288(15):1882-1888. DOI 10.1001/jama.288.15.1882.
- Wolf P.A., D'Agostino R.B., O'Neal M.A., Sytkowski P., Kase C.S., Belanger A.J., Kannel W.B. Secular trends in stroke incidence and mortality. The Framingham Study. *Stroke*. 1992;23(11):1551-1555.
- Xie J.J., Gu L., Chen Q., Wu G.L., Yan Y., Su L. Correlation study on 12p13 single nucleotide polymorphism rs12425791 and Chinese medical syndrome types in ischemic stroke patients of the Han nationality. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* = Chinese J. Integrated Traditional and Western Medicine. 2013;33(1):47-50.
- Yao C.T., Cheng C.A., Wang H.K., Chiu S.W., Chen Y.C., Wang M.F., Yin S.J., Peng G.S. The role of *ALDH2* and *ADH1B* polymorphism in alcohol consumption and stroke in Han Chinese. *Hum. Genomics*. 2011;5(6):569-576.
- Yokoyama A., Mizukami T., Matsui T., Yokoyama T., Kimura M., Matsushita S., Higuchi S., Maruyama K. Genetic polymorphisms of alcohol dehydrogenase-1B and aldehyde dehydrogenase-2 and liver cirrhosis, chronic calcific pancreatitis, diabetes mellitus, and hypertension among Japanese alcoholic men. *Alcohol.: Clin. Exp. Res.* 2013;37(8):1391-1401. DOI 10.1111/acer.12108.
- Zhang Z., Xu G., Wei Y., Zhu W., Fan X., Liu X. Impact of chromosome 12p13 variants on ischemic stroke risk. *Int. J. Neurosci.* 2016; 126(9):856-862. DOI 10.3109/00207454.2015.1079710.

Генетическое разнообразие дождевого червя *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida)

С.В. Шеховцов¹✉, Д.И. Берман², Е.В. Голованова³, С.Е. Пельтек¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный педагогический университет», Омск, Россия

Eisenia nordenskioldi (Eisen, 1879) – наиболее распространенный вид дождевых червей в Сибири. Он встречается в различных экосистемах, от тундр до лесостепей, и обладает значительной морфологической, экологической и кариотипической изменчивостью. *E. nordenskioldi* подразделяют на два подвида – пигментированный *E. n. nordenskioldi* и непигментированный *E. n. pallida*; известны также несколько видов рода *Eisenia* с близким диагнозом, ранее входивших в состав вида. Все это позволяет использовать данный вид в качестве удобной модели для изучения процессов видообразования и эволюции дождевых червей. В предлагаемой статье обобщена вся имеющаяся информация о генетической и экологической изменчивости *E. nordenskioldi*, в том числе и наши неопубликованные данные. Показано, что каждый из подвидов *E. nordenskioldi* (*E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida*) можно подразделить на несколько филогенетических линий на основании изменчивости митохондриальной и ядерной ДНК. Эти линии дивергировали несколько миллионов лет назад, а время расхождения популяций внутри каждой из линий может составлять несколько сотен тысяч лет. Для выявленных линий приведены ареалы и паттерны генетической изменчивости в разных регионах. Подвиды *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida*, скорее всего, не монофилетичны, а признак пигментации может быть лабильным и, вполне возможно, несколько раз появлялся и исчезал в ходе эволюции различных филогенетических линий комплекса. Также мы выдвигаем предположения о связи наблюдаемой генетической изменчивости с морфологической и экологической и о степени родства *E. nordenskioldi* с некоторыми другими видами рода *Eisenia*. На основе полученных данных мы попытались выдвинуть гипотезы о генетической структуре вида *E. nordenskioldi* и предлагаем дальнейшие подходы к его изучению.

Ключевые слова: дождевые черви; *Eisenia nordenskioldi*; *Eisenia nordenskioldi pallida*; Lumbricidae; Россия; *cox1*.

Genetic diversity of the earthworm *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida)

S.V. Shekhovtsov¹✉, D.I. Berman²,
E.V. Golovanova³, S.E. Peltek¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Biological Problems of the North FEB RAS, Magadan, Russia

³ Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia

Eisenia nordenskioldi (Eisen, 1879) is the most wide-spread earthworm species in Siberia. It inhabits a wide range of habitats, from tundra to forest steppe, and is characterized by high morphological, ecological, and karyotypic diversity. *E. nordenskioldi* is usually divided into two subspecies, the pigmented *E. n. nordenskioldi* and the unpigmented *E. n. pallida*; a set of *Eisenia* species with a close diagnosis was also isolated from *E. nordenskioldi* in the last fifty years. This high diversity makes this species a promising model for studying earthworm speciation and evolution. In this study, we review all available information on the genetic and ecological diversity of *E. nordenskioldi*, including our published and unpublished data, as well as studies of other authors. We demonstrate that each subspecies of *E. nordenskioldi* (*E. n. nordenskioldi* and *E. n. pallida*) can be divided into several genetic lineages based on differences in mitochondrial and nuclear DNA. The studied lineages diverged several million years ago, and population groups within each lineage, hundreds of thousands years ago. We report distributions and genetic patterns for each of the detected genetic lineages. Subspecies *E. n. nordenskioldi* and *E. n. pallida* are most probably non-monophyletic, and the pigmentation character is labile and possibly independently evolved in different lineages. We also propose hypotheses on the interplay of its observed genetic diversity with morphological and ecological variation, as well as on the relationships of *E. nordenskioldi* with certain species of the genus *Eisenia*. Based on the available information, we attempt to present a general outlook on *E. nordenskioldi* genetic structure and further directions of its study.

Key words: earthworms; *Eisenia nordenskioldi*; *Eisenia nordenskioldi pallida*; Lumbricidae; Russia, *cox1*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шеховцов С.В., Берман Д.И., Голованова Е.В., Пельтек С.Е. Генетическое разнообразие дождевого червя *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. DOI 10.18699/VJ17.24-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Golovanova E.V., Peltek S.E. Genetic diversity of the earthworm *Eisenia nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017. DOI 10.18699/VJ17.24-o (in Russian)

В 1875 г. экспедиция под руководством Н.А.Э. Норденшюльда (Nils Adolf Erik Nordenskiöld) на судне «Превен» отправилась исследовать Северо-Восточный проход. В устье Енисея члены экспедиции отослали корабль обратно, а сами на лодках поднялись по реке до Красноярска и вернулись в Европу сухопутным путем. В ходе путешествия были собраны коллекции растений и животных, в том числе и дождевых червей. Вернувшись, Н.А.Э. Норденшюльд передал коллекции червей своему соотечественнику, А.Г. Эйзену (August Gustaf Eisen), который и обнаружил в образцах с о. Вайгач и ряда точек по течению Енисея новый вид, который назвал *Allolobophora nordenskioldi* (Eisen, 1879).

В дальнейшем дождевые черви, подходящие под диагноз этого вида (перенесенного впоследствии в род *Eisenia*), были собраны почти по всей Северной Азии, а также в некоторых регионах Средней и Восточной Азии, на Урале и востоке Восточной Европы. Со временем стало ясно, что *Eisenia nordenskioldi* – большой полиморфический вид. По морфологическим признакам из него было выделено несколько новых видов – *E. lagodechiensis* (Закавказье), *E. acystis* (Тянь-Шань) и *E. atlavinyteae* (Западная и Восточная Сибирь, Урал, Монголия). Но и в оставшемся объеме вида морфологическая изменчивость внутри *E. nordenskioldi* велика. В настоящее время в его пределах выделяют два подвида: пигментированный номинативный *E. n. nordenskioldi* и непигментированный *E. n. pallida*. Последний был описан И.И. Малевичем (1956) как форма *E. nordenskioldi*, но впоследствии повышен до статуса подвида *E. n. pallida* Malevič 1956 (Перель, 1994; Всеволодова-Перель, 1997; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008).

По данным кариологического анализа, известно, что для *E. nordenskioldi* характерно большое число рас различной пloidности. Изначально считалось, что диплоидный набор этого вида содержит 24 хромосомы (Графодатский и др., 1982), однако затем было установлено, что на самом деле он больше (36 хромосом) (Булатова и др., 1987). *E. nordenskioldi* включает в себя ди-, тетра-, гекса- и октаплоидные расы (Viktorov, 1997; Всеволодова-Перель, Булатова, 2008).

Следует отметить, что ситуация с кариотипами *E. nordenskioldi* требует дальнейшего изучения. Во-первых, по нашему опыту, очень сложно получить препараты метафазных хромосом этого вида. Во-вторых, на метафазных пластинках полиплоидных рас почти никогда нельзя насчитать ожидаемого количества хромосом: как правило, 5–10 хромосом на каждой пластинке теряются либо накладываются друг на друга. Наконец, появились сведения о существовании предположительно декаплоидной расы *E. n. nordenskioldi* с числом хромосом около 180, найденной в Алтайском крае на берегу р. Чумыш около деревни Тальменка (К. Задесенец, неопубл. данные).

Т.В. Малинина и Т.С. Перель (1984) проанализировали несколько популяций *E. nordenskioldi* методом изоферментного анализа. Ограничения метода не позволяют однозначно проследить родственные отношения между популяциями. Тем не менее авторы предположили, что октаплоидные расы *E. nordenskioldi* в разных регионах, по-видимому, возникли независимо.

В начале XXI в. к дождевым червям начали применять методы молекулярной генетики. Пионерные работы были

посвящены лишь частным вопросам, например взаимоотношениям видов *Eisenia fetida* и *Eisenia andrei* (Pérez-Losada et al., 2005) или форм вида *Octolasion tyrtaeum* (Heethoff et al., 2004). Однако в первой же большой работе, включавшей в себя целый ряд европейских космополитов (King et al., 2008), было показано, что для дождевых червей характерна очень высокая генетическая изменчивость. Авторы исследовали генетическое разнообразие фрагмента гена *cox1* у девяти космополитных видов из нескольких точек Великобритании и обнаружили, что четыре из них на филогенетическом дереве представлены несколькими ветвями, которые были названы филогенетическими линиями (genetic lineages). Число попарных нуклеотидных замен между линиями составляет примерно 15 %, при том, что для большинства видов животных внутривидовая изменчивость редко превышает 2 %. Существование такой высокой внутривидовой изменчивости затем было подтверждено для различных видов множеством работ (например, Pérez-Losada et al., 2009; Fernández et al., 2015; Porco et al., 2013).

В целом эта изменчивость и ее причины до конца не поняты. Логично предположить, что обнаруживаемые филогенетические линии – это виды-двойники. В ряде случаев, вероятно, так и есть. Тем не менее картина иногда оказывается более сложной. Нередко филогенетические линии, различающиеся на 15 % и более по мтДНК, не имеют заметных отличий по ядерной ДНК (Martinsson et al., 2016). Также возможна ситуация, когда различия по ядерным генам все же есть, но выявляются редкие случаи скрещивания между линиями (Dupont et al., 2011; Shekhovtsov et al., 2014a). Если последнее может быть следствием неполного репродуктивного барьера между линиями, то полное отсутствие различий по ядерной ДНК часто объясняют интрогрессией, т.е. замещением митохондрий одного вида митохондриями другого. В последнем случае, правда, должен существовать источник интрогрессии, но ни в одной работе таковой пока обнаружен не был.

Вполне возможно, что для мтДНК дождевых червей характерна высокая скорость нуклеотидных замен по сравнению с большинством других животных. Хорошо известно, что мтДНК животных имеет более высокую скорость замен по сравнению с ядерной ДНК, что можно объяснить как большей частотой мутаций (например, из-за меньшего набора ферментов репарации и мутагенной среды в митохондриях), так и высокой скоростью их фиксации. Причины, по которым мтДНК именно дождевых червей имела бы повышенную скорость эволюции, пока не известны, но могут быть, вероятно, со временем объяснены. Тем не менее остается непонятным, почему в одних случаях наблюдается огромная генетическая изменчивость, а в других – отсутствие таковой (см. раздел «*E. n. pallida*»).

Одна из первых работ по изучению генетического разнообразия *E. nordenskioldi* проведена нами на популяциях номинативного подвида с юга Западной Сибири (Shekhovtsov et al., 2013). У него было выявлено шесть филогенетических линий; их назвали линиями 1–6 по порядку обнаружения. В дальнейшем мы продолжили собирать и генотипировать коллекцию дождевых червей из

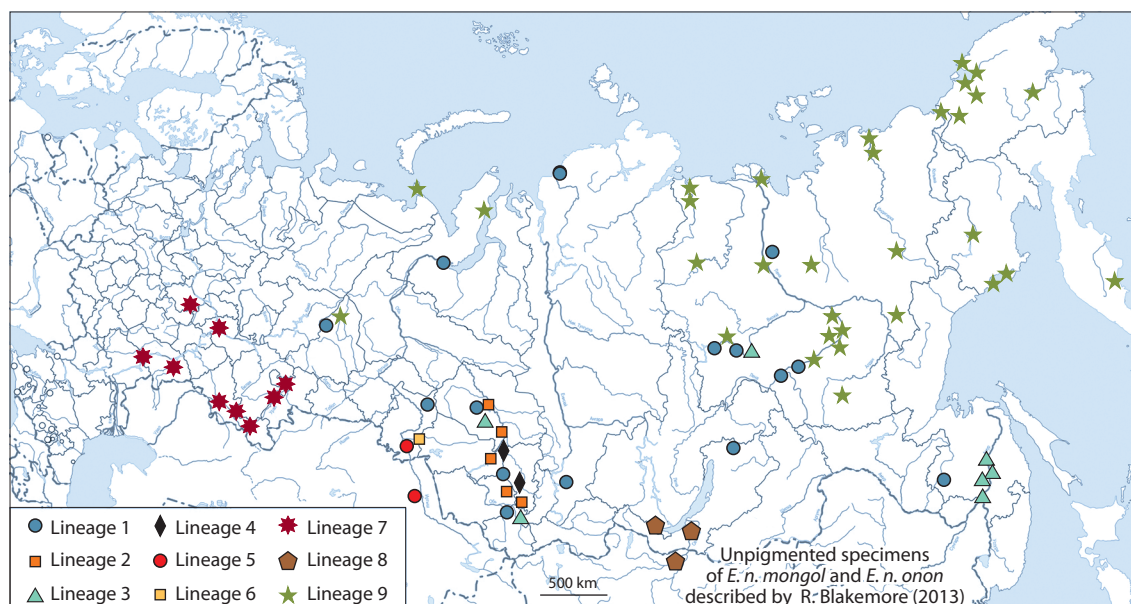


Fig. 1. The distribution of *E. n. nordenskioldi* lineages.

разных регионов России. Результаты проведенной работы представлены на рис. 1. Ниже описана характерная для каждого региона картина, выявленная на текущий момент, и проанализированы полученные результаты. Цель настоящей работы – охарактеризовать генетику и вероятный эволюционный сценарий *E. nordenskioldi* как модельного политипического вида дождевых червей.

Западная Сибирь

В настоящее время относительно подробной информацией мы обладаем только для Новосибирской области и Алтайского края. Наибольший ареал здесь имеют линии 1 и 3, которые встречаются также и в других регионах Азии (см. рис. 1). Линия 2, названная так нами в исходной работе (Shekhovtsov et al., 2013), была затем отнесена к виду *E. sibirica*. Этот вид приурочен к Алтае-Саянской горной системе, в том числе к Салаирскому краю и Кузнецкому Алатау (Всеволодова-Перель, 1997); мы расширили ареал на прилегающую к названным краям равнинную часть, вплоть до р. Чая (Берман и др., 2016).

Филогенетическая линия 4 была обнаружена только на Салаирском краю. Судя по последовательностям ДНК, она близка к линии 2 (*E. sibirica*) и встречается симпатрично с ней. Все остальные линии *E. nordenskioldi*, судя по мтДНК, заметно дивергировали друг от друга, и только линии 2 и 4 сохраняют следы близкого родства и могут быть использованы как пример не слишком сильной дивергенции.

В черте г. Омска найдены две филогенетические линии *E. n. nordenskioldi*, 5 и 6, соответственно, на правом и левом берегах р. Иртыш. Линия 5 также была обнаружена в Казахстане вблизи с. Баянаул (см. рис. 1).

Представление о *E. n. nordenskioldi* как о комплексе филогенетических линий стало для нас еще более сложным после изучения популяций Республики Алтай. Известно, что эта горная страна – один из центров эндемизма люмбрицид (Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997):

там обитает три эндемичных вида рода *Eisenia*. Морфологическое изучение собранной коллекции показало, что для дождевых червей региона характерна, прежде всего, высокая морфологическая изменчивость. Известно, что у обоих подвидов *E. nordenskioldi* пояс расположен на 27–33-м сегментах тела, а пубертатные валики – на 29–31-м сегментах; кроме того, у номинативного подвида на латеральных областях с 9-го по 11-й сегмент расположены светлые пятна. У близкородственного пигментированного вида *E. atlavinyteae* они занимают 26 (27)–33-й сегменты, а пубертатные валики – 28–31-й (Всеволодова-Перель, 1997). В популяциях из Республики Алтай встречалась смесь из всех этих форм. Кроме того, у образцов *E. n. nordenskioldi* с типичным положением пояса и пубертатных валиков светлые пятна на латеральных поверхностях тела 9–11-го сегментов обнаруживались не всегда, тогда как у особей с пубертатными валиками, расположенными с 28-го по 31-й сегмент, эти пятна присутствовали во всех случаях. Иными словами, фенотип пигментированных червей можно назвать промежуточным между *E. n. nordenskioldi* и *E. atlavinyteae*. Более того, встречались экземпляры, соответствовавшие диагнозу *E. sibirica*, но с «наплыванием» пубертатных валиков на 28 и 31-й сегменты. Также наряду с *E. n. pallida* встречались и непигментированные особи *E. atlavinyteae*.

Южный и Средний Урал и Предуралье

Как известно, множество европейских видов дождевых червей смогли успешно освоить Сибирь (Всеволодова-Перель, 1997), однако единственным сибирским видом, проникшим в Европу, можно считать только *E. nordenskioldi*, а точнее, его номинативный подвид. Известно, что граница вида заходит достаточно далеко на юг; в частности, он встречается в Крыму (Пышкин и др., 2005), Днепропетровской области (Жуков и др., 2007). На севере западная граница вида проходит приблизительно в районе бассейна Северной Двины (Всеволодова-Перель, 1997).

Точные границы ареала *E. n. nordenskioldi* в Европе установить непросто, так здесь он весьма редок (Перель, 1979).

Пока мы имеем выборки лишь из небольшого числа точек с Урала, а также с Восточно-Европейской равнины, самые западные из которых находятся в Саратовской и Владимирской областях (см. рис. 1). По данным проведенного нами анализа (Shekhovtsov et al., 2016a), на изучаемой территории обитает отдельная, 7-я, филогенетическая линия *E. n. nordenskioldi*, которая пока не найдена к западу от Урала. Филогенетический анализ показал, что ее популяции с Урала отличаются гораздо большим генетическим разнообразием, чем равнинные, которые представляют собой одну ветвь среди нескольких уральских. Можно утверждать, что 7-я линия *E. n. nordenskioldi* отделилась от прочих линий вида около полутора миллионов лет назад. Все исследованные нами выборки с Восточно-Европейской равнины происходят от одной популяции, которая, скорее всего, обитала на восточных склонах Южного Урала. Заселение Восточно-Европейской равнины происходило приблизительно полмиллиона лет назад. Таким образом, и уральские, и равнинные популяции пережили несколько циклов оледенения, что говорит об их высокой холодоустойчивости.

Север Евразии

Северные части Сибири, Дальнего Востока и европейской части России мы рассматриваем отдельно в связи с климатическими особенностями этих регионов. Известно, что во время последнего оледенения (и, вероятно, предыдущих) север Европы и Северной Америки был покрыт ледниковыми щитами, что привело к «стиранию» всей биоты. В то же время считается, что на севере Азии сплошного ледникового щита не было, а имели место лишь локальные оледенения. При этом происходила смена сообществ с тундровых и бореальных на тундро-степные и обратно (Dubatolov, Kosterin, 2000).

На исследованной территории доминирует 9-я филогенетическая линия *E. n. nordenskioldi*. Ее филогеография изучена достаточно подробно, по крайней мере в северо-восточной части ареала. Наибольшее ее генетическое разнообразие приходится на верховья Лены. Отдельные популяции расселились по другим районам. В частности, можно выделить близкородственные группы популяций с Северного Урала, о. Вайгач и Обской губы, из бассейна Колымы и прилегающего побережья Восточно-Сибирского моря, а также тауйскую (по названию одноименной губы).

Время дивергенции между гаплотипами в пределах отдельных популяций может превышать сотни лет, а оценочный возраст всей собранной нами выборки 9-й линии превышает 1 млн лет. Хотя и ранее было известно, что северные популяции *E. n. nordenskioldi* обладают очень высокой устойчивостью к низким температурам и низкой влажности, мы показали, что многие популяции 9-й линии смогли пережить *in situ* несколько оледенений даже за полярным кругом, несмотря на неоднократную смену сообществ.

Восточная Сибирь

С юга Восточной Сибири в нашей коллекции есть черви пока лишь из двух точек: с западного побережья Байкала

(п. Большие Коты) и из окрестностей г. Улан-Удэ. Их мы предварительно отнесли к филогенетической линии 8 подвида *E. n. nordenskioldi*. R.J. Blakemore опубликовал работу (2013), в которой привел описание и последовательности ДНК образцов из Северной Монголии (аймак Хентий). На основании полученных данных автор выделил два новых подвида *E. nordenskioldi*: *E. n. mongol* и *E. n. onon*. Судя по последовательностям ДНК, оба подвида относятся к названной выше линии 8 *E. n. nordenskioldi*. Интересно, что при довольно близком генетическом родстве оба новых подвида имеют лишь розоватую окраску на передних 15 сегментах тела (Blakemore, 2013), в то время как наши образцы из Бурятии и Иркутской области имели бурую окраску. Эти данные также говорят о возможной лабильности признака пигментации. В описаниях морфологических отличий автор ссылается на S. Kobayashi (1940), T.S. Perel (1969) и A. Zicsi (1972), а не на более новые работы Т.С. Всеволодовой-Перель (возможно, из-за того, что они не были переведены на английский язык), вследствие чего дан неточный диагноз по сравнению с принятым сейчас. По-видимому, в Северной Монголии, как и на Алтае, имеет место значительный разброс морфологических признаков внутри комплекса *E. n. nordenskioldi*. В неопубликованных материалах Т.С. Всеволодовой-Перель за 1971–1973 гг. сообщается об обнаружении в аймаках Селенгэ и Дархан (Северная Монголия) *E. n. pallida* и *E. atlavinyteae* с положением пояса с 26-го по 33-й сегмент. *E. n. mongol* имеет то же положение пояса, в то время как у *E. n. onon* он начинается на 24-м–25-м сегментах. То, что эти очевидные морфологические различия не сопровождаются заметными генетическими отличиями, говорит, что положение пояса – действительно вполне лабильный признак.

Здесь также следует отметить разницу в подходах отечественных и зарубежных специалистов. Если в России четко принимается разделение на два подвида, непигментированный и пигментированный, то, например, Y. Hong и C. Csuzdi (2016) считают *pallida* всего лишь формой, называя свои непигментированные образцы *E. norden-skioldi*. R.J. Blakemore же предпочел описать два новых подвида наряду с *E. n. nordenskioldi* и *E. n. pallida*, также не рассматривая пигментацию как важный признак.

Дальний Восток

Данные по *E. n. nordenskioldi* с юга Дальнего Востока России немногочисленны. Пока мы можем сказать, что на этой территории встречаются филогенетические линии 1 и 3, причем эти популяции лишь отдаленно родственны таковым из Западной Сибири. Таким образом, расселение этих линий по Сибири происходило достаточно давно (сотни тысяч лет назад), как и в случае линии 9.

E. n. pallida

Как было сказано выше, *E. n. pallida* изначально считалась всего лишь непигментированной формой *E. nordenskioldi* (Малевич, 1956). Со временем накопилось достаточно данных и о прочих его отличиях от номинативного подвида. Последний относится к подстилочной экологической группе, а *E. n. pallida* – к почвенной. Есть различия и в ряде признаков внутреннего строения (Перель, 1982,



Fig. 2. The distribution of *E. n. pallida* lineages.

1994; Perel, 1987; Всеволодова-Перель, 1997): в частоте и амплитуде спонтанной сократительной активности мышц мускульного желудка, а также в холинорецепторных и адренорецепторных характеристиках. Считается, что *E. n. pallida* имеет диплоидный набор хромосом ($2n = 36$), тогда как номинативный подвид – полиплоид (Kashmenskaya, Polyakov, 2008; Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014). Оба подвида *E. nordenskioldi* имеют высокую холодоустойчивость, однако у *E. n. pallida* она несколько ниже (Берман, Мещерякова, 2013; Мещерякова, Берман, 2013).

Ареал *E. n. pallida* значительно меньше, чем у номинативного подвида: он лежит севернее 60-й–62-й параллели только в долине Енисея, а также не встречается на Урале и в Европе. По данным Т.С. Всеволодовой-Перель и А.Н. Лейрих (2014), есть лишь единичные находки этого вида на Иртыше и Тоболе (в районе Омска и Тюмени соответственно), в то время как вдоль Оби он повсеместно распространен к югу от Томска (56° с. ш.). На юге границы распространения обоих подвидов, по-видимому, приблизительно совпадает (Курчева, 1977; Всеволодова-Перель, 1997; Бессолицына, 2012).

E. n. pallida пока изучен гораздо хуже, чем номинативный подвид. В недавно опубликованной работе исследованная выборка образцов данного подвида из 18 точек (рис. 2) разделена на пять филогенетических линий, которые были также пронумерованы нами как линии 1–5 независимо от линий *E. n. nordenskioldi* с тем же номером (Shekhovtsov et al., 2016c). Их географическое распространение показано на рис. 1. Хотя количество точек пока невелико, уже можно предположить, что линия 1 широко распространена и, вероятно, захватывает значительную часть Восточной Сибири. Линии 2 и 3 приурочены к горной системе Сихотэ-Алинь и прилегающим территориям, линия 4 найдена только в окрестностях Олёкминска (Якутия), а линия 5 – в Казахстане.

Филогенетическая линия 1 *E. n. pallida* выбивается из картины, характерной для остальных линий *E. nordenskioldi*.

Последние характеризуются большими генетическими расстояниями внутри популяций, тогда как у представителей линии 1 *E. n. pallida* обнаружен лишь один гаплотип *cox1*, несмотря на большие географические расстояния между обследованными популяциями (см. рис. 2). Генетическое разнообразие по ядерным последовательностям также было меньше, чем у других филогенетических линий *E. nordenskioldi*. Здесь следует добавить, что наименьшее генетическое разнообразие обычно отмечают у широко распространенных космополитных видов, популяции которых обычно имеют малое число особей-основателей. Однако настолько низкого генетического разнообразия не имеют даже филогенетические линии широко распространенных космополитных видов (например, Cameron et al., 2008; Fernández et al., 2011a, 2013; Porco et al., 2013; Shekhovtsov et al., 2014a, 2016b). Это заставляет предположить, что линия 1 – космополитная, расселилась по территории Сибири и Дальнего Востока, по-видимому, в результате деятельности человека, и подтверждается тем, что собранные черви были приурочены к антропогенным местообитаниям: в Хакасии, Якутии и Магадане они найдены на огородах, в Архаре – на заросшей лесом свалке, а на Камчатке – в роще, часто посещаемой людьми. Кроме того, в окрестностях Магадана *E. n. pallida* обычен на огородах, но отсутствует здесь, как и в континентальных районах Магаданской области в природных биотопах.

Высокая холодоустойчивость позволяет линии 1 *E. n. pallida* переживать суровые зимы: черви с огородов окрестностей Магадана выдерживают до -28°C , их коконы – до -23°C . Благодаря столь высокой холодоустойчивости она занимает на изучаемой территории экологическую нишу, аналогичную в более теплых условиях нише европейского космополита *Aporrectodea caliginosa*, особи которого выдерживают охлаждение лишь до -5°C (коконы до -15°C).

В горной системе Сихотэ-Алинь и на прилегающих равнинных территориях мы обнаружили митохондриальные

линии 2 и 3. Сихотэ-Алинь относится к Маньчжурскому субрегиону Палеарктики, в то время как остальная часть ареала *E. n. pallida* – к Сибирскому субрегиону (Wallace, 1876). Фауны дождевых червей этих субрегионов сильно различаются (Всеволодова-Перель, 1997).

На филогенетическом дереве, построенном по митохондриальному гену *cox1*, эти линии значительно отстоят друг от друга (средние нуклеотидные расстояния между ветвями, вычисленные при помощи матрицы Kimura-2-parameter, составляют 24.2 %) (Shekhovtsov et al., 2016c). Однако на филогенетическом дереве, построенном по последовательностям ядерных рибосомальных спейсеров ITS2, они относятся к одной ветви. Как уже упоминалось, такие случаи нередки у дождевых червей.

Линия 2 *E. n. pallida*, как и представители линии 1, часто обнаруживается и в природных ландшафтах, и на сельскохозяйственных землях, причем в последнем случае зачастую вместе с космополитом *A. caliginosa* (линия 3 найдена пока только в лесах). Сказанное подтверждает сообщение (Всеволодова-Перель, Лейрих, 2014) о том, что этот подвид в Приморье адаптировался к жизни в синантропных местообитаниях.

Черви *E. n. pallida* митохондриальной филогенетической линии 4 найдены только вблизи г. Олёминск. Пока мы можем лишь предполагать, что ареал этой вполне устойчивой к холоду линии не слишком велик, так как она не была обнаружена в других точках нашей выборки.

E. n. pallida распространена и в Казахстане (Всеволодова-Перель, 1997; Abukenova, 2010). Червей этого подвида из Центрального и Восточного Казахстана мы отнесли к линии 5. На филогенетическом дереве, построенном по ядерным последовательностям, линия не вошла в группу линий *E. n. pallida* и *E. n. nordenskioldi* (Shekhovtsov et al., 2016c). Более того, последовательности филогенетической линии 5 оказались очень близки к неидентифицированному образцу Lumbricidae sp. из центральной Венгрии. Это весьма неожиданно, так как в Венгрии не встречаются ни *E. n. nordenskioldi*, ни *E. n. pallida*. Поэтому можно предположить, что казахстанская *E. n. pallida* – некий европейский вид, отличный от комплекса *E. nordenskioldi*.

Кроме того, в работу (Shekhovtsov et al., 2016c) не вошли образцы из Западной Сибири: с Салаирского кряжа и горных хребтов Алтая. По предварительным данным, в них обнаружено как минимум еще три линии *E. n. pallida*. Одна из них была ошибочно описана нами (Shekhovtsov et al., 2013) как *A. rosea* (диагнозы видов перекрываются; при положении пояса с 27-го по 33-й сегменты они отличаются только формой нефридных пузырей и расположением спинной поры, что не всегда можно увидеть в спиртовых плохо сохранившихся препаратах). Однако, как было сказано выше, ситуация с образцами *E. nordenskioldi* с Алтая и Салаира весьма сложна, и потому мы пока не квалифицируем их как новые линии этого вида.

Следует упомянуть данные, приведенные в недавней статье Y. Hong и C. Csuzdi (2016). Авторы описали последовательности *cox1* *E. n. pallida* из Южной Кореи. Они не имеют близкого сходства ни с одной линией *E. nordenskioldi*. Таким образом, *E. n. pallida* отличается не меньшим генетическим разнообразием, чем номинативный подвид.

Взаимоотношения между подвидами

На филогенетическом дереве, построенном по последовательностям ITS2 вместо двух ветвей, соответствующих подвидам *E. n. nordenskioldi*, все филогенетические линии перемешаны. Воздерживаясь от окончательных выводов до получения материалов по еще нескольким ядерным генам, можно между тем предполагать, что признак пигментации мог появляться и исчезать несколько раз в ходе эволюции комплекса *E. nordenskioldi*. В пользу этого говорят случаи, когда пигментация у червей *E. n. nordenskioldi* не выражена либо наоборот особи *E. n. pallida* имеют заметную пигментацию. В качестве примера последнего можно привести червей линии 1 *E. n. pallida* с Камчатки, которые имели светло-бурую окраску на переднем конце тела. Кроме того, по сообщениям D. Porco, среди непигментированных особей *E. n. pallida* с огородов окрестностей Магадана им были найдены представители линии 9 *E. n. nordenskioldi*. Еще один пример приведен в разделе «Восточная Сибирь».

В работе Т.С. Всеволодовой-Перель и А.Н. Лейрих (2014) сообщается, что *E. n. pallida* имеет диплоидный набор хромосом ($2n = 36$), а *E. n. nordenskioldi* – полиплоидный. Из этого следует, что *E. n. pallida* – изначальная форма, от которой путем полиплоидизации произошли пигментированные формы, возможно, несколько раз и независимо друг от друга. Нам кажется, что такое утверждение нельзя считать доказанным, так как кариотипы имеются только для небольшого ряда популяций (относящихся, соответственно, только к нескольким филогенетическим линиям из известных нам). Кроме того, по предварительным данным (К. Задесенец, неопубл.), *E. n. pallida* линии 1 из Магадана – тетраплоид.

Потребуется дальнейшие исследования, чтобы прояснить эволюцию всего комплекса филогенетических линий *E. nordenskioldi*.

Как устроен комплекс *E. nordenskioldi*?

Пока мы только начинаем понимать структуру комплекса *E. nordenskioldi*. Сейчас она более или менее полно описана лишь на уровне митохондриальных линий. Этот уровень весьма полезен, поскольку позволяет сделать некоторые предварительные выводы. Можно уже говорить о том, что почти каждая филогенетическая линия имеет региональную приуроченность, причем большинство из них (за исключением линий 1 обоих подвидов) не расселялись на новые территории с начала голоцена. Случаи совместного обнаружения линий, по-видимому, окажутся результатом вторичной симпатрии. Хотя и ранее было понятно, что вид *E. nordenskioldi* устроен сложно, можно сказать, что генетические различия связаны не только с плоидностью, но и с палеогеографией. Можно утверждать, что линии имели свои исходные, неперекрывающиеся ареалы, в пределах которых происходила независимая эволюция.

На данном этапе целесообразно поставить следующие вопросы, а также привести предполагаемые ответы на них: 1) подтверждаются ли различия митохондриальной ДНК на уровне ядерного генома? На основании уже полученных данных можно сказать, что в большинстве случаев ответ на этот вопрос будет положительный;

2) существуют ли выраженные морфологические либо экологические различия между филогенетическими линиями? Предварительные данные говорят о том, что некоторые линии отличаются и по морфологии, и по некоторым экологическим признакам. Так, например, линии 2 и 9, как, вероятно, еще и линии 1 и 3, имеют различную холодоустойчивость;

3) существует ли поток генов между филогенетическими линиями? Основываясь на данных, полученных на других видах дождевых червей (Dupont et al., 2011; Shekhovtsov et al., 2014b; Giska et al., 2015; Martinsson et al., 2016), вполне можно ожидать, что это так. Соответственно, стоит оценить его величину в каждом конкретном случае, когда разные линии обнаруживаются симпатрично;

4) каковы филогенетические отношения между филогенетическими линиями внутри вида? Ответ на данный вопрос потребует анализа филогении на основании нескольких ядерных генов. Подобный анализ в нашем случае затруднен в связи с тем, что многие филогенетические линии, по-видимому, являются полиплоидами. Полученные предварительные данные (см. раздел «*E. n. pallida*») свидетельствуют о том, что деление вида на подвиды по признаку присутствия пигмента может не соответствовать его филогении. В таком случае можно предполагать, что в ходе эволюции несколько раз происходили потеря и приобретение пигментации, а также смена горизонта обитания, пищевой специализации, т. е. жизненной формы.

Если в ходе предлагаемого филогенетического анализа ядерных генов будет показано, что вид действительно разделяется на взаимно монофилетичные группы, возникнут основания для пересмотра его систематики.

Неразрешенным остается вопрос с видом *E. atlavinyteae*. Скорее всего, под ним кроется несколько уже известных нам линий *E. nordenskioldi*. Это явно не одна линия, так как ареалы ни одной из филогенетических линий не соответствуют обширному ареалу *E. atlavinyteae*. Кроме того, большое число обнаруженных промежуточных морфологических форм между *E. atlavinyteae* и *E. nordenskioldi* не позволило нам до сих пор собрать коллекцию червей ряда несомненных популяций *E. atlavinyteae*, необходимую для уверенных выводов.

Реальная картина может оказаться еще сложнее. На других видах дождевых червей показано, что зачастую филогенетические линии могут быть практически полностью репродуктивно изолированы довольно длительное время, однако редкие межлинейные скрещивания приводят к небольшому потоку генов, который может быть детектирован современными методами молекулярной генетики (Dupont et al., 2011; Shekhovtsov et al., 2014b; Giska et al., 2015; и др.), а важнейшие признаки (например, наличие/утрата мужского полового аппарата) могут быть в разном состоянии у разных популяций одного вида (Fernández et al., 2011b).

Таким образом, на уровне ДНК *E. nordenskioldi* представляет собой комплекс филогенетических линий, дивергировавших более миллиона лет назад и полностью или частично изолированных репродуктивно. Тем не менее

пока не удастся привести изученные линии к однозначному соответствию «одна филогенетическая линия – одна раса определенной плоидности – комплекс морфологических отличий (положение пояса и т. д.)». Скорее всего, отношения между этими признаками более сложные, а морфологическим признакам свойственна определенная лабильность.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0003; President of the Russian Federation, project MK 6685.2015.4, and the Russian Foundation for Basic Research, project 14-04-01121_a.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abukenova V.S. Earthworm fauna of Kazakh upland. Zoology in the Middle East. 2010;51:161-169. DOI 10.1080/09397140.2010.10638469.
- Berman D.I., Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N. Cold hardiness and range of the earthworm *Eisenia sibirica* (Oligochaeta, Lumbricidae). Cont. Probl. Ecol. 2016;9:45-52. DOI 10.15372/sej20160106.
- Berman D.I., Meshcheryakova E.N. Ranges and cold hardiness of two earthworm subspecies (*Eisenia nordenskioldi*, Lumbricidae, Oligochaeta). Biol. Bulletin. 2013;40:719-727. DOI 10.1134/S1062359013090021.
- Bessolitsyna E.P. Ecological and geographic distribution patterns of earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) in landscapes of southern Middle Siberia. Russ. J. Ecol. 2012;43:82-85. DOI 10.1134/S106741361106004X.
- Blakemore R.J. Earthworms newly from Mongolia (Oligochaeta, Lumbricidae, *Eisenia*). ZooKeys. 2013;285:1-21. DOI 10.3897/zookeys.285.4502.
- Bulatova N.Sh., Grafodatskiy A.S., Perel T.S. Chromosome set uniformity in polyploid earthworms: evidence from *Eisenia nordenskioldi*. Genetika = Genetics (Moscow), 1987;23:571-574. (in Russian)
- Cameron E.K., Bayne E.M., Coltman D.W. Genetic structure of invasive earthworms *Dendrobaena octaedra* in the boreal forest of Alberta: insights into introduction mechanisms. Mol. Ecol. 2008;17:1189-1197. DOI 10.1111/j.1365-294X.2007.03603.x.
- Dubatolov V.V., Kosterin O.E. Nemoral species of Lepidoptera (Insecta) in Siberia: a novel view on their history and the timing of their disjunctions. Entomologica Fennica. 2000;11:141-166.
- Dupont L., Lazrek F., Porco D., King R.A., Rougerie R., Symondson W.O.C., Livet A., Richard B., Decaëns T., Butt K.R., Mathieu J. New insight into the genetic structure of the *Allolobophora chlorotica* aggregate in Europe using microsatellite and mitochondrial data. Pedobiologia. 2011;54:217-224. DOI 10.1016/j.pedobi.2011.03.004.
- Eisen G. On the Oligochaeta collected during the Swedish Expeditions to the Arctic regions in the years 1870, 1875 and 1876. Kongl. Sv. Vetensk. Akad. Handl. 1879;15:1-49.
- Fernández R., Almodóvar A., Novo M., Gutiérrez M., Díaz Cosín D.J. A vagrant clone in a peregrine species: Phylogeography, high clonal diversity and geographical distribution in the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828). Soil Biol. Biochem. 2011a;43:2085-2093. DOI 10.1016/j.soilbio.2011.06.007.
- Fernández R., Almodóvar A., Novo M., Gutiérrez M., Díaz Cosín D.J. Earthworms, good indicators for palaeogeographical studies? Testing the genetic structure and demographic history in the peregrine earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) in southern Europe. Soil Biol. Biochem. 2013;58:127-135. DOI 10.1016/j.soilbio.2012.10.021.
- Fernández R., Bergmann P., Almodóvar A., Cosín D.J.D., Heethoff M. Ultrastructural and molecular insights into three populations of *Apor-*

- rectodea trapezoides* (Dugés, 1828) (Oligochaeta, Lumbricidae) with different reproductive modes. *Pedobiologia*. 2011b;54:281-290. DOI 10.1016/j.pedobi.2011.04.003.
- Fernández R., Novo M., Marchán D.F., Díaz Cosín D.J. Diversification patterns in cosmopolitan earthworms: similar mode but different tempo. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2015;94:701-708. DOI 10.1016/j.ympev.2015.07.017.
- Giska I., Sechi P., Babik W. Deeply divergent sympatric mitochondrial lineages of the earthworm *Lumbricus rubellus* are not reproductively isolated. *BMC Evol. Biol.* 2015;15:217. DOI 10.1186/s12862-015-0488-9.
- Grafodatsky A.S., Perel T.S., Radzhabli S.I. Chromosome sets of two forms of *Eisenia nordenskioldi* (Eisen) (Oligochaeta: Lumbricidae). *Doklady Akademii nauk SSSR = Proceedings of the Academy of Sciences of USSR*. 1982;262:1514-1516. (in Russian)
- Heethoff M., Etzold K., Scheu S. Mitochondrial COII sequences indicate that the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Savigny, 1826) constitutes of two lineages differing in body size and genotype. *Pedobiologia*. 2004;48:9-13. DOI 10.1016/j.pedobi.2003.04.001.
- Hong Y., Csuzdi C. New data to the earthworm fauna of the Korean Peninsula with redescription of *Eisenia koreana* (Zicsi) and remarks on the *Eisenia nordenskioldi* species group (Oligochaeta, Lumbricidae). *Zoological Studies*. 2016;55:12. DOI 10.6620/zs.2016.55-12.
- Kashmenskaya M.N., Polyakov A.V. Karyotype analysis of five species of earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae). *Comp. Cytogenet.* 2008;2:121-125.
- King R.A., Tibble A.L., Symondson W.O.C. Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Mol. Ecol.* 2008;17(21):4684-4698. DOI 10.1111/j.1365-294X.2008.03931.x.
- Kobayashi S. Terrestrial Oligochaeta from Manchoukuo. *The Science Reports of the Tohoku Imperial University. IV Series*. 1940;15: 256-261.
- Kurcheva G.F. Pochvennye bespozvonochnye sovetskogo Dalnego Vostoka (Soil Invertebrates in the Soviet Far East). Moscow, Nauka Publ., 1977. (in Russian)
- Malevich I.I. On the study of earthworms in the Far East. *Uchenye zapiski MGPI im. V.P. Potemkina = Proceedings of the Potemkin Pedagogical Institute, Moscow*. 1956;61:439-449. (in Russian)
- Malinina T.V., Perel T.S. Characteristics of *Eisenia nordenskioldi* (Oligochaeta, Lumbricidae) chromosome races using allozyme markers. *Doklady Akademii nauk SSSR = Proceedings of the Academy of Sciences of USSR*. 1984;279:1265-1269. (in Russian)
- Martinsson S., Rhodén C., Erséus C. Barcoding gap, but no support for cryptic speciation in the earthworm *Aporrectodea longa* (Clitellata: Lumbricidae). *Mitochondrial DNA*. 2016. DOI 10.3109/19401736.2015.1115487.
- Meshcheryakova E.N., Berman D.I. The coldhardiness and geographic distribution of earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae, Moniligastridae). *Zoologicheskii zhurnal = Zoological Journal (Moscow)*. 2013;93:53-64. DOI 10.7868/S0044513414010127. (in Russian)
- Perel T.S. Die Regenwurm (Lumbricidae) des Gebirgigen Mittelasiens. *Pedobiologia*. 1969;9:55-68.
- Perel T.S. Rasprostranenie i zakonornosti raspredeleniya dozhdevykh chervy fauny SSSR [Range and regularities in the distribution of earthworms of the USSR fauna]. Moscow, Nauka Publ., 1979. (in Russian)
- Perel T.S. Geographical peculiarities of reproduction of the earthworms of the family Lumbricidae (Oligochaeta). *Zoologicheskii zhurnal = Zoological Journal (Moscow)*. 1982;43:649-658. (in Russian)
- Perel T.S. The nature of eurytopy of polyploid earthworm species in relation to their use in biological soil amelioration. *Biol. Fert. Soils*. 1987;3:103-105.
- Perel T.S. Earthworms in forests of the Western Sayan (with the description of a new species). *Zoologicheskii zhurnal = Zoological Journal (Moscow)*. 1994;73:18-22. (in Russian)
- Pérez-Losada M., Eiroa J., Mato S., Domínguez J. Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Pedobiologia*. 2005; 49:317-324. DOI 10.1016/j.pedobi.2005.02.004.
- Pérez-Losada M., Ricoy M., Marshall J.C., Domínguez J. Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009;52:293-302. DOI 10.1016/j.ympev.2009.04.003.
- Porco D., Decaens T., Deharveng L., James S.W., Skarzynski D., Erseus C., Butt K.R., Richard B., Hebert P.D.N. Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America. *Biol. Invasions*. 2013;15:899-910. DOI 10.1007/s10530-012-0338-2.
- Pyshkin V.B., Jevstafjev A.I., Gromenko V.M., Rybka T.S. Biodiversity and functional role of earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae) in terrestrial ecosystems of Crimea. *Zoocenosis Bioriznomanittja ta rol' zoocenoza v pryrodnyh i antropogennyh ekosystemah: materialy III Mizhnarodnoi' naukovoï konferencii* [Proceedings of the III International Scientific Conference]. Dnepropetrovsk, DNU Publ., 2005;209-211. (in Russian)
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Peltek S.E. Phylogeography of the earthworm *Eisenia nordenskioldi nordenskioldi* (Lumbricidae, Oligochaeta) in Northeastern Eurasia. *Dokl. Biol. Sci.* 2015;461:1-4. DOI 10.1134/S0012496615020039.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Cryptic diversity within the Nordenskiöld's earthworm, *Eisenia nordenskioldi* subsp. *nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). *Eur. J. Soil Biol.* 2013;58:13-18. DOI 10.1016/j.ejsobi.2013.05.004.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Genetic diversity of the earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Lumbricidae, Annelida). *Pedobiologia*. 2014a;57:245-250. DOI 10.1016/j.pedobi.2014.09.002.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Invasive lumbricid earthworms of Kamchatka (Oligochaeta). *Zoological Studies*. 2014b;53:52. DOI 10.1186/s40555-014-0052-0.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Mitochondrial DNA variation in *Eisenia n. nordenskioldi* (Lumbricidae) in Europe and Southern Urals. *Mitochondrial DNA*. 2016a. DOI 10.3109/19401736.2015.1101594.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Different dispersal histories of lineages of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae, Annelida) in the Palearctic. *Biol. Invasions*. 2016b;18:751-761. DOI 10.1007/s10530-015-1045-6.
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Cryptic genetic lineages in *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Eur. J. Soil Biol.* 2016c;75:151-156. DOI 10.1016/j.ejsobi.2016.06.004.
- Viktorov A.G. Diversity of polyploid races in the family Lumbricidae. *Soil Biol. Biochem.* 1997;29:217-221.
- Vsevolodova-Perel T.S. Dozhdevye chervi Rossii: kadastr i opredelitel [The earthworms of the fauna of Russia: cadaster and key]. Moscow, Nauka Publ., 1997. (in Russian)
- Vsevolodova-Perel T.S., Bulatova N.Sh. Polyploid races of earthworms (Lumbricidae, Oligochaeta) in the East European Plain and Siberia. *Biol. Bull.* 2008;35:385-388. DOI 10.1134/S1062359008040092.
- Vsevolodova-Perel T.S., Leirikh A.N. Distribution and ecology of the earthworm *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae) dominant in southern Siberia and the Russian Far East. *Entomol. Rev.* 2014;94:479-485. DOI 10.1134/S0013873814040034.
- Wallace A.R. The Geographical Distribution of Animals. N. Y.: Harper and Brothers, 1876.
- Zicsi A. *Eiseniella koreana*, eine neue Regenwurm-Art (Oligochaeta: Lumbricidae). *Ann. Hist.-Nat. Mus. Nat. Hung.* 1972;64:129-132.
- Zhukov A.V., Pakhomov A.Y., Kunach O.N. Biologichne riznomanittja Ukraïny. Dnipropetrovs'ka oblast'. Doshhovi cherv'jaky (Lumbricidae) [Biological Diversity of Ukraine. The Dnipropetrovsk region. Earthworms (Lumbricidae)]. Dnipropetrovsk, DNU Publ., 2007. (in Ukrainian)

Полиморфизм интрона гена *rps16* у представителей рода *Malus* Mill. и родственных видов семейства Rosaceae Juss.

М.А. Филюшин¹✉, К.В. Борис^{1, 2}

¹ Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

Инtron хлоропластного гена *rps16*, кодирующего рибосомный белок 16S, относится к интронам группы II, для которых характерна способность к автономному сплайсингу. Последовательность этого интрона может быть достаточно полиморфной и широко применяется для молекулярно-генетических исследований у различных семейств растений. Однако участки интрона, функционально значимые для сплайсинга и формирования вторичной структуры пре-мРНК у представителей семейства Rosaceae, в том числе рода *Malus*, на сегодняшний день не описаны. Целью работы была характеристика нуклеотидных последовательностей интрона *rps16*, оценка их полиморфизма и идентификация отдельных структурных элементов интрона, определяющих правильный сплайсинг гена *rps16* у представителей рода *Malus* и родственных видов Rosaceae. Проведены амплификация, секвенирование и анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей интрона группы II хлоропластного гена *rps16* у 32 видов рода *Malus* и 17 видов из других родов семейства Rosaceae. Показано, что у представителей рода *Malus* данный интрон имеет крайне низкий уровень вариативности (1.5 %), так же как и у представителей рода *Prunus*, у которых полиморфизм интрона гена *rps16* был несколько выше (2.25 %). В изученных последовательностях интрона гена *rps16* были идентифицированы границы шести функциональных доменов, характерные для интронов группы II, а также сайты связывания IBS/EBS. Определены уровни вариативности последовательностей всех шести доменов и междоменных участков. Наиболее консервативными оказались домены V и VI, что может быть связано с ролью этих доменов в позиционировании всех структур пре-мРНК и формировании каталитически активной пространственной структуры интрона. Таким образом, впервые изучен полиморфизм интрона хлоропластного гена *rps16* у видов *Malus* и родственных видов Rosaceae. Идентифицированы границы всех шести функциональных доменов, характерные для интронов группы II, и сайты связывания IBS/EBS. Показано, что наиболее консервативными в последовательности интрона являются домены V и VI.

Ключевые слова: интроны группы II; *Malus*; Rosaceae; вторичная структура пре-мРНК; генетический полиморфизм.

Polymorphism of the *rps16* gene intron in *Malus* Mill. and related Rosaceae Juss. species

M.A. Filyushin¹✉, K.V. Boris^{1, 2}

¹ Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

The intron of the chloroplast *rps16* gene encoding ribosomal protein 16S belongs to group II introns, which have the capacity to self-splice. The sequence of this intron may be quite polymorphic and is widely used for molecular-genetic studies of different plant families. But regions of the intron important for splicing and organization of the pre-mRNA secondary structure in Rosaceae species including the genus *Malus* have not yet been described. The aim of the work was to characterize the nucleotide sequences of the *rps16* gene intron, to study their polymorphism and to identify the individual structural elements of the intron determining the correct splicing of the *rps16* gene in *Malus* species and related Rosaceae species. Nucleotide sequences of the *rps16* chloroplast gene group II intron from 32 *Malus* species and 17 related Rosaceae species were amplified, sequenced and their polymorphism was analyzed. The *rps16* intron sequence in the genus *Malus* appeared to be very conservative (1.5 %), as well as in *Prunus* species, the level of the *rps16* intron polymorphism was slightly higher (2.25 %). In the studied sequences the boundaries of the six functional domains typical of group II introns and IBS/EBS binding sites were identified. Variability of all the domains and inter-domain regions was studied. Domains V and VI were the most conservative, which may be due to their role in the positioning of the pre-mRNA structures and formation of the catalytically active secondary structure. Thus, polymorphism of the *rps16* gene intron was for the first time studied in *Malus* species and related Rosaceae species. The boundaries of all six functional domains typical of group II introns and IBS/EBS binding sites were identified. The most conservative were domains V and VI.

Key words: group II introns; *Malus*; Rosaceae; pre-mRNA secondary structure; genetic polymorphism.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Филюшин М.А., Борис К.В. Полиморфизм интрона гена *rps16* у представителей рода *Malus* Mill. и родственных видов семейства Rosaceae Juss. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):596-600. DOI 10.18699/VJ17.20-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Filyushin M.A., Boris K.V. Polymorphism of the *rps16* gene intron in *Malus* Mill. and related Rosaceae Juss. species. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekttsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):596-600. DOI 10.18699/VJ17.20-o (in Russian)

К интронам группы II относятся автономно сплайсируемые интроны, встречающиеся в бактериальных геномах, а также в цитоплазматических геномах растений (Carrillo et al., 2001; Brown et al., 2014). Точное вырезание интронов группы II в процессе сплайсинга достигается за счет формирования специфической консервативной вторичной структуры пре-мРНК, состоящей из шести доменов (Dai et al., 2008).

В митохондриальном и хлоропластном геномах высших растений насчитывается около 20 интронов группы II, но в процессе эволюции многие из них утратили способность к автономному сплайсингу, и их вырезание происходит аналогично ядерным интронам с помощью рибонуклеопротеидных комплексов (Brown et al., 2014; Zimmerly, Sempere, 2015). В пластидном геноме высших растений способность к автономному сплайсингу, по-видимому, сохранил только интрон гена *trnK* за счет наличия в его последовательности гена матуразы *matK* (Kelchner, 2002). Считается, что одного гена, кодирующего матуразу, достаточно для вырезания всех интронов группы II в хлоропластном геноме растений (Vogel et al., 1997), однако до сих пор не показано автономного вырезания ни одного интрона группы II у растений *in vitro* (Zimmerly, Sempere, 2015).

Интрон хлоропластного гена *rps16*, кодирующего рибосомный белок 16S, относится к интронам группы II. Интересно отметить, что у некоторых растений интрон в гене *rps16* может отсутствовать (Jansen et al., 2007), как и сам ген *rps16* (Lei et al., 2016).

В настоящее время последовательность и вторичная структура интрона гена *rps16* охарактеризованы у ряда однодольных и двудольных растений. Показано, что данный интрон может быть достаточно полиморфным у разных родов растений и содержать как единичные нуклеотидные замены, так и индели (Michel et al., 1989; Рыжова и др., 2009, 2013; Yuhua et al., 2011). Это обуславливает использование последовательностей интрона гена *rps16* для молекулярно-генетических исследований растений на различных таксономических уровнях (Smedmark et al., 2008; Рыжова и др., 2009, 2013).

У представителей Rosaceae интрон *rps16*, наряду с другими последовательностями хлоропластного и ядерного генома, ранее был использован для изучения филогении трибы Ругеае (Lo, Donoghue, 2012). Однако участки этого интрона, функционально значимые для сплайсинга и формирования вторичной структуры пре-мРНК у представителей семейства Rosaceae, в том числе рода *Malus*, на сегодняшний день не описаны. Целью данной работы была характеристика нуклеотидных последовательностей интрона *rps16*, оценка их полиморфизма и идентификация отдельных структурных элементов интрона, определяющих правильный сплайсинг гена *rps16* у представителей рода *Malus* и родственных видов Rosaceae.

Материалы и методы

Для анализа полиморфизма и вторичной структуры интрона гена *rps16* было отобрано 38 образцов 32 видов пяти основных секций рода *Malus*, а также 10 образцов видов других родов семейства Rosaceae (табл. 1). Для сравнительного анализа из базы данных NCBI были взяты

последовательности интрона гена *rps16* семи видов рода *Prunus* (см. табл. 1).

ДНК выделяли из свежих листьев и гербарного материала СТАВ методом с дополнительной очисткой хлороформом. Амплификацию последовательности интрона гена *rps16* проводили по стандартной методике с использованием реактивов производства «Диалат ЛТД» (Россия). Для амплификации и секвенирования полученных продуктов использовали праймеры *rps16F* (5'-AAA CGATGTGGTARAAAGCAAC-3') и *rps16R* (5'-AACATCW ATTGCAASGATTTCGATA-3'), соответствующие 3'-концу первого экзона и 5'-концу второго экзона гена *rps16* (Shaw et al., 2005).

Первичные нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов определяли с помощью системы BigDye на секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием соответствующих праймеров. Выравнивание и анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). В этой же программе определялось число вариабельных сайтов (нуклеотидные сайты выравненных последовательностей, в которых наблюдаются замены; синоним SNPs) и инсерций/делений (индели).

Результаты и обсуждение

Последовательность интрона гена *rps16* была амплифицирована и секвенирована у всех взятых в анализ образцов. У представителей рода *Malus* длина интрона варьировала от 859 п. н. у Антоновки обыкновенной и Антоновки Ольгинской до 887 п. н. у *M. soulandii*. У видов *Prunus* длина интрона менялась от 856 п. н. у *P. padus* до 871 п. н. у *P. persica*, а у видов из других родов Rosaceae этот показатель варьировал от 851 п. н. у *Chaenomeles japonica* до 889 п. н. у *Cydonia oblonga* (см. табл. 1). Выравненная длина интрона составила 932 п. н. Всего в последовательности интрона идентифицировано 98 вариабельных сайтов (10.5 % от выравненной длины интрона), из них для анализируемых видов *Malus* вариабельными были только 14 сайтов (1.5 %).

У всех анализируемых образцов на 5'-конце последовательности интрона выявлен мотив GTGCGA, соответствующий каноническому мотиву GUGYGA, участвующему в образовании междоменных связей при формировании вторичных структур, а на 3'-конце все последовательности имели мотив AAT, что соответствует каноническому мотиву RAY (Michel et al., 1989). Наличие этих мотивов позволяет отнести интрон гена *rps16* исследуемых образцов Rosaceae к типу IIB (Michel et al., 1989; Toor et al., 2001). Также у всех образцов в последовательности интрона были идентифицированы канонические полуконсервативные сайты связывания EBS1 (GTTGC) и EBS2 (TCTT), которые взаимодействуют при сплайсинге с сайтами связывания IBS1 (GCAAC) и IBS2 (AGAA), расположенными в первом экзоне гена *rps16* (Toor et al., 2001).

В последовательности интрона гена *rps16* у всех изучаемых образцов Rosaceae были определены границы шести доменов, характерных для интронов группы II (Michel et al., 1989) (табл. 2). Наиболее протяженным оказался домен I, длина которого у образцов *Malus* и

Table 1. Rosaceae accessions taken for chloroplast gene *rps16* intron polymorphism analysis

No	Species / variety	VIR accession number (if provided)	<i>rps16</i> intron length	No	Species / variety	VIR accession number (if provided)	<i>rps16</i> intron length
Section <i>Malus</i>				28	<i>M. sargentii</i>	2428	862
1	<i>M. caspiensis</i>	14943	860	29	<i>M. scheideckeri</i>	2407	862
2	<i>M. orientalis</i>	29484	864	30	<i>M. sieboldii</i>	2322	866
3	<i>M. prunifolia</i>	2430	865	31	<i>M. toringoides</i>	3109	866
4	<i>M. pumila</i>	2383	863	32	<i>M. transitoria</i>	2424	862
5	<i>M. purpurea</i>	2392	863	33	<i>M. zumi</i>	2427	866
6	<i>M. purpurea</i> var. <i>aldenhamensis</i>	2393	863	Section <i>Chloromeles</i>			
7	<i>M. ringo</i>	41280	863	34	<i>M. coronaria</i>	2336	885
8	<i>M. sieversii</i>	13280	863	35	<i>M. ioensis</i>	2352	886
9	<i>M. spectabilis</i>	2415	863	36	<i>M. platycarpa</i>	362179	884
10	<i>M. sylvestris</i>	14981A	864	37	<i>M. soulardii</i>	2414	887
11	<i>M. sylvestris</i>	41639	863	Section <i>Docyniopsis</i>			
12	<i>M. turkmenorum</i>	13283	862	38	<i>M. sikkimensis</i>	2412	863
<i>M. domestica</i> varieties				Other <i>Rosaceae</i>			
13	Антоновка обыкновенная	21190	859	39	<i>Aronia melanocarpa</i>		863
14	Антоновка Ольгинская	56	859	40	<i>Chaenomeles japonica</i>		851
15	Антоновка Полуторафунтовая	76	860	41	<i>Cotoneaster lucidus</i>		853
16	Антоновка из Севастопольской	8920	861	42	<i>Crataegus molis</i>		864
17	Golden Delicious	17477	862	43	<i>C. monogyna</i>		864
Section <i>Gymnomeles</i>				44	<i>C. submolis</i>		864
18	<i>M. baccata</i> var. <i>coerulescens</i>	2333	865	45	<i>Cydonia oblonga</i>		889
19	<i>M. cerasifera</i>	29494	864	46	<i>Mespilus germanica</i>		859
20	<i>M. denticulata</i>	29416	862	47	<i>Prunus kansuensis</i> (NC_023956)		869
21	<i>M. hupehensis</i>	14945A	863	48	<i>P. maximowiczii</i> (NC_026981)		863
22	<i>M. mandshurica</i>	14947	860	49	<i>P. mume</i> (NC_023798)		868
23	<i>M. robusta</i>	43199	865	50	<i>P. padus</i> (NC_026982)		856
Section <i>Sorbomalus</i>				51	<i>P. persica</i> (NC_014697)		871
24	<i>M. arnoldiana</i>	2312	863	52	<i>P. pseudocerasus</i> (NC_030599)		863
25	<i>M. florentina</i>	2345	885	53	<i>P. yedoensis</i> (NC_026980)		862
26	<i>M. floribunda</i>	2346	863	54	<i>Pyrus elata</i>		864
27	<i>M. fusca</i>	–	863	55	<i>Sorbus aucuparia</i>		861

Plant material was provided by: (1–26, 28–38) the Vavilov Research Institute of Plant Industry (VIR); (27, 42–44, 55) the Tsitsin State Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences; (39–41, 45, 46, 54) the Michurin All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Fruit Crops; (47–53) NCBI sequences.

большинства исследуемых представителей других родов *Rosaceae* составила 417 п. н. В этом домене у видов *Malus* было идентифицировано четыре SNPs: из них две замены (C242A, A287T) характерны для *M. ioensis*, *M. soulardii*, *M. coronaria*, *M. platycarpa* и *M. florentina*, а одна (T286G) – для *M. denticulata*, *M. orientalis*, *M. purpurea* var. *aldenhamensis*, *M. sieversii* и *M. turkmenorum*. Еще одна замена (C461A) была специфична для *M. florentina* (здесь и

далее положение замен дается относительно выравненной последовательности интрона).
Длина домена I у образцов *Prunus* варьировала за счет дубликации (*P. kansuensis* и *P. persica*) и трех копий (*P. mume*) фрагмента TCAAА. У образцов *Prunus* в последовательности домена идентифицированы две однонуклеотидные и трехнуклеотидная делеции, а также 14 SNPs, характерные только для образцов данного рода.

Table 2. Characterization of the chloroplast *rps16* intron in the Rosaceae species studied

Domain	Domain boundaries	<i>Malus</i> species		Other Rosaceae species (outgroup)	
		Length, bp	SNPs/indels	Length, bp	SNPs/indels
I	5'-CTTGGC 3'-CTGGAACAAG	417	4/0	406; 412; 417; 422	26/6
II	5'-TACCR TT 3'-AAAAGGGTT	79; 103	3/1	79; 80; 81; 103	10/4
III	5'-ACTCAATAWA 3'-AACTTGAGT	63	1/0	63; 68	9/1
IV	5'-GAGGRYCAAA 3'-TTTTTC	141–148	2/0	141; 145; 146; 147; 149; 153	36/5
V	5'-GAGCCGTACG 3'-ATACGTTTC	34	0/0	34	0/0
VI	5'-GGGGGGGT 3'-TCTATCCC	24	0/0	24	0/0

У образцов *Cotoneaster lucidus* и *Chaenomeles japonica* в домене I выявлена делеция 11 п. н. (CTTTGATAGAA) и специфичная замена C276T. По одной специфичной замене идентифицировано для *Cydonia oblonga* (G138A), *Crataegus monogyna* (T285G) и *Pyrus elata* (C331T).

Длина домена II у большинства изученных видов Rosaceae составила 79 п. н., за исключением *Sorbus aucuparia* (80 п. н.) и представителей рода *Prunus* (81 п. н.). У видов рода *Malus* секции Chloromeles и *M. florentina* (секция Sorbomalus) в домене II была детектирована инсерция размером 24 п. н. (AGTAAGAATCAAAATAGATTTCGAA), в данной инсерции выявлены замены у *M. ioensis* (A579T) и у *M. florentina* (G589T). Интересно отметить, что эта вставка, отсутствующая у других анализируемых видов *Malus*, была обнаружена и в последовательности домена II у представителя другого рода – айвы обыкновенной *C. oblonga*. Всего у образцов *Malus* в данном домене выявлено три замены, одна из которых (G513A) характерна для видов *M. arnoldiana*, *M. floribunda* и одного образца *M. purpurea* (2392).

В последовательности домена II у видов Rosaceae, взятых в качестве внешней группы, выявлено 10 переменных сайтов, из которых два специфичны для *P. elata* (C535T, A541G), по одному для *C. monogyna* (G537T) и *Prunus yedoensis* (C531T), а одна замена была общей для образцов рода *Crataegus* и *Mespilus germanica* (G600A). У видов *Prunus* в последовательности домена выявлено пять SNPs, характерных только для образцов этого рода.

Домен III у анализируемых образцов *Malus* был инвариабельным по длине (63 п. н.), в его последовательности идентифицирован только один SNP у *M. transitoria* (A629T). Также единичные замены детектированы у *Prunus padus* (C638A), *P. persica* (C679A) и *P. elata* (G662A), а у *C. lucidus* выявлены четыре специфичные замены (T640A, A643G, C655T, T657C). Последовательность домена всех образцов *Prunus* характеризовалась присутствием двух SNPs (T632G, T633A), при этом у *P. kansuensis* и *P. persica* также выявлена дупликация TAAAA.

Различие в длине домена IV у исследуемых образцов *Malus* обусловлено наличием поли(T)- и поли(G)-районов, которые имеют разную длину. В последовательности до-

мена выявлено по одной специфичной замене у *M. florentina* (A767C) и *M. prunifolia* (T828G). У образцов из других родов Rosaceae в домене IV было идентифицировано 36 SNPs, из которых 12 специфичны для видов *Prunus*. Также у образцов *Prunus* детектированы три специфичные индели. У четырех видов *Prunus* (*P. kansuensis*, *P. mume*, *P. padus*, *P. persica*) в последовательности 5'-границы домена присутствуют две транзиции A/G, а еще у трех видов (*P. maximowiczii*, *P. pseudocerasus*, *P. yedoensis*) – дополнительная транзиция T/C (GAGG A/G T/C A/G CAAA). Интересно отметить, что у последних трех видов обнаружен ряд специфичных замен (C729A, A741G, T783C) и 9-нуклеотидная дупликация ATARACATA.

Домены V и VI у всех анализируемых образцов семейства Rosaceae были инвариабельными по длине и нуклеотидному составу. Сравнение изученных последовательностей этих доменов у видов Rosaceae с последовательностями этих доменов, представленными в базе данных NCBI, показало, что домен V полностью идентичен у различных групп растений, в то время как в домене VI могут быть полиморфными только три последних нуклеотида. По-видимому, высокая консервативность доменов V и VI свидетельствует об их исключительной роли в сплайсинге данного интрона, так как именно эти последовательности могут узнаваться факторами сплайсинга и мРНК, как, например, это было показано для ряда интронов II группы в митохондриальном геноме, потерявших способность к автономному сплайсингу (Ostheimer et al., 2003; Brown et al., 2014; Zimmerly, Semper, 2015).

В целом интрон гена *rps16* у 38 представителей 32 видов рода *Malus* оказался низкополиморфным. Всего было выявлено 14 SNPs, из которых 10 локализованы в доменах, а четыре – в междоменных областях. Для сравнения: у семи анализируемых видов *Prunus* было идентифицировано 23 SNPs, а также ряд специфичных инделей. Проведенные ранее исследования выявили значительный уровень вариабельности интрона гена *rps16* у различных родов растений. Например, у 39 образцов 7 видов рода *Allium* в интроне было идентифицировано 57 SNPs и 20 инделей (Рыжова и др., 2009), а у 18 видов рода *Morus* выявлено 113 переменных сайтов (Yuhua et al., 2011).

Более того, различия, детектированные в последовательности интрона гена *rps16* у *Malus* и других взятых в анализ представителей восьми родов Rosaceae, за исключением рода *Prunus*, также были невелики. Возможно, это связано с тем, что род *Prunus* относится к надтрибе Kerriodae, а все другие анализируемые виды – к надтрибе Pygoade семейства Rosaceae (Potter et al., 2007).

Таким образом, впервые был изучен полиморфизм интрона хлоропластного гена *rps16* у видов *Malus* и родственных видов Rosaceae. Показано, что у 32 рассмотренных представителей рода *Malus* данный интрон имеет крайне низкий уровень вариабельности (1.5 %), в то время как у семи представителей рода *Prunus* полиморфизм интрона гена *rps16* был несколько выше (2.25 %). Выявленный сравнительно низкий полиморфизм интрона гена *rps16* не позволяет использовать его для изучения филогении рода *Malus*, однако данная последовательность может быть рекомендована для выяснения филогенетических отношений между родами семейства Rosaceae. В последовательности интрона были определены границы всех шести доменов, характерных для интронов данного типа, и охарактеризована их вариабельность. Идентифицированные SNPs локализовались в доменах I–IV, при этом в домене II у пяти видов *Malus* выявлена 24-нуклеотидная вставка, характерная также для айвы обыкновенной (*Cydonia oblonga*). Домены V и VI были инвариабельными у всех анализируемых образцов *Malus* и родственных видов Rosaceae, что, по-видимому, связано с их исключительной ролью в вырезании интрона.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0104-2014-0210 and the Russian Foundation for Basic Research, project 16-34-60220.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Brown G.G., Francs-Small C.C., Ostersetzer-Biran O. Group II intron splicing factors in plant mitochondria. *Front. Plant Sci.* 2014;5:1-13. DOI 10.3389/fpls.2014.00035.
- Carrillo C., Chapdelaine Y., Bonen L. Variation in sequence and RNA editing within core domains of mitochondrial group II introns among plants. *Mol. Gen. Genet.* 2001;264(5):595-603. DOI 10.1007/s004380000345.
- Dai L., Chai D., Gu S.Q., Gabel J., Noskov S.Y., Blocker F.J., Lambowitz A.M., Zimmerly S. A three-dimensional model of a group II intron RNA and its interaction with the intron-encoded reverse transcriptase. *Mol. Cell.* 2008;30(4):472-485. DOI 10.1016/j.molcel.2008.04.001.
- Jansen R.K., Cai Z., Raubeson L.A., Daniell H., dePamphilis C.W., Leebens-Mack J., Müller K.F., Guisinger-Bellian M., Haberle R.C., Hansen A.K., Chumley T.W., Lee S.B., Peery R., McNeal J.R., Kuehl J.V., Boore J.L. Analysis of 81 genes from 64 plastid genomes resolves relationships in angiosperms and identifies genome-scale evolutionary patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104(49):19369-19374. DOI 10.1073/pnas.0709121104.
- Kelchner S.A. Group II introns as phylogenetic tools: structure, function, and evolutionary constraints. *Am. J. Bot.* 2002;89(10):1651-1669. DOI 10.3732/ajb.89.10.1651.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33:1870-1874. DOI 10.1093/molbev/msw054.
- Lei W., Ni D., Wang Y., Shao J., Wang X., Yang D., Wang J., Chen H., Liu C. Intraspecific and heteroplasmic variations, gene losses and inversions in the chloroplast genome of *Astragalus membranaceus*. *Sci. Rep.* 2016;6:21669. DOI 10.1038/srep21669.
- Lo E.Y.Y., Donoghue M.J. Expanded phylogenetic and dating analyses of the apples and their relatives (Pyraeae, Rosaceae). *Mol. Phylogen. Evol.* 2012;63(2):230-243. DOI 10.1016/j.ympev.2011.10.005.
- Michel F., Umesono K., Ozeki H. Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns – a review. *Gene.* 1989;82(1):5-30.
- Ostheimer G., Williams-Carrier R., Belcher S., Osborne E., Gierke J., Barkan A. Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA binding module. *EMBO J.* 2003;22(15):3919-3929. DOI 10.1093/emboj/cdg372.
- Potter D., Eriksson T., Evans R.C., Oh S., Smedmark J., Morgan D.R., Kerr M., Robertson K.R., Arsenault M., Campbell C.S. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Syst. Evol.* 2007;266:5-43. DOI 10.1007/s00606-007-0539-9.
- Ryzhova N.N., Slugina M.A., Kochieva E.Z., Skryabin K.G. Polymorphism and structural variation of *rps16* group-II intron in the *Solanum* species. *Genetika = Genetics (Moscow).* 2013;49(7):717-721. DOI 10.1134/S1022795413070120.
- Ryzhova N.N., Kholda O.A., Kochieva E.Z. Structural characteristics of the chloroplast *rps16* intron in *Allium sativum* and related *Allium* species. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology (Moscow).* 2009;43(5):766-775. DOI 10.1134/S0026893309050082.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 2005;92(1):142-166. DOI 10.3732/ajb.92.1.142.
- Smedmark J.E.E., Rydin C., Razafimandimbison S.G., Khan S.A., Liede-Schumann S., Bremer B. A phylogeny of Urophylleae (Rubiaceae) based on *rps16* intron data. *Taxon.* 2008;57(1):24-32. DOI 10.5167/uzh-11754.
- Toor N., Hausner G., Zimmerly S. Coevolution of group II intron RNA structures with their intron encoded reverse transcriptases. *RNA.* 2001;7(8):1142-1152. DOI 10.1017/S1355838201010251.
- Vogel J., Hubschmann T., Borner T., Hess W.R. Splicing and intron-internal RNA editing of *trnK-matK* transcripts in barley plastids: support for MatK as an essential splice factor. *J. Mol. Biol.* 1997;270(2):179-187. DOI 10.1006/jmbi.1997.1115.
- Yuhua W., Wei W., Wei T., Weiguo Z. Analysis of chloroplast ribosomal subunit S16 (*rpS16*) intron sequences in *Morus* (Urticales: Moraceae). *Afric. J. Biotechnol.* 2011;10(77):17695-17699. DOI 10.5897/AJB11.2218.
- Zimmerly S., Semper C. Evolution of group II introns. *Mobile DNA.* 2015;6:7. DOI 10.1186/s13100-015-0037-5.