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 (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. Афтанас – 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 (Россия)
В.Н. Даниленко – д-р биол. наук, проф. (Россия)
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)
Е.А. Долгих – д-р 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, проф. (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)

2018 • 22 • 1

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii

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, 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, Dr. Sci. (Biology), Russia
N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
T.A. Gavrilenko, 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, Professor, 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

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

СОДЕРЖАНИЕ • 2018 • 22 • 1

7 ОТ РЕДАКТОРА

Генетика и селекция картофеля

8 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
База знаний SOLANUM TUBEROSUM: раздел по молекулярно-генетической регуляции метаболических путей
Т.В. Иванисенко, О.В. Сайк, П.С. Деменков, В.К. Хлесткин, Е.К. Хлесткина, Н.А. Колчанов, В.А. Иванисенко

18 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Исследование коллекционных образцов картофеля на наличие генетических маркеров устойчивости к фитопатогенам
А.Б. Сайнакова, М.С. Романова, С.Н. Красников, О.В. Литвинчук, Я.И. Алексеев, А.В. Никулин, Е.В. Терентьева

25 ОБЗОР
Регуляция биосинтеза стероидных гликоалкалоидов картофеля
К.А. Иванова, С.В. Герасимова, Е.К. Хлесткина

35 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации
Т.А. Гавриленко, Н.С. Клименко, О.Ю. Антонова, В.А. Лебедева, З.З. Евдокимова, Н.М. Гаджиев, О.В. Апаликова, Н.В. Алпатьева, Л.И. Костина, Н.М. Зотеева, Ф.Т. Мамадбокирова, К.В. Егорова

46 ОБЗОР
Опушение листа у картофеля *Solanum tuberosum*: морфология, функциональная роль и методы исследования
А.В. Дорошков, Д.А. Афонников

Генетические ресурсы растений

54 ОБЗОР
Анапская ампелографическая коллекция – крупнейший центр аккумуляции и изучения генофонда винограда в России
М.И. Панкин, В.С. Петров, А.А. Лукьянова, Е.Т. Ильницкая, Г.Е. Никулушкина, А.Г. Коваленко, В.А. Большаков

60 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Оценка сортов груши, выделенных из генофондовой коллекции Никитского ботанического сада по комплексу хозяйственно ценных признаков, с помощью микросателлитных маркеров
Ю.В. Плугатарь, Р.Д. Бабина, И.И. Супрун, Т.С. Науменко, Я.И. Алексеев

69 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Резистентность к возбудителю пирикуляриоза и морфобиологические особенности генотипов коллекции *Oryza sativa* L. из разных эколого-географических групп в условиях Кубанской зоны рисосеяния
Т.Л. Коротенко, О.А. Брагина, И.И. Супрун, Ж.М. Мухина, Ю.В. Епифанович, А.А. Петрухненко, Т.А. Хорина

79 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Молекулярное маркирование признаков, определяющих качество зерна у российских сортов риса
Ю.К. Гончарова, Е.М. Харитонов, Е.А. Малюченко, Н.Ю. Бушман

88 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Минеральный состав зерна диких сородичей и интрогрессивных форм в селекции пшеницы
Т.В. Савин, А.И. Абугалиева, И. Чакмак, К. Кожахметов

97 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops tauschii* по устойчивости к листовой ржавчине
Э.Р. Давоян, Д.С. Миков, Ю.С. Зубанова, Д.М. Болдаков, Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, В.А. Бибишев

102 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Молекулярно-генетическое исследование одуванчика осеннего (*Taraxacum hybernum* Steven) с использованием SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров
Б.Р. Кулуев, А.В. Фатерыга, А.Р. Кулуев, Е.В. Михайлова, А.В. Чемерис

108 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Внутривидовой полиморфизм гена сахарозосинтазы *Sus1* у образцов *Pisum sativum* L.
Е.А. Дьяченко, М.А. Слугина

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

СОДЕРЖАНИЕ • 2018 • 22 • 1

115 ОБЗОР
Информационные ресурсы по коллекциям картофеля
Д.А. Афонников, И.В. Тоцкий, З. Сташевски

Биоинформатика и системная биология

122 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Предсказание методами системной биологии наиболее перспективных генов-мишеней для селекции на устойчивость к окислительному стрессу C_3 и C_4 культурных злаков
А.В. Дорошков, А.В. Бобровских

132 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
SpikeDroidDB – информационная система для аннотации морфометрических характеристик колоса пшеницы
М.А. Генаев, Е.Г. Комышев, Фу Хао, В.С. Коваль, Н.П. Гончаров, Д.А. Афонников

141 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Об эквивалентности использования запаздывающих аргументов и уравнений переноса при моделировании динамических систем
В.А. Лихошвай, Т.М. Хлебодарова

145 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Экспериментальное изучение влияния редких полиморфизмов ТАТА-боксов промоторов генов *HBB*, *HBD* и *F9* человека на кинетику взаимодействия с ТАТА-связывающим белком
Е.Б. Шарыпова, И.А. Драчкова, Е.В. Кашина, Д.А. Рассказов, П.М. Пономаренко, М.П. Пономаренко, Н.А. Колчанов, Л.К. Савинкова

153 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Анализ взаимодействия генов нейронального апоптоза в ассоциативной генной сети болезни Паркинсона
М.А. Янкина, О.В. Сайк, П.С. Деменков, Э.К. Хуснутдинова, Е.И. Рогаев, И.Н. Лаврик, В.А. Иванисенко

© ИЦиГ СО РАН, 2018
© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2018
© Сибирское отделение Российской академии наук, 2018

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

CONTENTS • 2018 • 22 • 1

7 FROM THE EDITOR

Potato genetics and breeding

8 ORIGINAL ARTICLE
The SOLANUM TUBEROSUM knowledge base: the section on molecular-genetic regulation of metabolic pathways
T.V. Ivanisenko, O.V. Saik, P.S. Demenkov, V.K. Khlestkin, E.K. Khlestkina, N.A. Kolchanov, V.A. Ivanisenko

18 ORIGINAL ARTICLE
Testing potato collection samples for the presence of genes for resistance to phytopathogens by means of DNA markers
A.B. Saynakova, M.S. Romanova, S.N. Krasnikov, O.V. Litvinchuk, Ya.I. Alekseev, A.V. Nikulin, E.V. Terentjeva

25 REVIEW
The biosynthesis regulation of potato steroidal glycoalkaloids
K.A. Ivanova, S.V. Gerasimova, E.K. Khlestkina

35 ORIGINAL ARTICLE
Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation
T.A. Gavrilenko, N.S. Klimenko, O.Yu. Antonova, V.A. Lebedeva, Z.Z. Evdokimova, N.M. Gadjiyev, O.V. Apalikova, N.V. Alpatyeva, L.I. Kostina, N.M. Zoteyeva, F.T. Mamadbokirova, K.V. Egorova

46 REVIEW
Leaf hairiness in potato *Solanum tuberosum*: morphology, function and methods of analysis
A.V. Doroshkov, D.A. Afonnikov

Plant genetics resouces

54 REVIEW
The Anapa ampelographic collection is the largest center of vine gene pool accumulation and research in Russia
M.I. Pankin, V.S. Petrov, A.A. Lukianova, E.T. Ilnitskaya, G.E. Nikulushkina, A.G. Kovalenko, V.A. Bolshakov

60 ORIGINAL ARTICLE
Microsatellites-based evaluation of the pear cultivars selected from Nikitsky botanical gardens germplasm by their economically valuable characteristics
Y.V. Plugatar, R.D. Babina, I.I. Suprun, T.S. Naumenko, Y.I. Alekseev

69 ORIGINAL ARTICLE
Resistance to the blast agent and the morphobiological features of genotypes in the *Oryza sativa* L. collection from various ecological and geographical groups in conditions of Kuban zone of rice growing
T.L. Korotenko, O.A. Bragina, I.I. Suprun, Zh.M. Mukhina, Yu.V. Epifanovich, A.A. Petrukhnenko, T.A. Khorina

79 ORIGINAL ARTICLE
Genetics of the traits defining the quality of Russian rice varieties
J.K. Goncharova, E.M. Haritonov, E.A. Maljuchenko, N.J. Bushman

88 ORIGINAL ARTICLE
Mineral composition of wild relatives and introgressive forms in wheat selection
T.V. Savin, A.I. Abugaliyeva, I. Cakmak, K. Kozhakhmetov

97 ORIGINAL ARTICLE
Study of introgressive lines of common wheat with *Aegilops tauschii* genetic material for resistance to leaf rust
E.R. Davoyan, D.S. Mikov, Y.S. Zubanova, D.M. Boldakov, R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, V.A. Bibishev

102 ORIGINAL ARTICLE
The molecular genetic study of krim-saghyz (*Taraxacum hybernum* Steven) using SSR, RAPD and ISSR markers
B.R. Kuluev, A.V. Fateryga, A.R. Kuluev, E.V. Mikhaylova, A.V. Chemeris

108 ORIGINAL ARTICLE
Intraspecific variability of the *Sus1* sucrose synthase gene in *Pisum sativum* accessions
E.A. Dyachenko, M.A. Slugina

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

CONTENTS • 2018 • 22 • 1

115 REVIEW
Informational resources on potato germplasm collections
D.A. Afonnikov, I.V. Totsky, Z. Stasevski

Bioinformatics and systems biology

122 ORIGINAL ARTICLE
Using the methods of systems biology for predicting perspective target genes to select C_3 and C_4 cereals for oxidative stress resistance
A.V. Doroshkov, A.V. Bobrovskikh

132 ORIGINAL ARTICLE
SpikeDroidDB: an information system for annotation of morphometric characteristics of wheat spike
M.A. Genaev, E.G. Komyshev, Fu Hao, V.S. Koval, N.P. Goncharov, D.A. Afonnikov

141 ORIGINAL ARTICLE
On the equivalence of delayed arguments and transfer equations for modeling dynamic systems
V.A. Likhoshvai, T.M. Khlebodarova

145 ORIGINAL ARTICLE
An experimental study of the effect of rare polymorphisms of human *HBB*, *HBD* and *F9* promoter TATA boxes on the kinetics of interaction with the TATA-binding protein
E.B. Sharypova, I.A. Drachkova, E.V. Kashina, D.A. Rasskazov, P.M. Ponomarenko, M.P. Ponomarenko, N.A. Kolchanov, L.K. Savinkova

153 ORIGINAL ARTICLE
Analysis of the interactions of neuronal apoptosis genes in the associative gene network of Parkinson's disease
M.A. Yankina, O.V. Saik, P.S. Demenkov, E.K. Khusnutdinova, E.I. Rogaev, I.N. Lavrik, V.A. Ivanisenko

© Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 2018
© Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2018
© Siberian Branch RAS, 2018

Уважаемые читатели!

В текущем выпуске журнала особое внимание уделяется результатам исследований, связанных с решением вопросов продовольственной безопасности, а именно изучению генетических ресурсов растений и использованию их в селекционном процессе.

Решение задач продовольственной безопасности требует интенсивного развития и внедрения новых технологий селекции и семеноводства основных культур, в том числе картофеля (*Solanum tuberosum* L.), который выращивается более чем в ста странах и по объемам производства занимает четвертое место в мире. Благодаря успехам в области геномики и молекулярной генетики картофеля происходит стремительное внедрение инновационных генетических технологий в селекционную практику. Разрабатываются новые диагностические ДНК-маркеры для ускоренного отбора растений картофеля, несущих комплексы хозяйственно ценных генов. Осуществляется поиск генов-мишеней для геномного редактирования, которое в перспективе позволит получать улучшенные по устойчивости и продуктивности сорта картофеля, обладающие при этом заданными технологическим характеристиками. Предлагаемые вниманию читателя обзорные и экспериментальные статьи посвящены генетическим исследованиям коллекционных генофондов и селекционного материала картофеля. При этом особое внимание уделяется вопросам устойчивости к факторам биотического и абиотического стресса.

Генетические ресурсы растений играют важную роль как в селекции картофеля, так и при создании сортов других сельскохозяйственных культур. Их эффективное сохранение и применение имеют ключевое значение для обеспечения продовольственной безопасности, для постоянного повышения эффективности создания новых сортов, адаптированных к неблагоприятным условиям окружающей среды в различных климатических зонах. Возможность эффективного включения генетических ресурсов, хранящихся в коллекциях, в селекционный процесс напрямую зависит от глубины их описания по физиологическим, биохимическим и генетическим характеристикам. В серии статей наших авторов представлены результаты оценки биоресурсных коллекций сельскохозяйственных растений: зерновых (рис и пшеница), плодово-ягодных (виноград и груша) и других культур. Углубленное описание коллекций на генетическом и физиологическом уровне позволяет выделять образцы, которые отличаются ценными свойствами или несут селекционно значимые гены, что определяется при помощи диагностических ДНК-маркеров. Такие результаты предназначены для быстрого внедрения в практическую селекцию. Следует отметить, что публикуемые результаты работ нередко выходят из стен селекционных учреждений, поддерживающих и изучающих в целях дальнейшего применения в селекции небольшие по объему биоресурсные коллекции сельскохозяйственных растений, сформированные с учетом климато-географических и экономических особенностей регионов и, соответственно, с потребностью в источниках определенных генов, важных для эффективного производства сельскохозяйственных культур именно в этих зонах.

В заключение сообщаем о проведении 4-й Международной конференции «Генофонд и селекция растений», посвященной интеграции фундаментальных исследований, направленных на углубленное изучение коллекций сельскохозяйственных растений, с одной стороны, и практической селекции, с другой. Конференция будет проходить 4–6 апреля 2018 г. в Новосибирске на базе ИЦиГ СО РАН (http://conf.bionet.nsc.ru/gpb2018/) под эгидой Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Основные направления работы конференции посвящены генофонду и селекции полевых, овощных и плодово-ягодных культур, а также садово-парковых и декоративных растений. Особое внимание планируется уделить молекулярно-генетическим и информационным технологиям в работе с биоресурсными коллекциями и в селекции растений. Приглашаем наших читателей принять участие в работе конференции.

Научные редакторы выпуска:
академик РАН Н.А. Колчанов (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск),
член-корреспондент РАН А.В. Кочетов (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск),
профессор РАН Е.В. Журавлева (ФАНО, Москва),
профессор РАН Е.К. Хлесткина (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск),
д.с.-х.н. И.Е. Лихенко (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск)

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):8-17
DOI 10.18699/VJ18.325

База знаний SOLANUM TUBEROSUM: раздел по молекулярно-генетической регуляции метаболических путей

Т.В. Иванисенко[1], О.В. Сайк[1], П.С. Деменков[1], В.К. Хлесткин[1, 2], Е.К. Хлесткина[1, 2], Н.А. Колчанов[1], В.А. Иванисенко[1]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Быстрое развитие высокопроизводительных геномных, транскриптомных, протеомных и метаболомных технологий обусловило эффект «информационного взрыва» в области биологии растений. На сегодняшний день число научных публикаций только по одной важнейшей сельскохозяйственной культуре *Solanum tuberosum* L. (картофель) превышает 1.5 млн. Эффективный доступ к знаниям, распределенным по такому множеству неформализованных естественно-языковых текстовых источников, требует применения специальных компьютерных интеллектуальных методов анализа текстов (text mining). Однако в литературе нет данных о широком использовании интеллектуальных методов автоматического извлечения знаний из научных публикаций по сельскохозяйственным культурам, таким как картофель. Ранее нами была разработана пилотная версия базы знаний SOLANUM TUBEROSUM, представляющая собой компьютерную платформу для комплексной интеллектуальной обработки больших данных, включая: 1) автоматический анализ текстов научных публикаций и фактографических баз данных, направленный на экстракцию информации по генетике, маркерам, селекции, семеноводству, диагностике возбудителей заболеваний, средствам защиты и технологиям хранения картофеля; 2) формализованное представление извлеченной информации в базе знаний; 3) пользовательский доступ к этим данным; 4) анализ и визуализацию результатов запросов. В онтологии базы знаний SOLANUM TUBEROSUM представлены словари молекулярно-генетических объектов (белков, генов, метаболитов, микроРНК, биомаркеров и др.), сортов картофеля и их фенотипических признаков, болезней и вредителей картофеля, биотических и абиотических факторов окружающей среды, агробиотехнологий возделывания, а также технологий переработки и хранения картофеля. В статье дано описание текущей версии базы знаний SOLANUM TUBEROSUM, полученной в результате расширенного анализа научных публикаций по молекулярно-генетической регуляции метаболических путей у картофеля, а также модельных растительных организмов (кукурузы, риса, арабидопсиса). Всего было проанализировано около 9000 полнотекстовых статей и более 130000 рефератов PubMed. С помощью автоматического анализа текстов научных публикаций выявлено более 59000 фактов о молекулярно-генетических взаимодействиях и генетической регуляции, а анализ фактографических баз данных позволил выявить более 380000 таких взаимодействий у рассмотренных организмов. При этом оказалось, что к *Solanum tuberosum* L. относится около 3 % экстрагированных фактов о молекулярно-генетических взаимодействиях и генетической регуляции. Таким образом, включение сведений о хорошо изученных модельных видах при извлечении информации о молекулярно-генетической регуляции метаболических про-

The SOLANUM TUBEROSUM knowledge base: the section on molecular-genetic regulation of metabolic pathways

T.V. Ivanisenko[1], O.V. Saik[1], P.S. Demenkov[1], V.K. Khlestkin[1, 2], E.K. Khlestkina[1, 2], N.A. Kolchanov[1], V.A. Ivanisenko[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Rapid development of high-performance genomic, transcriptomic, proteomic and metabolic technologies led to an information explosion in the field of plant biology and agrobiology. To date, the number of scientific publications on only one of the most important agricultural crops of *Solanum tuberosum* L. (potato) has exceeded 1.5 million. Effective access to knowledge distributed over such a multitude of non-formalized natural language textual sources requires the use of special computer-assisted intelligent methods of data mining (text-mining). However, in the literature, there is no data on the application of intellectual methods of automatic knowledge extraction from publications on agricultural crops, such as potato. Previously we have developed a pilot version of the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base. SOLANUM TUBEROSUM is a computer platform for complex intellectual processing of large data bodies, including (1) automatic analysis of scientific publications and databases for extraction of information on genetics, markers, breeding, diagnostics, protection and storage technologies for potato, (2) formalized representation of extracted information in the knowledge base, (3) user access to these data, (4) analysis and visualization of query results. The ontology of the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base contains dictionaries of molecular genetic objects (proteins, genes, metabolites, microRNAs, biomarkers); phenotypic characteristics of potato varieties; potato diseases and pests; biotic/abiotic environmental factors; potato agrobiotechnologies. This article describes the current version of the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base developed from an extensive analysis of scientific publications on the molecular-genetic regulation of metabolic pathways in potatoes, as well as model plant organisms (maize, rice, *Arabidopsis thaliana*). In total, about 9,000 full-text articles and more than 130,000 abstracts of PubMed were analyzed. With the help of automatic analysis of scientific publications, more than 59,000 facts on molecular genetic interactions and genetic regulation were identified, and the analysis of

Received 20.11.2017
Accepted for publication 11.01.2017
© AUTHORS, 2018

e-mail: salix@bionet.nsc.ru

цессов является важным и позволит предсказывать гены-ортологи у картофеля и проводить их дальнейшую идентификацию и выделение на основе гомологии. Сконструирована ассоциативная сеть генетической регуляции биосинтеза крахмала у картофеля, включающая 33 метаболита, 36 белков, 6 метаболических путей и 132 взаимодействия между ними, 86 из которых описывают каталитические реакции, а остальные – регуляторные события. Сконструированная сеть является основой для поиска генов-мишеней для направленного мутагенеза и маркер-ориентированной селекции сортов картофеля с заданными свойствами крахмала. Тестовая версия базы знаний SOLANUM TUBEROSUM доступна по адресу http://www-bionet.sysbio.cytogen.ru/and/plant/.

Ключевые слова: картофель; *Solanum tuberosum* L.; база знаний; ANDSystem; биосинтез крахмала; ассоциативные генные сети; генетическая регуляция.

factual databases revealed more than 380,000 such interactions in the examined organisms. It turned out that about 3 % of extracted facts about molecular genetic interactions and genetic regulation were related to *Solanum tuberosum* L. Thus, the inclusion of information on well-studied model species during the extraction of information on the molecular-genetic regulation of metabolic processes is important. It allows prediction of orthologous genes in potato and their further identification and analysis based on homology. An associative network of genetic regulation of starch biosynthesis in potatoes, including 33 metabolites, 36 proteins, 6 metabolic pathways and 132 interactions between them, 86 of which describe catalytic reactions, and the rest – regulatory events, was reconstructed. The reconstructed network is the basis for the search for target genes for directed mutagenesis and marker-oriented selection of potato varieties with specified starch properties. The trial version of the SOLANUM TUBEROSUM knowledge base is available at http://www-bionet.sysbio.cytogen.ru/and/plant/.

Key words: potato; *Solanum tuberosum* L.; knowledge base; ANDSystem; starch biosynthesis; associative gene networks; genetic regulation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Иванисенко Т.В., Сайк О.В., Деменков П.С., Хлесткин В.К., Хлесткина Е.К., Колчанов Н.А., Иванисенко В.А. База знаний SOLANUM TUBEROSUM: раздел по молекулярно-генетической регуляции метаболических путей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):8-17. DOI 10.18699/VJ18.325

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Khlestkin V.K., Khlestkina E.K., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. The SOLANUM TUBEROSUM knowledge base: the section on molecular-genetic regulation of metabolic pathways. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):8-17. DOI 10.18699/VJ18.325 (in Russian)

Картофель (*Solanum tuberosum* L., сем. Пасленовые) представляет собой важнейшую сельскохозяйственную культуру, имеющую высокую пищевую, кормовую и техническую ценность. Пищевая значимость его во многом обусловлена высоким содержанием углеводов (главным образом крахмала), хорошей усвояемостью белков картофеля, значительным содержанием аскорбиновой кислоты, солей калия, кальция, магния, других микроэлементов. Картофельный крахмал служит сырьем для спиртовой и крахмало-паточной промышленности, из него производят декстрины, глюкозу, мальтозу для пищевой индустрии и ряд полупродуктов для химической промышленности (Khlestkin et al., 2018). Кроме того, крахмал клубней картофеля широко используется в бумажной, текстильной промышленности и других отраслях (Kraak, 1992; Ellis et al., 1998; Jobling, 2004).

В настоящее время, в связи со стремительным развитием высокопроизводительных геномных, транскриптомных, протеомных и метаболомных технологий, а также новых технологий в сельском хозяйстве, наблюдается «информационный взрыв» в биологии растений и растениеводстве, в том числе в картофелеводстве. Однако только небольшая часть данных, полученных в результате научных исследований, представлена в формализованном виде в фактографических базах, таких как GeneBank, Uniprot, IntAct, BioGRID и т. д. Основная же часть продуцируемых знаний описана в миллионах научных статей, представляющих собой так называемые неструктуированные текстовые данные на естественном языке. В частности, количество научных публикаций только по *Solanum tuberosum* L. превышает полтора миллиона. Такая разобщенность информации затрудняет установление связей и корреляций между наборами данных, описывающих практически полезные и важные свойства растения, его строение и процессы на молекулярном уровне, например сведения о картофельном крахмале – от генетической регуляции его биосинтеза до применения в различных отраслях промышленности (Хлесткин и др., 2017). Таким образом, снижается эффективность использования полученных данных, растет число упущенных возможностей рационального использования генетического и метаболического потенциала природных ресурсов.

В современном мире проблема обработки больших объемов текстовой информации играет огромную роль в самых разных областях жизни человека. Это способствовало развитию компьютерных интеллектуальных методов автоматического анализа текстов (text mining) (Kilicoglu, 2017). Все методы автоматического анализа текстов можно разделить на две большие группы: методы, основанные на правилах, и методы, использующие машинное обучение. Методы, основанные на правилах, позволяют достичь высокой точности извлечения информации, однако имеют относительно низкие значения полноты извлечения (Aggarwal, Zhai, 2012). Альтернативным подходом к автоматическому извлечению информации, не требующим применения вручную созданных правил, являются методы машинного обучения, которые получили широкое применение в последние годы. Среди таких методов часто используются наивный байесовский классификатор, деревья решений, метод условных случайных полей (conditional random fields – CRF) (Uzuner et al., 2011) и структурированные опорные вектора (structured support vector machines – SSVM) (Tang et al., 2013), а также методы глубокого обучения, основанные на нейронных сетях (Collobert

et al., 2011). К недостаткам этих методов можно отнести требование наличия больших обучающих выборок, содержащих размеченные тексты.

Методы автоматического анализа текстов нашли наиболее широкое применение при решении различных задач биомедицины, системной и интегративной биологии (Rebholz-Schuhmann et al., 2012), включая поддержку клинических решений (Friedman et al., 1999; Cao et al., 2011), курирование биологических/биомедицинских баз данных (Wei et al., 2013), инспекцию фармпрепаратов (Sarker et al., 2015) и др. В качестве источника текстовых данных использовались рефераты, полнотекстовые статьи и патенты (Shetty, Dalal, 2011; Li et al., 2013), а также электронные карточки пациентов (Meystre et al., 2008), текстовые данные в социальных сетях (Sarker et al., 2015) и др.

В области биологии растений интеллектуальные методы автоматического извлечения знаний широко применялись только для анализа статей по модельным организмам. Например, web-доступная система PLAN2L (Krallinger et al., 2009) содержит результаты автоматического извлечения информации из полнотекстовых публикаций по *Arabidopsis thaliana* о белок-белковых взаимодействиях и генетической регуляции, а также ассоциациях генов с некоторыми клеточными процессами и процессами развития (цветка, корня и т. д.).

Ранее нами впервые в мире была разработана компьютерная платформа для комплексного интеллектуального анализа научных публикаций в области картофелеводства – база знаний SOLANUM TUBEROSUM (Сайк и др., 2017). Программные средства этой платформы обеспечивают решение всех необходимых шагов для автоматической экстракции и формализованного представления в базе знаний информации по генетике, ДНК-маркерам, селекции, семеноводству, диагностике возбудителей заболеваний, средствам защиты и технологиям хранения картофеля. Графический пользовательский интерфейс SOLANUM TUBEROSUM позволяет осуществлять доступ к этим данным, проводить анализ и визуализацию результатов запросов.

Для автоматического анализа текстов осуществлена адаптация и интеграция модуля text-mining программно-информационной системы ANDSystem (Demenkov et al., 2012; Ivanisenko et al., 2015; Saik et al., 2016a), предназначенной для экстракции медико-биологических знаний из научных публикаций с помощью синтаксико-семантических правил. ANDSystem использовалась при проведении анализа данных высокопроизводительных протеомных экспериментов в области биомедицины (Momynaliev et al., 2010; Пастушкова и др., 2015а, б; Larina et al., 2015; Pastushkova et al., 2015), а также при анализе тканеспецифического эффекта нокаута генов и поиске потенциальных мишеней для лекарственных препаратов (Petrovskiy et al., 2015). С помощью ANDSystem были выявлены новые регуляторные молекулярно-генетические механизмы коморбидных взаимоотношений между различными патологиями человека (Bragina et al., 2014, 2016; Glotov et al., 2015; Saik et al., 2016b), а также показано, что данная система пригодна для выявления молекулярно-генетических механизмов жизненного цикла патогенов (Popik et al., 2015).

Одной из важнейших задач развития созданной базы знаний SOLANUM TUBEROSUM являются автоматическая экстракция и формализованное представление в базе знаний информации, касающейся молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе хозяйственно ценных признаков, генетической регуляции метаболических путей. Интеграция этих сведений должна способствовать ускорению идентификации генов-кандидатов для селекционно значимых характеристик картофеля и разработки диагностических маркеров для селекции. К числу селекционно значимых характеристик картофеля относятся свойства крахмала, влияющие на пригодность сортов картофеля к переработке. Оценка большинства характеристик крахмала является трудоемкой задачей, поэтому использование на ранних этапах селекционного процесса диагностических ДНК-маркеров, связанных с различными свойствами крахмала, способствовало бы ускорению и удешевлению процесса получения сортов, пригодных к переработке.

Целью настоящей работы было извлечение данных из расширенного анализа научных публикаций по молекулярно-генетической регуляции у картофеля и построение на основе полученных данных ассоциативной семантической сети молекулярно-генетической регуляции метаболизма крахмала. Параллельно с информацией по картофелю извлекалась аналогичная информация по более изученным видам растений (кукуруза, рис, арабидопсис), так как сведения об этих хорошо изученных с молекулярно-генетической точки зрения видах растений будут полезны для дальнейших экспериментальных исследований, направленных на выделение новых генов-кандидатов хозяйственно ценных признаков картофеля. Разрабатываемая база знаний SOLANUM TUBEROSUM может быть полезна широкому кругу специалистов в области биологии растений, в том числе генетикам, селекционерам, фитопатологам, биоинформатикам и др.

Материалы и методы

Подробное описание структуры базы знаний SOLANUM TUBEROSUM (http://www-bionet.sysbio.cytogen.ru/and/plant/) приведено в работе (Сайк и др., 2017). Она включает три основных модуля, представленных на рис. 1.

Модуль автоматического анализа текстов (text mining) научных публикаций и фактографических баз данных предназначен для автоматической экстракции информации о взаимоотношениях между объектами согласно онтологии базы знаний. Этот модуль использует программные средства ANDSystem (Ivanisenko et al., 2015), позволяющие автоматически производить всю необходимую предобработку текстовых данных, включая преобразование исходного текста в понимаемый формат, разделение на предложения, нормализацию, морфологический и синтаксический анализ, разметку поименованных сущностей (имен объектов). Для разметки поименованных сущностей в ANDSystem реализован комплексный алгоритм на основе словарей, также осуществляющий разрешение проблем синонимии, омонимии, анафории и кореферентных ссылок. Необходимость решения перечисленных проблем связана с особенностями естественного языка. Например, авторы часто используют неточное написание

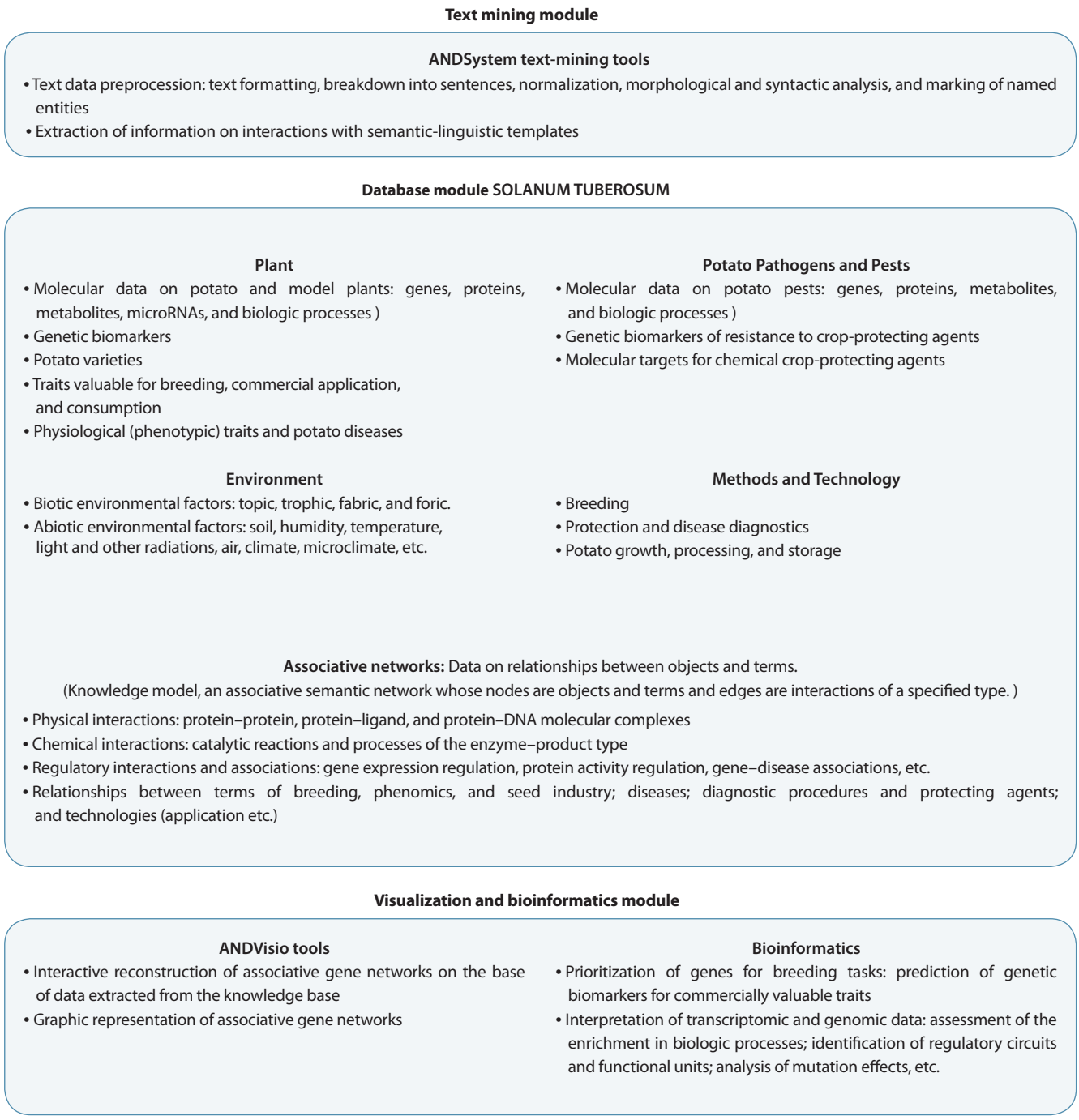
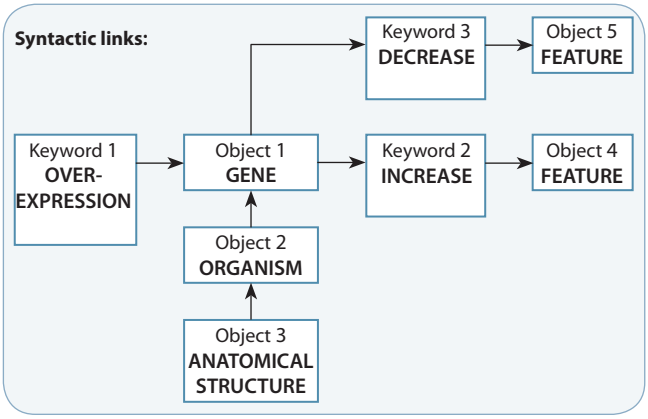


Fig. 1. Modules of the information platform «SOLANUM TUBEROSUM» for integrated intellectual processing of huge bodies of scientific data.

названий генов или других объектов по сравнению с их общепринятыми именами (перестановки, добавления или удаления слов и т. д.). Кроме того, имена разных объектов часто совпадают друг с другом, особенно в случае коротких сокращений. Эти трудности преодолеваются путем расширения числа синонимов и оценки связи имени с контекстом статьи. Стилистические приемы, такие как анафоры, эпифоры, кореферентные ссылки, ведут к неявному упоминанию в предложениях имен объектов, что представляет другую проблему для их распознавания. Решение данной проблемы в ANDSystem осуществляется в пределах только отдельно взятых предложений с помощью специальных лингвистических правил.

Подготовленные таким образом тексты далее используются для извлечения информации о взаимодействиях между объектами с помощью семантико-лингвистических шаблонов. Информация о выявленных взаимодействиях классифицируется по организмам также с применением специальных шаблонов, распознающих имя организма в анализируемом тексте. Следует отметить, что настоящая версия ANDSystem настроена на анализ только текстов на английском языке.



Semantic links:

Object 1 name from the **GENE** glossary
Object 2 name from the **ORGANISM** glossary
Object 3 name from the anatomical structure glossary **ANATOMICAL STRUCTURE**
Object 4 name from the **FEATURE** glossary
Object 5 name from the **FEATURE** glossary
Keyword 1 keywords from the **OVER-EXPRESSION** glossary
Keyword 2 keywords from the **OVER-EXPRESSION** glossary
Keyword 3 keywords from the **DECREASE** glossary

Interactions:
Interaction 1: <**Object 1**>-INCREASE-<**Object 4**>
Interaction type 1: **Up-regulation**
Attribute 1 of interaction 1: <Object 2>
Attribute 2 of interaction 1: <Object 3>
Interaction 2: <**Object 1**>-DECREASE-<**Object 5**>
Interaction type 2: **Down-pregulation**
Attribute 1 of interaction 2: <Object 2>
Attribute 2 of interaction 2: <Object 3>

Fig. 2. An exemplary semantic-linguistic template identifying participants and attributes of an event of starch and glucose regulation in potato tubers in a text.

Sentence:
Here, we show that ***over-expression*** of **SnRK1** in **potato tubers** causes a significant ***increase*** in **starch content** and a ***decrease*** in **glucose levels**

Interaction 1:
Interaction type 1: **Up-regulation**
Participant Object 1: **SnRK1 | sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1**
Object type 1: **GENE**
Participant Object 2: **starch content**
Object type 2: **FEATURE**
Attribute 1 of interaction 1: Organism = **potato | S. tuberosum**
Attribute 2 of interaction 1: Anatomical structure = **tuber**

Interaction 2:
Interaction type 1: **Down-regulation**
Participant Object 1: **SnRK1 | sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1**
Object type 1: **GENE**
Participant Object 2: **glucose level**
Object type 2: **FEATURE**
Attribute 1 of interaction 1: Organism = **potato | S. tuberosum**
Attribute 2 of interaction 1: Anatomical structure = **tuber**

Fig. 3. An exemplary computer output describing the result of applying a semantic-linguistic template for identification of participants and attributes of an event of starch and glucose regulation in potato tubers.

Семантико-лингвистические шаблоны ANDSystem имеют сложную структуру, в которой можно выделить две отдельные части: синтаксические связи в предложении между именами объектов и ключевыми словами, а также семантические связи между объектами (рис. 2). Семантические связи содержат всю необходимую информацию о взаимодействиях, в которых участвуют объекты.

На рис. 3 приведен пример результата автоматического анализа предложения «Here, we show that over-expression of SnRK1 in potato tubers causes a significant increase in starch content and a decrease in glucose levels, resulting from a dramatic increase in the level of expression and activity of two key enzymes involved in the starch biosynthetic pathway: sucrose synthase and ADP-glucose pyrophosphorylase», взятого из работы (McKibbin et al., 2006), с помощью семантико-лингвистического шаблона, предназначенного для экстракции информации о событиях генетической регуляции содержания крахмала и глюкозы в клубнях картофеля (см. рис. 2). Выявленные взаимодействия показали, что ген «sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 (SnRK1)» участвует в двух взаимодействиях: 1) положительная регуляция содержания крахмала «starch content» и 2) отрицательная регуляция содержания глюкозы «glucose level». При этом для каждого из взаимодействий были определены два атрибута, характеризующие организм (Organism = potato | S. tuberosum) и анатомическую структуру (Anatomical structure = tuber).

На следующем шаге анализа информация, экстрагированная с помощью методов автоматического анализа текстов, автоматически помещается в **базу данных**, которая является центральным модулем программно-информационной системы SOLANUM TUBEROSUM. В структуре базы данных можно выделить два больших раздела: 1) словари объектов и понятий (Dictionary); 2) раздел, содержащий информацию о взаимодействиях этих объектов и понятий между собой (Associative networks). Раздел Dictionary, в свою очередь, состоит из четырех больших подразделов: 1) растения (Plant); 2) патогены и заболевания картофеля (Potato Pathogens and Pests); 3) факторы окружающей среды (Environment); 4) методы и технологии (Methods and Technology). Подраздел Plant содержит словари молекулярно-генетических объектов (белки, гены, метаболиты, микроРНК, биологические процессы, биомаркеры и др.), генетических биомаркеров, сортов картофеля, селекционно значимых, хозяйственно ценных и потребительских свойств, а также фенотипических признаков и болезней картофеля. В Potato Pathogens and Pests содержатся словари возбудителей заболеваний и вредителей картофеля, а также молекулярно-генетические данные по этим организмам (гены, белки, метаболиты, биологические процессы). Кроме того, подраздел включает словари по генетическим биомаркерам резистентности у этих организмов к средствам защиты растений, а также

Table 1. Numbers of publications (full-text papers and PubMed abstracts) on various crops used for automated analysis in populating the SOLANUM TUBEROSUM database

Journal*	*Solanum tuberosum*/potato	*Arabidopsis thaliana*/Arabidopsis	*Zea mays*/maize	*Oryza sativa*/rice
Plant Biotechnol. J.	41	174	124	245
Plant J.	110	3387	420	627
Plant Mol. Biol.	171	1300	665	719
Mol. Biol. Rep.	12	102	34	80
BMC Genomics	30	272	154	330
Total number of full-text articles	364	5235	1397	2001
Total number of PubMed abstracts**	7549	44285	38030	44845

* Journals from which full-text papers were analyzed.
** The analysis involved abstracts from all journals annotated by PubMed in which relevant organisms were mentioned.

известные молекулярные мишени для химических средств защиты растений. В Environment представлены словари биотических и абиотических факторов окружающей среды. Подраздел Methods and Technology предназначен для хранения словарей по методам селекции, методам защиты картофеля и диагностики заболеваний, а также технологиям возделывания, переработки и хранения картофеля.

В разделе Associative networks сосредоточены знания, экстрагированные из текстов научных публикаций и фактографических баз данных. В качестве модели знаний используется ассоциативная семантическая сеть, вершинами которой являются объекты и понятия, а ребрами – взаимодействия заданного типа. В онтологии базы знаний представлено более 25 различных типов связей, описывающих молекулярные взаимодействия, а также взаимоотношения между понятиями селекции, феномики и семеноводства, заболеваниями, приемами диагностики и средствами защиты, технологиями. Связи подразделяются на физические межмолекулярные взаимодействия, химические взаимодействия по типу субстрат–фермент–продукт, посттрансляционные модификации белков (фосфорилирование, гликозилирование и т. д.), широкий круг регуляторных взаимодействий, включая регуляцию экспрессии генов транскрипционными факторами, регуляцию активности и стабильности белков и т. д., ассоциативные связи. Взаимоотношения между понятиями селекции, феномики и семеноводства, заболеваниями, диагностиками и средствами защиты, технологиями определяются различного типа регуляторными связями (положительная и отрицательная регуляция), а также такими связями, как применение, назначение и др.

Модуль визуализации и биоинформатики предназначен для работы пользователей с базой знаний. Программа ANDVisio служит интерфейсом для реализации пользовательских запросов к базе данных SOLANUM TUBEROSUM, а также обеспечивает графическую визуализацию ассоциативных генных сетей, построенных на основе результатов этих запросов. ANDVisio была разработана нами ранее как модуль визуализации для системы ANDSystem (Demenkov et al., 2012).

Биоинформатические методы анализа предназначены для решения широкого круга задач по приоритизации генов, предсказанию маркеров, планированию экспериментов и др. на основе информации, представленной в базе данных SOLANUM TUBEROSUM. В частности, проведена интеграция известного пакета программ GUILD (http://sbi.imim.es/web/index.php/research/software/guildsoftware) для решения задач приоритизации на основе анализа структуры графа генных сетей (Guney, Oliva, 2012). Еще один класс биоинформатических методов, реализованный в SOLANUM TUBEROSUM, основан на оценках обогащенности биологических процессов генами, идентифицированными в эксперименте (например, при транскриптомном анализе). Такие методы широко применяются в известных компьютерных системах, предназначенных для интерпретации экспериментальных данных, например DAVID (Huang et al., 2008), PANTHER (Thomas et al., 2006; Mi et al., 2015), GORILLA (Eden et al., 2007, 2009) и др.

Результаты и обсуждение

Статистика базы знаний по теме «генетическая регуляция»

В настоящей версии базы знаний осуществлено обновление информации, относящейся к молекулярно-генетической регуляции метаболических процессов у *S. tuberosum*, а также аналогичной информации у более изученных видов растений (*Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* и *Oryza sativa*) – в качестве источника недостающих у картофеля сведений. Внесение в базу знаний SOLANUM TUBEROSUM (http://www-bionet.sysbio.cytogen.ru/and/plant/) дополнительных данных о молекулярно-генетической регуляции универсальных метаболических путей за счет анализа информации по модельным видам позволит предсказать гены-ортологи у картофеля и проводить их дальнейшую идентификацию и выделение на основе гомологии. Всего при решении этой задачи было проанализировано более 130000 рефератов статей и более 8000 полнотекстовых статей для указанных четырех видов растений (табл. 1). Суммарная статистика базы знаний SOLANUM TUBEROSUM по теме «генетическая регуляция» показана в табл. 2.

Автоматический анализ текстов научных публикаций позволил выявить более 59000 фактов о молекулярно-генетических взаимодействиях и генетической регуляции, при этом около 3 % фактов относилось к *S. tuberosum*. Это подтверждает значимость включения сведений о хорошо изученных

Table 2. Statistics of the SOLANUM TUBEROSUM database for the Genetic Regulation topic

Interaction type	*Solanum tuberosum*/potato	*Arabidopsis thaliana*/Arabidopsis	*Zea mays*/maize	*Oryza sativa*/rice
Association	1405	44542	2577	6917
Catalyze	4450	109336	4266	27952
Regulation	120	3125	221	497
Interaction	15	30257	53	160
Involvement	3276	112999	5124	31316
Number of genes	32995	38125	789	32638
Number of proteins	412	15288	53293	3755

модельных видах при извлечении информации о молекулярно-генетической регуляции метаболических процессов.

Дополнительно к данным, извлеченным из литературы, информация о молекулярно-генетических взаимодействиях была дополнена данными из фактографических баз (всего более 380000 взаимодействий). В частности, из базы данных BioGRID (Stark et al., 2006) была экстрагирована информация о белок-белковых взаимодействиях, из базы AmiGO 2 (Carbon et al., 2009) – информация о вовлеченности генов в биологические процессы Gene Ontology, а из базы KEGG (Kanehisa, Goto, 2000) – участие белков в каталитических реакциях. Интересно, что соотношение количества молекулярно-генетических взаимодействий, представленных в этих базах данных по картофелю и трем модельным организмам, оказалось примерно равным аналогичному соотношению, найденному при анализе данных в научной литературе (около 3 %).

Ассоциативная семантическая сеть молекулярно-генетической регуляции метаболизма крахмала

Гранулы крахмала в клубнях картофеля состоят из двух полисахаридов – амилозы и амилопектина. Оба соединения являются полимерами глюкозы, но различаются, кроме всего прочего, по молекулярному весу и топологии полимерных цепей. Амилоза представляет собой линейную малоразветвленную полимерную цепь остатков α-глюкозы, соединенных между собой (1→4) гликозидными связями, и имеет молекулярную массу 10^5–10^6 а.е.м. Амилопектин состоит из разветвленных цепочек остатков α-глюкозы, соединенных как (1→4), так и (1→6) гликозидными связями, и имеет молекулярную массу 10^7–10^9 а.е.м. Биосинтез крахмала в клубнях картофеля включает на первом этапе превращение сахарозы в глюкозо-6-фосфат в цитоплазме через серию химических реакций, катализируемых ферментами сахарозосинтаза (sucrose synthase, EC 2.4.1.13), УДФ-глюкопирофосфорилаза (UDP-glucose pyrophosphorylase, EC 2.7.7.9) и фосфоглюкомутаза (PGM – phosphoglucomutase, EC 5.4.2.2). Далее глюкозо-6-фосфат/фосфатный транслокационный белок (glucose-6-phosphate/phosphate translocator protein) переносит глюкозо-6-фосфат в амилопласт, где он превращается в глюкозо-1-фосфат при участии пластидной фосфоглюкомутазы (phosphoglucomutase, EC 5.4.2.2). Затем аденозиндифосфат-глюкоза-пирофосфорилаза (ADP-glucose pyrophosphorylase, EC 2.7.7.27) катализирует превращение глюкозо-1-фосфата и АТФ в АДФ-глюкозу и неорганический пирофосфат. АДФ-глюкоза выступает как донор активированной глюкозы для различных крахмалсинтаз (starch synthases, EC 2.4.1.21), которые продуцируют амилозу. Крахмалсинтаза, связанная с крахмальными гранулами (granule-bound starch synthase), ответственна за синтез амилозы, тогда как растворимые крахмалсинтазы I–III отвечают за синтез амилопектина. Ветвление амилопектина осуществляет ветвящий фермент SBE (starch-branching enzyme, EC 2.4.1.18), который отщепляет от неразветвленной цепочки фрагмент и переносит его к шестому атому углерода глюкозы (Zhang et al., 2017). Путь биосинтеза крахмала описан во многих источниках, в то время как регуляция этого процесса до сих пор остается малоизученной (Van Harsselaar et al., 2017).

На рис. 4 представлена ассоциативная сеть, описывающая путь биосинтеза крахмала и генетическую регуляцию этого процесса, построенная с помощью базы знаний SOLANUM TUBEROSUM. Ассоциативная сеть включает 33 метаболита, 36 белков, 6 биологических процессов Gene Ontology и 132 взаимодействия между ними, 86 из которых описывают каталитические реакции, а остальные – регуляторные события. Так, например, на сети показана активация аденозиндифосфат-глюкоза-пирофосфорилазы белком NADP-зависимой тиоредоксинредуктазой C (NTR3), которая приводит к накоплению крахмала (Jenner et al., 2001; Michalska et al., 2009; Geigenberger, 2011). Известно, что экспрессия генов *LOB*, *TIFY5a* и *WRKY4* положительно коррелирует с экспрессией генов *SuSy4* и *GPT2.1* (Van Harsselaar et al., 2017). На рис. 4 показана также положительная регуляция экспрессии генов сахарозосинтазы и аденозиндифосфат-глюкоза-пирофосфорилазы белком SnRK1 (Purcell et al., 1998; Slocombe et al., 2002; McKibbin et al., 2006) и сахарозой (Salanoubat, Belliard, 1989; Müller-Röber et al., 1990).

Еще одним примером регуляторных взаимодействий может служить регуляция экспрессии гена сахарозосинтазы *Sus1* маннитолом, который имитирует эффект осмотического стресса у растений (Déjardin et al., 1999), или активация экспрессии гена *PHS1* абсцизовой кислотой (Quettier et al., 2006). Другим метаболитом, вовлеченным в регуляцию метаболизма крахмала, является ауксин. Ауксин способен регулировать целый ряд биологических процессов, включая фотосинтез (Xing, Xue, 2012), органогенез (Furutani et al., 2007), старение (Zhu, Davies, 1997), развитие пыльцы (Ni et al., 2002), морфогенез корня и формирование проростков (Ljung et al., 2005), а

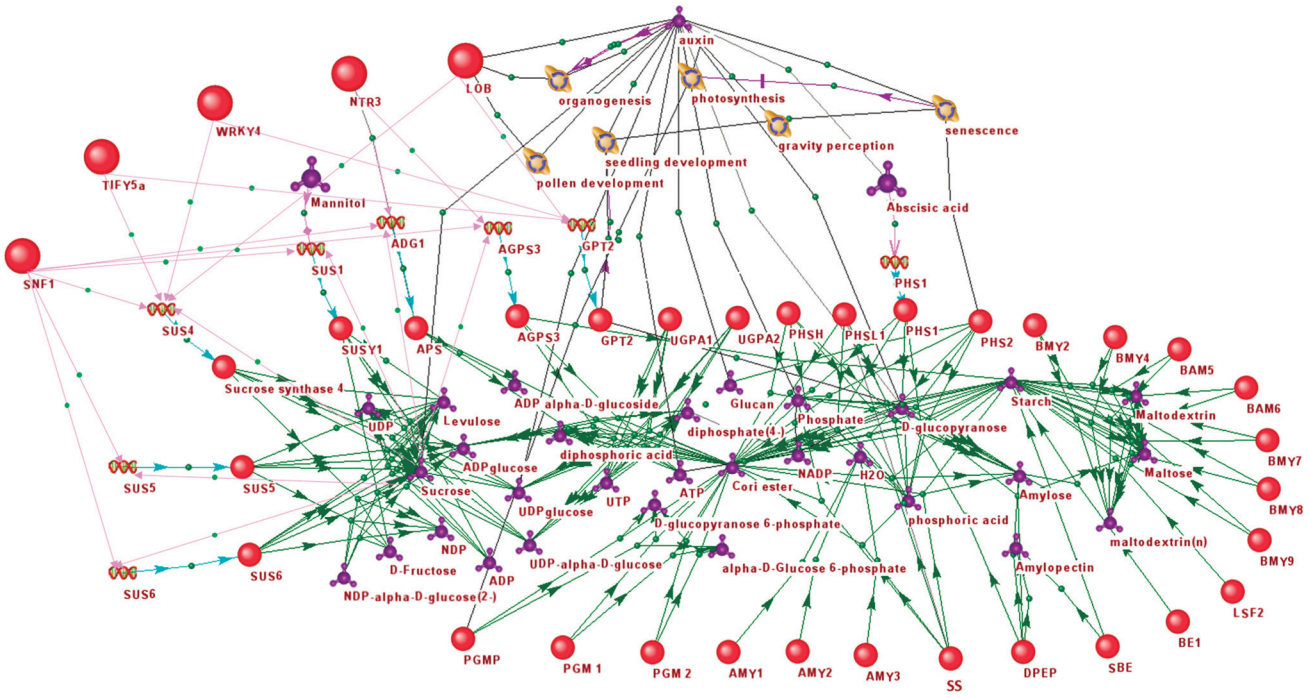


Fig. 4. Associative network of the genetic regulation of starch biosynthesis.

также геотропизм растений (Friml et al., 2002). В работах (Obata-Sasamoto, Suzuki, 1979; Roumeliotis et al., 2012) показано, что уровень ауксина резко возрастает в столоне перед формированием клубней и остается относительно высоким на начальных стадиях роста клубней, а затем снижается, что указывает на стимулирующую роль ауксина в образовании клубней. Исследования (Miyazawa et al., 1999) показывают, что в табаке *Nicotiana tabacum* снижение уровня ауксина приводит к накоплению крахмала. Известно, что экспрессия транскрипционного фактора LOB зависит от паттернов ауксина (Guilfoyle, Hagen, 2007), однако механизм этого взаимодействия остается не до конца изученным (Lee et al., 2015). Показано, что ауксин способен индуцировать биосинтез абсцизовой кислоты (Hansen, Grossmann, 2000). В работе (Mishra et al., 2009) говорится о том, что глюкоза может влиять на гены, вовлеченные в биосинтез ауксина, белки-транспортеры ауксина, рецепторы ауксина и участников сигнального пути ауксина. Обсуждается также способность сахарозы повышать уровень ауксина (Lilley et al., 2012; Boycheva et al., 2015).

Таким образом, регуляция биосинтеза крахмала включает множество взаимодействий, как прямых, так и опосредованных. Визуализация этих взаимодействий в виде ассоциативной сети с использованием базы знаний SOLANUM TUBEROSUM позволяет полнее их учитывать в ходе построения биохимических путей превращений, описания регуляторных функций метаболитов и других исследований, тем самым повышая эффективность использования ранее полученных данных.

Заключение

Текущая версии базы знаний SOLANUM TUBEROSUM включает в себя информацию по молекулярно-генетической регуляции метаболических процессов у картофеля, а также модельных растительных организмов (кукурузы, риса, арабидопсиса), полученную в результате расширенного анализа 9000 полнотекстовых статей и более 130000 рефератов PubMed. С помощью автоматического анализа текстов научных публикаций выявлено более 59000 фактов о молекулярно-генетических взаимодействиях и генетической регуляции, а анализ фактографических баз данных позволил выявить более 380000 таких взаимодействий у рассмотренных организмов. При этом оказалось, что к *Solanum tuberosum* L. относится около 3 % экстрагированных фактов о молекулярно-генетических взаимодействиях и генетической регуляции. Таким образом, включение сведений о хорошо изученных модельных видах при извлечении информации о молекулярно-генетической регуляции метаболических процессов является важным и позволит предсказывать гены-ортологи у картофеля и проводить их дальнейшую идентификацию и выделение на основе гомологии. Сконструированная ассоциативная сеть генетической регуляции биосинтеза крахмала у картофеля служит основой для поиска генов-мишеней для направленного мутагенеза и маркер-ориентированной селекции сортов картофеля с заданными свойствами крахмала.

Acknowledgments

This work was supported by the program of the Federal Agency for Scientific Organizations “Development of potato breeding and seed production”, project 0324-2017-0062.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Aggarwal C.C., Zhai C. (Eds.). Mining Text Data. Springer Science & Business Media, 2012.

Boycheva S., Dominguez A., Rolcik J., Boller T., Fitzpatrick T.B. Consequences of a deficit in vitamin B6 biosynthesis de novo for hormone homeostasis and root development in Arabidopsis. Plant Physiol. 2015;167(1):102-117. DOI 10.1104/pp.114.247767.

Bragina E.Y., Tiys E.S., Freidin M.B., Koneva L.A., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A., Kolchanov N.A., Puzyrev V.P. Insights into pathophysiology of dystropy through the analysis of gene networks: an example of bronchial asthma and tuberculosis. Immunogenetics. 2014;66(7-8):457-465. DOI 10.1007/s00251-014-0786-1.

Bragina E.Y., Tiys E.S., Rudko A.A., Ivanisenko V.A., Freidin M.B. Novel tuberculosis susceptibility candidate genes revealed by the reconstruction and analysis of associative networks. Infect. Genet. Evol. 2016;46:118-123. DOI 10.1016/j.meegid.2016.10.030.

Cao Y., Liu F., Simpson P., Antieaua L., Bennett A., Cimino J.J., Ely J., Yu H. AskHERMES: An online question answering system for complex clinical questions. J. Biomed. Inform. 2011;44:277-288. DOI 10.1016/j.jbi.2011.01.004.

Carbon S., Ireland A., Mungall C.J., Shu S., Marshall B., Lewis S., AmiGO Hub, Web Presence Working Group. AmiGO: online access to ontology and annotation data. Bioinformatics. 2009;25(2):288-289. DOI 10.1093/bioinformatics/btn615.

Collobert R., Weston J., Bottou L., Karlen M., Kavukcuoglu K., Kuksa P. Natural language processing (almost) from scratch. J. Mach. Learn. Res. 2011;12:2493-2537.

Déjardin A., Sokolov L.N., Kleczkowski L.A. Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. Biochem. J. 1999;344(2):503-509. DOI 10.1042/bj3440503.

Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. In Silico Biology. 2012;11(3-4):149-161. DOI 10.3233/ISB-2012-0449.

Eden E., Lipson D., Yogev S., Yakhini Z. Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. PLoS Comput. Biol. 2007;3(3):e39. DOI 10.1371/journal.pcbi.0030039.

Eden E., Navon R., Steinfeld I., Lipson D., Yakhini Z. *GOrilla*: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. BMC Bioinformatics. 2009;10:48. DOI 10.1186/1471-2105-10-48.

Ellis R.P., Cochrane M.P., Dale M.F.B., Duffus C.M., Lynn A., Morrison I.M., Prentice R.D.M., Swanston J.S., Tiller S.A. Starch production and industrial use. J. Sci. Food Agric. 1998;77(3):289-311. DOI 10.1002/(SICI)1097-0010(199807)77:3<289::AID-JSFA38>3.0.CO;2-D.

Friedman C., Hripcsak G., Shagina L., Liu H. Representing information in patient reports using natural language processing and the extensible markup language. J. Am. Med. Inform. Assoc. 1999;6:76-87. DOI 10.1136/jamia.1999.0060076.

Friml J., Wiśniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. Nature. 2002;415:806-809. DOI 10.1038/415806a.

Furutani M., Kajiwara T., Kato T., Treml B.S., Stockum C., Torres-Ruiz R.A., Tasaka M. The gene *MACCHI-BOU 4/ENHANCER OF PINOID* encodes a NPH3-like protein and reveals similarities between organogenesis and phototropism at the molecular level. Development. 2007;134(21):3849-3859. DOI 10.1242/dev.009654.

Geigenberger P. Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. Plant Physiol. 2011;155(4):1566-1577. DOI 10.1104/pp.110.170399.

Glotov A.S., Tiys E.S., Vashukova E.S., Pakin V.S., Demenkov P.S., Saik O.V., Ivanisenko T.V., Arzhanova O.N., Mozgovaya E.V., Zainulina M.S., Kolchanov N.A., Baranov V.S., Ivanisenko V.A. Molecular association of pathogenetic contributors to pre-eclampsia (pre-eclampsia associome). BMC Syst. Biol. 2015;9(Suppl.2):S4. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S4.

Guilfoyle T.J., Hagen G. Auxin response factors. Curr. Opin. Plant Biol. 2007;10(5):453-460. DOI 10.1016/j.pbi.2007.08.014.

Guney E., Oliva B. Exploiting protein-protein interaction networks for genome-wide disease-gene prioritization. PLoS ONE. 2012;7(9): e43557. DOI 10.1371/journal.pone.0043557.

Hansen H., Grossmann K. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. Plant Physiol. 2000;124(3): 1437-1448. DOI 10.1104/pp.124.3.1437.

Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat. Protoc. 2008;4(1):44-57. DOI 10.1038/nprot.2008.211.

Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. BMC Syst. Biol. 2015;9(Suppl.2):S2. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S2.

Jenner H.L., Winning B.M., Millar A.H., Tomlinson K.L., Leaver C.J., Hill S.A. NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. Plant Physiol. 2001;126:1139-1149. DOI 10.1104/pp.126.3.1139.

Jobling S. Improving starch for food and industrial applications. Curr. Opin. Plant Biol. 2004;7(2):210-218. DOI 10.1016/j.pbi.2003.12.001.

Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. 2000;28(1):27-30. DOI 10.1093/nar/28.1.27.

Khlestkin V.K., Peltek S.E., Kolchanov N.A. Target genes for development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars with desired starch properties. Selskokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural Biology. 2017;52(1):25-36. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.25rus. (in Russian)

Khlestkin V.K., Peltek S.E., Kolchanov N.A. Review of direct chemical and biochemical transformations of starch. Carbohydr. Polymers. 2018;181(1):460-476. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.10.035.

Kilicoglu H. Biomedical text mining for research rigor and integrity: tasks, challenges, directions. Brief. Bioinform. 2017. Jan 1. DOI 10.1101/108480.

Kraak A. Industrial applications of potato starch products. Ind. Crops Prod. 1992;1(2-4):107-112. DOI 10.1016/0926-6690(92)90007-I.

Krallinger M., Rodriguez-Penagos C., Tendulkar A., Valencia A. PLAN2L: a web tool for integrated text mining and literature-based bioentity relation extraction. Nucleic Acids Res. 2009; 37(Suppl.2):W160-W165. DOI 10.1093/nar/gkp484.

Larina I.M., Pastushkova L.Kh., Tiys E.S., Kireev K.S., Kononikhin A.S., Starodubtseva N.L., Popov I.A., Custaud M.A., Dobrokhotov I.V., Nikolaev E.N., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Permanent proteins in the urine of healthy humans during the Mars-500 experiment. J. Bioinform. Comput. Biol. 2015;13(1):1540001. DOI 10.1142/S0219720015400016.

Lee H.W., Cho C., Kim J. *Lateral Organ Boundaries Domain16* and *18* act downstream of the AUXIN1 and LIKE-AUXIN3 auxin influx carriers to control lateral root development in Arabidopsis. Plant Physiol. 2015;168(4):1792-1806. DOI 10.1104/pp.15.00578.

Li C., Liakata M., Rebholz-Schuhmann D. Biological network extraction from scientific literature: state of the art and challenges. Brief. Bioinform. 2013;15(5):856-877. DOI 10.1093/bib/bbt006.

Lilley J.L., Gee C.W., Sairanen I., Ljung K., Nemhauser J.L. An endogenous carbon-sensing pathway triggers increased auxin flux and hypocotyl elongation. Plant Physiol. 2012;160(4):2261-2270. DOI 10.1104/pp.112.205575.

Ljung K., Hull A.K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J., Sandberg G. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. Plant Cell. 2005;17(4):1090-1104. DOI 10.1105/tpc.104.029272.

McKibbin R.S., Muttucumaru N., Paul M.J., Powers S.J., Burrell M.M., Coates S., Purcell P.C., Tiessen A., Geigenberger P., Halford N.G. Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. Plant Biotechnol. J. 2006;4(4):409-418. DOI 10.1111/j.1467-7652.2006.00190.x.

Meystre S.M., Savova G.K., Kipper-Schuler K.C., Hurdle J.F. Extracting information from textual documents in the electronic health record: a review of recent research. Yearb Med. Inform. 2008;35:128-144.

Mi H., Poudel S., Muruganujan A., Casagrande J.T., Thomas P.D. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. Nucleic Acids Res. 2015;44(D1):D336-D342. DOI 10.1093/nar/gkv1194.

Michalska J., Zauber H., Buchanan B.B., Cejudo F.J., Geigenberger P. NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009;106:9908-9913. DOI 10.1073/pnas.0903559106.

Mishra B.S., Singh M., Aggrawal P., Laxmi A. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. PLoS ONE. 2009;4(2):e4502. DOI 10.1371/journal.pone.0004502.

Miyazawa Y., Sakai A., Miyagishima S.Y., Takano H., Kawano S., Kuroiwa T. Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells. Plant Physiol. 1999;121(2):461-470. DOI 10.1104/pp.121.2.461.

Momynaliev K.T., Kashin S.V., Chelysheva V.V., Selezneva O.V., Demina I.A., Serebryakova M.V., Alexeev D., Ivanisenko V.A., Aman E., Govorun V.M. Functional divergence of *Helicobacter pylori* related to early gastric cancer. J. Proteome Res. 2010;9(1):254-267. DOI 10.1021/pr900586w.

Müller-Röber B.T., Kossmann J., Hannah L.C., Willmitzer L., Sonnewald U. One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. Mol. Gen. Genet. 1990;224:136-146.

Ni D.A., Yu X.H., Wang L.J., Xu Z.H. Aberrant development of pollen in transgenic tobacco expressing bacterial iaaM gene driven by pollen- and tapetum-specific promoters. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao. 2002;35(1):1-6.

Obata-Sasamoto H., Suzuki H. Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization. Physiol. Plant. 1979;45(3):320-324. DOI 10.1111/j.1399-3054.1979.tb02591.x.

Pastushkova L.Kh., Kononikhin A.S., Tiys E.S., Dobrokhotov I.V., Ivanisenko V.A., Nikolaev E.N., Larina I.M., Popov I.A. Urine proteome study for the evaluation of age dynamics in healthy men. Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology. 20156;28(4):294-700. (in Russian)

Pastushkova L.Kh., Kononikhin A.S., Tiys E.S., Nosovsky A.M., Dobrokhotov I.V., Ivanisenko V.A., Nikolaev E.N., Novoselova N.M., Custaud M.A., Larina I.M. Shifts in urine protein profile during dry immersion. Aviakosm. Ekolog. Med. 2015;49(4):15-19.

Pastushkova L.H., Kononikhin A.S., Tiys E., Obraztsova O.A., Dobrokhotov I.V., Ivanisenko V.A., Nikolaev E.N., Larina I.M. Identification of biological processes on the composition of the urine proteome cosmonauts on the first day after long space flights. Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal. 2015a;101:222-237. (in Russian)

Petrovskiy E.D., Saik O.V., Tiys E.S., Lavrik I.N., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Prediction of tissue-specific effects of gene knockout on apoptosis in different compartments of human brain. BMC Genomics. 2015;16(Suppl.13):S3. DOI 10.1186/1471-2164-16-S13-S3.

Popik O.V., Petrovskiy E.D., Mishchenko E.L., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Mosaic gene network modelling identified new regulatory mechanisms in HCV infection. Virus Res. 2015;218:71-78. DOI 10.1016/j.virusres.2015.10.004.

Purcell P.C., Smith A.M., Halford N.G. Antisense expression of a sucrose nonfermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. Plant J. 1998;14:195-202. DOI 10.1046/j.1365-313X.1998.00108.x.

Quettier A.L., Bertrand C., Habricot Y., Miginiac E., Agnes C., Jeannette E., Maldiney R. The phs1-3 mutation in a putative dual-specificity protein tyrosine phosphatase gene provokes hypersensitive responses to abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 2006;47(5):711-719. DOI 10.1111/j.1365-313X.2006.02823.x.

Rebholz-Schuhmann D., Oellrich A., Hoehndorf R. Text-mining solutions for biomedical research: enabling integrative biology. Nat. Rev. Genet. 2012;13:829-839. DOI 10.1038/nrg3337.

Roumeliotis E., Kloosterman B., Oortwijn M., Kohlen W., Bouwmeester H.J., Visser R.G., Bachem C.W. The effects of auxin and strigolactones on tuber initiation and stolon architecture in potato. J. Exp. Bot. 2012;63(12):4539-4547. DOI 10.1093/jxb/ers132.

Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Development of methods for automatic extraction of knowledge from texts of scientific publications for the creation of the knowledge base SOLANUM TUBEROSUM. Selskokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural Biology. 2017;52(1):63-74. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.63rus. (in Russian)

Saik O.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A. Interactome of the hepatitis C virus: Literature mining with ANDSystem. Virus Res. 2016a;218:40-48. DOI 10.1016/j.virusres.2015.12.003.

Saik O.V., Konovalova N.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Petrovskiy E.D., Ivanisenko N.V., Ivanoshchuk D.E., Ponomareva M.N., Konovalova O.S., Lavrik I.N., Kolchanov N.A. Molecular associations of Primary Open-Angle Glaucoma with potential comorbid diseases (POAG-associome). Biotecnología Aplicada. 2016b;33(3):3201-3206.

Salanoubat M., Belliard G. The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. Gene. 1989;84:181-185. DOI 10.1016/0378-1119(89)90153-4.

Sarker A., Ginn R., Nikfarjam A., O'Connor K., Smith K., Jayaraman S., Upadhaya T., Gonzalez G. Utilizing social media data for pharmacovigilance: A review. J. Biomed. Inform. 2015;54:202-212. DOI 10.1016/j.jbi.2015.02.004.

Shetty K.D., Dalal S.R. Using information mining of the medical literature to improve drug safety. J. Am. Med. Inform. Assoc. 2011;18:668-674. DOI 10.1136/amiajnl-2011-000096.

Slocombe S.P., Laurie S., Bertini L., Beaudoin F., Dickinson J.R., Halford N.G. Molecular cloning of SnIP1, a novel protein that interacts with SNF1-related protein kinase (SnRK1). Plant Mol. Biol. 2002;49:31-44.

Stark C., Breitkreutz B.J., Reguly T., Boucher L., Breitkreutz A., Tyers M. BioGRID: a general repository for interaction datasets. Nucleic Acids Res. 2006;34:D535-D539. DOI 10.1093/nar/gkj109.

Tang B., Wu Y., Jiang M., Denny J.C., Xu H. Recognizing and encoding disorder concepts in clinical text using machine learning and vector space model. Working Notes for CLEF 2013 Conference. 2013;1179.

Thomas P.D., Kejariwal A., Guo N., Mi H., Campbell M.J., Muruganujan A., Lazareva-Ulitsky B. Applications for protein sequence function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. Nucleic Acids Res. 2006;34(Suppl.2):W645-W650. DOI 10.1093/nar/gkl229.

Uzuner O., South B.R., Shen S., DuVall S.L. 2010 i2b2/VA challenge on concepts, assertions, and relations in clinical text. J. Am. Med. Inform. Assoc. 2011;18:552-556. DOI 10.1136/amiajnl-2011-000203.

Van Harsselaar J.K., Lorenz J., Senning M., Sonnewald U., Sonnewald S. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). BMC Genomics. 2017;18(1):37. DOI 10.1186/s12864-016-3381-z.

Wei C.-H., Kao H.-Y., Lu Z. PubTator: a web-based text mining tool for assisting biocuration. Nucleic Acids Res. 2013;41:W518-W522. DOI 10.1093/nar/gkt441.

Xing M., Xue H. A proteomics study of auxin effects in *Arabidopsis thaliana*. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 2012;44(9):783-796. DOI 10.1093/abbs/gms057.

Zhang H., Hou J., Liu J., Zhang J., Song B., Xie C. The roles of starch metabolic pathways in the cold-induced sweetening process in potatoes. Starch-Stärke. 2017;69:1-2. DOI 10.1002/star.201600194.

Zhu Y.X., Davies P.J. The control of apical bud growth and senescence by auxin and gibberellin in genetic lines of peas. Plant Physiol. 1997;113(2):631-637.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):18-24
DOI 10.18699/VJ18.326

Исследование коллекционных образцов картофеля на наличие генетических маркеров устойчивости к фитопатогенам

А.Б. Сайнакова[1] ✉, М.С. Романова[1], С.Н. Красников[1], О.В. Литвинчук[1], Я.И. Алексеев[2, 3], А.В. Никулин[2], Е.В. Терентьева[2, 3]

[1] Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа – филиал Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий Российской академии наук, Томск, Россия
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия
[3] ООО «Синтол», Москва, Россия

Создание устойчивых к фитопатогенам сортов – наиболее надежный и экономичный способ снижения потерь урожайности картофеля. Выведение таких сортов возможно при использовании в селекционной работе генетических источников устойчивости. Применение ДНК-маркеров для идентификации ценных генотипов, в том числе форм с несколькими генами устойчивости, позволяет существенно повысить эффективность селекции. Разработка технологии мультиплексной ПЦР для одновременного тестирования сортов и селекционных линий по нескольким генам, контролирующим устойчивость к вирусам и нематодам, является новым подходом в использовании ДНК-маркеров. Цель работы: скрининг методом мультиплексной ПЦР образцов картофеля коллекции Нарымского отдела селекции и семеноводства СибНИИСХиТ – филиала СФНЦА РАН на наличие генов устойчивости к золотистой и бледной нематодам, раку, а также вирусам X и Y. Проведена оценка 40 образцов на присутствие в геноме генов устойчивости к раку картофеля (*Sen1*), к вирусу X (*Rx*), вирусу Y (*Ryadg*, *Rychc*, *Rysto*), золотистой цистообразующей картофельной нематоде (*H1*, *Gro1-4*), бледной картофельной нематоде (*Gpa2*) с помощью генетических маркеров. В выборку вошли 2 сорта, 3 популяции, полученные от самоопыления сорта Идеал, и 35 индивидуально отобранных гибридов картофеля. В результате исследования маркер NL25 (ген *Sen1*) обнаружен у 19 образцов; маркер PVX (ген *Rx*) – у 13 образцов; маркер RYSC3^{312} (ген *Ryadg*) – у 10 образцов; маркер YES3-3A^{341} (ген *Rysto*) – у 5 образцов; маркеры TG 689^{141}, 57R^{450}, N195^{337}(ген *H1*) – у 12 образцов; маркер Gro1-4-1^{602} (ген *Gro1-4*) – у 6 образцов; маркер Gpa2-2^{452} (ген *Gpa2*) – у 13 образцов. По комплексу хозяйственно полезных признаков выделился образец С-31-15, обладающий высокими показателями урожайности и качества и являющийся носителем генетических маркеров устойчивости к вирусам X (*Rx*), Y (*Rysto*), золотистой цистообразующей картофельной нематоде (*H1*, *Gro1-4*), бледной нематоде (*Gpa2*).

Ключевые слова: картофель; селекция; коллекционные образцы; гены устойчивости; ДНК-маркеры.

Testing potato collection samples for the presence of genes for resistance to phytopathogens by means of DNA markers

A.B. Saynakova[1] ✉, M.S. Romanova[1], S.N. Krasnikov[1], O.V. Litvinchuk[1], Ya.I. Alekseev[2, 3], A.V. Nikulin[2], E.V. Terentjeva[2, 3]

[1] Siberian Institute of Agriculture and Peat Research – the Branch of the Siberian Federal Agricultural Biotechnology Science Center RAS, Tomsk, Russia
[2] All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia
[3] Limited Liability Company Syntol, Moscow, Russia

The development of phytopathogen-resistant varieties is the most reliable and economic way to reduce potato yield losses. Breeding of such varieties is possible by using genetic sources of resistance. The use of DNA markers for identification of valuable genotypes, including forms with several resistance genes, makes it possible to significantly improve breeding efficiency. The development of a multiplex PCR technique and using it to simultaneously test varieties and breeding lines for several genes that control the resistance to viruses and nematodes is a new approach to using DNA markers. This study is aimed at screening samples from the collection of the Narym Department of Breeding and Seed Production of the Siberian Research Institute of Agriculture and Peat (the Branch of the Siberian Federal Agrobiotechnology Research Center, the Russian Academy of Sciences) using the multiplex PCR technique, for genes for resistance to *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallidas*, potato wart disease, viruses X and Y. 40 samples were tested by means of genetic markers to identify genes for resistance to potato wart disease (*Sen1*), virus X (*Rx*), virus Y (*Ryadg*, *Rychc*, *Rysto*), *Globodera rostochiensis* (*H1*, *Gro1-4*) and *Globodera pallida* (*Gpa2*), in the genome. The sample included two varieties, three populations produced by self-pollination of the Ideal variety, and 35 individually selected potato hybrids. As a result, we identified marker NL25 (*Sen1*) in 19 samples; marker PVX (*Rx*) in 13 samples; marker RYSC3^{312} (*Ryadg*) in 10 samples; marker YES3-3A^{341} (*Rysto*) in 5 samples; markers TG 689^{141}, 57R^{450}, N195^{337} (*H1*) in 12 samples; marker Gro1-4-1^{602} (*Gro1-4*) in 6 samples; marker Gpa2-2^{452} (*Gpa2*) in 13 samples. In terms of economically valu-

Received 21.12.2017
Accepted for publication 19.01.2018
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: annasaynakova@vtomske.ru

able traits, sample C-31-15 is noted for high yield and quality indicators. It carries genes for resistance to potato virus X (*Rx*), Y (*Rysto*), *Globodera rostochiensis* (*H1*, *Gro1-4*), and *Globodera pallida* (*Gpa2*).

Key words: potatoes; breeding; collection samples; resistance genes; DNA markers.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Сайнакова А.Б., Романова М.С., Красников С.Н., Литвинчук О.В., Алексеев Я.И., Никулин А.В., Терентьева Е.В. Исследование коллекционных образцов картофеля на наличие генетических маркеров устойчивости к фитопатогенам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):18-24. DOI 10.18699/VJ18.326

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Saynakova A.B., Romanova M.S., Krasnikov S.N., Litvinchuk O.V., Alekseev Ya.I., Nikulin A.V., Terentjeva E.V. Testing potato collection samples for the presence of genes for resistance to phytopathogens by means of DNA markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):18-24. DOI 10.18699/VJ18.326 (in Russian)

Картофель – важнейшая сельскохозяйственная культура, которая характеризуется большой адаптивностью, пластичностью и потенциальной продуктивностью. Возделывается в 130 странах мира, для России является стратегическим продуктом. Это одна из наиболее поражаемых болезнями и вредителями культур. В настоящее время насчитывают около 30 наиболее распространенных болезней картофеля, ежегодные потери урожая от которых составляют 10–60 % (Кузнецова, 2007). Постоянным фактором, снижающим урожай картофеля, является развитие вирусных болезней, приводящих к его вырождению. Создание сортов картофеля, устойчивых к фитопатогенам, наиболее надежный и экономичный способ снижения потерь урожайности.

На территории Российской Федерации к объектам внутреннего и внешнего карантина относятся только два возбудителя заболеваний картофеля – *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. (рак картофеля) и *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens (золотистая цистообразующая картофельная нематода – ЗКН) (Национальный доклад, 2017). Вызываемые ими болезни распространены в большинстве стран мира (EPPO, 2003, 2014; CABI/EPPO, 2011, 2015). В настоящее время выявлено 43 патотипа возбудителя рака картофеля и 5 патотипов ЗКН. На территории РФ обнаружен только первый (D1) патотип возбудителя рака и Ro1 патотип ЗКН (Мироненко и др., 2009; Limantseva et al., 2014). Бледная картофельная нематода *G. pallida* (Stone) Behrens на территории РФ не выявлена (Limantseva et al., 2014), хотя в странах Европейского союза встречается повсеместно. Химических средств борьбы против этих возбудителей нет, поэтому основным способом защиты является возделывание устойчивых сортов картофеля. Обязательное требование для включения в реестр селекционных достижений новых сортов картофеля – устойчивость к возбудителю рака.

Традиционная схема селекции картофеля основана на фенотипической оценке и отборе образцов, соответствующих модели сорта. Продолжительность селекции от гибридизации до передачи перспективных номеров на государственное сортоиспытание составляет более десяти лет. Использование в исследованиях достижений молекулярной генетики позволяет современным ученым создавать новые технологии селекции (Симаков и др., 2006; Milbourne et al., 2007; Carputo, Frusciante, 2011; Slater et al., 2014; Mori et al., 2015).

Многие селекционно ценные признаки картофеля, в том числе устойчивость к вирусам X, Y, S, вирусу скручивания листьев картофеля (ВСЛК), цистообразующим нематодам, раку, имеют моногенно-доминантную природу (Росс, 1989).

Применение маркеров для идентификации ценных генотипов, в том числе форм с несколькими генами устойчивости, позволяет существенно повысить эффективность отбора на ранних этапах селекции (Gebhardt et al., 2006; Simko et al., 2007; Gebhardt, 2013; Slater et al., 2013). Новым подходом в использовании ДНК-маркеров является разработка технологии мультиплексной ПЦР для одновременного тестирования сортов и селекционных линий по нескольким генам, контролирующим устойчивость к вирусам и нематодам (Mori et al., 2011; Asano et al., 2012; Slater et al., 2013; Бирюкова и др., 2016, 2017). Это во много раз увеличивает результативность маркер-контролируемого отбора (marker-assisted selection – MAS) и повышает надежность тестирования, так как обычно в число амплифицируемых фрагментов входит контрольный ПЦР-продукт, присутствующий у всех образцов, что минимизирует ложноотрицательные результаты (Хютти и др., 2017).

Наиболее известны в этом направлении работы японских ученых. Это система для выявления маркеров ряда *R*-генов, определяющих устойчивость к основным патогенам картофеля: вирусам X (маркер PVX) и Y (маркер Ry186), к *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens (маркер N146) и расе 1 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (маркер R1) (Mori et al., 2011). Другая система (маркеры N146, N195, Gpa2-2 и Gro1-4-1) позволяет одновременно проводить скрининг на присутствие всех основных генов устойчивости к цистообразующим нематодам (Asano et al., 2012).

Для развития селекции картофеля большое значение имеет скрининг сортов и исходных родительских форм на наличие генов устойчивости к болезням и вредителям (Бирюкова и др., 2015; Антонова и др., 2016; Ермишин и др., 2016). Молекулярно-генетическая характеристика гибридов картофеля, используемых селекционерами в качестве доноров устойчивости к наиболее вредоносным патогенам, делает более обоснованным подбор родительских пар для скрещивания. Вовлечение в гибридизацию генетически разнообразных источников позволяет сочетать в гибридном потомстве высокую и стабильную устойчивость к основным фитопатогенам с комплексом хозяйственно ценных признаков.

Цель работы – скрининг методом мультиплексной ПЦР образцов коллекции Нарымского отдела селекции и семе-

новодства Сибирского НИИ сельского хозяйства и торфа (СибНИИСХиТ) – филиала СФНЦА РАН на наличие генов устойчивости к золотистой и бледной нематодам, раку, X- и Y-вирусам картофеля.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 40 образцов картофеля из коллекционного питомника Нарымского отдела селекции и семеноводства СибНИИСХиТ – филиала СФНЦА РАН. В выборку вошли 2 сорта, 3 популяции, полученные от самоопыления сорта Идеал, и 35 индивидуально отобранных гибридов картофеля.

В гибридных комбинациях использовались сорта Alvara, Bora valley, Gala, Kolette, Labadia, Sante, Виктория, Идеал, Кандидат, Колобок, Луговской, Русский сувенир, Сказка, Удача, а также ранее созданные гибриды 99-6-10, 128-6, 94.10-20, 1м, 2м, 6м, 1с, 2с. Происхождение исследованных образцов приведено в табл. 1.

Мультиплексная ПЦР проведена для определения ДНК-маркеров восьми генов (табл. 2), контролирующих устойчивость картофеля к наиболее опасным патогенам: нематодам – золотистой цистообразующей (*G. rostochiensis*) патотипа Ro1, Ro4 (гены *H1*, *Gro1-4*) и бледной (*G. pallida*) патотипа Pa2 (ген *Gpa2-2*); к вирусам картофеля Y (гены *Rysto*, *Ryadg* и *Rychc*) и X (ген *Rx1*) и к возбудителю рака картофеля (*S. endobioticum*) патотипа 1 (ген *Sen1*).

Для выделения ДНК из образцов гомогенизировали 200 мг ткани клубня картофеля в гомогенизаторе Precellys 24. Дальнейшее выделение проводили с использованием набора «ГМО-МагноСорб» (ООО «Синтол») по стандартному протоколу с помощью роботизированной станции Савраска-02 (ООО «Синтол», Россия).

Амплификацию продуктов восьми реакций: RYSC3 (Kasai et al., 2000), Ry186 (Mori et al., 2011), YES3-3A (Song et al., 2005), TG 689 (Brodie et al., 1999; Бирюкова и др., 2008), 57R (Schultz et al., 2012), N195 (Asano et al., 2012), Gro1-4-1 (Asano et al., 2012), Gpa2-2 (Asano et al., 2012) выполняли в мультиплексе с использованием 2.5× реакционной смеси для ПЦР М428 (ООО «Синтол») (рис. 1) по следующему протоколу амплификации:

1) 94 °C, 10 мин;
2) 5 циклов – 94 °C, 30 с; 68 °C, 30 с; 72 °C, 1 мин;
3) 35 циклов – 94 °C, 30 с; 58 °C, 30 с;72 °C, 1 мин;
4) 94 °C, 30 с; 72 °C, 5 мин.

Амплификацию двух более длинных фрагментов – NL25 (Hehl et al., 1999) и PVX (Mori et al., 2011) также проводили совместно (рис. 2):

1) 94 °C, 10 мин;
2) 5 циклов – 94 °C, 30 с; 68 °C, 30 с; 72 °C, 1.5 мин;
3) 35 циклов – 94 °C, 30 с; 58 °C, 30 с; 72 °C, 1.5 мин;
4) 94 °C, 30 с; 72 °C, 5 мин.

Продукты амплификации идентифицировали с помощью капиллярного генетического анализатора «Нанофор 05» (Институт аналитического приборостроения РАН). Для этого прямые праймеры были помечены флуоресцентными красителями 6FAM или 5R6G (ООО «Син-

Table 1. Origin of accessions used for genetic analysis to identify genes for resistance to plant pathogens

Accession	Cross	Accession	Cross
Nevskiy	Veselovskiy × Kandidat	C-26-15	1m × 94.10-20
Flamingo	99-6-10 × Bora valley	C-27-15	1m × 94.10-20
C-112-03	Sante × Ideal	C-30-15	1m × 94.10-20
C-3-13	F_1 Ideal	C-31-15	1m × 94.10-20
C-38-14	Udacha × 128-6	C-41-15	6m × 94.10-20
C-42-14	Skazka × 128-6	C-47-15	Udacha × Bora valley
C-46-14	Skazka × 128-6	C-43-15	6m × 94.10-20
C-47-14	Skazka × 128-6	C-48-15	Udacha × Bora valley
C-49-14	Skazka × 128-6	C-56-15	3-86-9 × Viktoriya
C-87-14	Kolobok × Bora valley	C-57-15	3-86-9 × Viktoriya
C-121-14	Kolobok × Bora valley	C-67-15	F_1 Ideal
C-130-14	Lugovskoy × Russkiy suvenir	C-39-16	Gala × 128-6
C-132-14	Alvara × Russkiy suvenir	C-41-16	Kolette × Gala
C-183-14	F_1 Ideal	C-42-16	Kolette × Gala
C-2-15	1s × 128-6	C-43-16	Kolette × Gala
C-3-15	1s × 128-6	C-44-16	BP 808 × 88.16/20
C-6-15	Bora valley × 128-6	C-45-16	BP 808 × 88.16/20
C-7-15	1s × 128-6	C-50-16	BP 808 × 88.34/14
C-8-15	2s × 128-6	C-51-16	BP 808 × 88.34/14
C-21-15	2m × 94.10-20	C-55-16	Labadia × Gala

Table 2. *R* genes and DNA markers used for molecular screening

Gene	Chromosome	Trait	DNA marker (size)	Reference
Ryadg	XI	Resistance to PVY	RYSC3 (321 bp)	Kasai et al., 2000
Rysto	XII	»	YES3-3A (341 bp)	Song et al., 2005
Rychc	VII	»	Ry186 (587 bp)	Mori et al., 2011
H1	V	Resistance to *G. rostochiensis* Ro1, Ro4	TG 689 (141 bp)	Brodie et al., 1999; Бирюкова и др., 2008
			57R (450 bp)	Schultz et al., 2012
			N195 (337 bp)	Asano et al., 2012
Gro1-4	VII	Resistance to *G. rostochiensis* Ro1, Ro4	Gro1-4-1 (602 bp)	»
Gpa2	XII	Resistance to *G. pallida* Pa2	Gpa2-2 (452 bp)	»
Rx	XII	Resistance to PVX	PVX (1230 bp)	Mori et al., 2011
Sen1	XI	Resistance to potato canker	NL25 (1400 bp)	Hehl et al., 1999

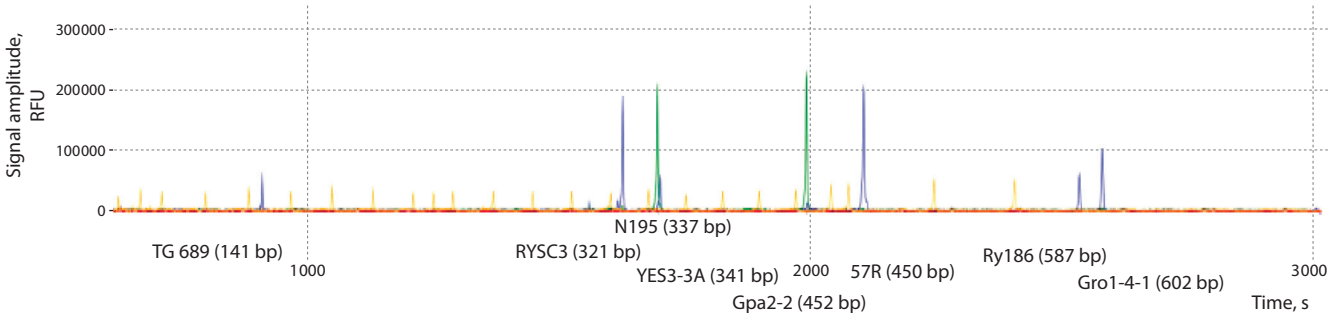


Fig. 1. Chromatographic resolution of eight reactions: RYSC3, Ry186, YES3-3A, TG 689, 57R, N195, Gro1-4-1, and Gpa2-2.

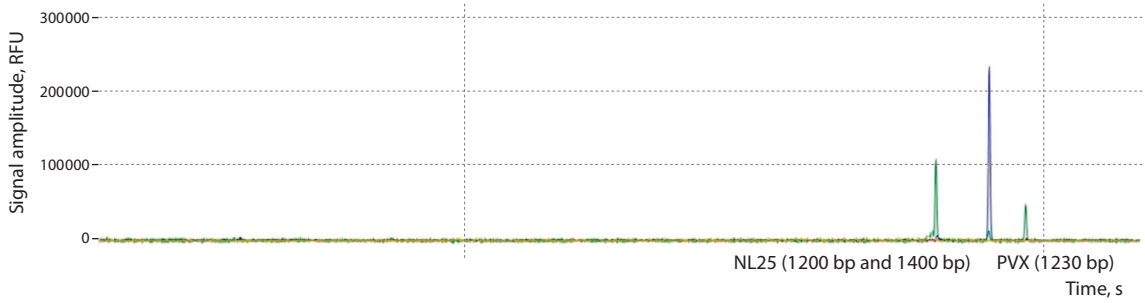


Fig. 2. Chromatographic resolution of two reactions: NL25 and PVX.

тол»). Капиллярный электрофорез имеет высокую разрешающую способность, что позволяет идентифицировать близкие по длине фрагменты, в том числе за счет использования различающихся по спектру флуорофоров. Полученные данные анализировали с использованием программы «ДНК Фрагментный анализ» (ИАП РАН).

Результаты и обсуждение

Скрининг 40 образцов картофеля, проведенный методом мультиплексной ПЦР, выявил в исследованном наборе сортов и гибридов генотипы с маркерами генов *H1* и *Gpa2*, контролирующих устойчивость к золотистой цистообразующей и бледной нематодам, гена *Sen1*, обеспечивающего устойчивость к раку картофеля, и генов *Rx* и *Ryadg*, *Rysto*, обеспечивающих иммунитет картофеля к X- и Y-вирусам соответственно. Маркер Ry186 гена *Rychc* (устойчивость к Y-вирусу картофеля) у генотипов выборки не обнаружен.

Выделены образцы с маркерами генов устойчивости к раку картофеля (*Sen1*), вирусу X (*Rx*), вирусу Y (*Ryadg*, *Rysto*), золотистой цистообразующей картофельной нематоде (*H1*, *Gro1-4*), бледной нематоде (*Gpa2*) (табл. 3).

Выбор маркеров для выявления генов устойчивости основан на результатах отечественных и зарубежных исследователей по оценке корреляционных связей между

Table 3. Results of studies of potato accessions with DNA markers for genes for resistance to potato canker, X and Y viruses, Globodera rostochiensis, and Globodera pallida

Accession	NL25	PVX	RYSC3^{312}	Ry186^{587}	YES3-3A^{341}	TG 689^{141}	57R^{450}	N195^{337}	Gro1-4-1^{602}	Gpa2-2^{452}
	Resistance gene									
	Sen1	*Rx*	*Ryadg*	*Rychc*	*Rysto*	*H1*			*Gro1-4*	*Gpa2*
	Potato canker	PVX	PVY			Globodera rostochiensis				Globodera pallida
C-42-14	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
C-47-14	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0
C-49-14	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0
C-130-14	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
C-121-14	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0
C-183-14	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-7-15	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+
C-31-15	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+
C-47-15	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+
C-43-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-48-15	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+
C-87-14	+	+	0	0	+	0	0	0	+	+
C-38-14	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
C-2-15	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
C-3-15	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+
C-26-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-27-15	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+
C-30-15	+	+	0	0	+	0	0	0	+	+
C-41-15	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+
C-56-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-57-15	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-46-14	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
C-39-16	0	0	+	0	0	+	+	+	0	0
C-41-16	+	0	0	0	0	+	+	+	0	0
C-42-16	+	0	0	0	0	+	+	+	0	0
C-43-16	+	0	0	0	0	+	+	+	0	0
C-50-16	+	0	0	0	0	+	+	+	0	0
C-51-16	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0
C-55-16	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+
C-132-14	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
C-6-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-8-15	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+
C-21-15	+	+	0	0	+	0	0	0	+	+
C-67-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-44-16	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-45-16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-3-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-112-03	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+
Nevksiy	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flamingo	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0

маркерами генов и устойчивостью образцов картофеля к фитопатогенам.

Считается, что доминантный аллель гена *Sen1* полностью блокирует развитие и репродукционные способности *S. endobioticum* (патотип 1) (Lellbach, Effmert, 1990). На сегодняшний день в практически ориентированных исследованиях наиболее используемым остается маркер устойчивости к возбудителю рака картофеля NL25^{1400}. Молекулярный скрининг выявляет этот маркер почти у всех изученных ракоустойчивых отечественных сортов (Лукша и др., 2012; Бирюкова и др., 2015; Антонова и др., 2016). В наших исследованиях наличие этого маркера определено у 19 образцов.

Предложенные в работе (Mori et al., 2011) маркеры PVX и Ry186 используются для выявления *R*-генов, определяющих устойчивость к вирусам X и Y картофеля соответственно. Маркер PVX гена устойчивости к вирусу X (*Rx*) диагностирован у 13 из исследованных образцов. Маркер Ry186 гена *Rychc* среди образцов исследованной выборки не обнаружен. Маркер RYSC3^{312} гена *Ryadg* обнаружен у 10 образцов, маркер YES3-3A^{341} гена *Rysto* – у 5 образцов. Маркеры сразу двух генов устойчивости к вирусу Y (*Ryadg*, *Rysto*) имеются только у образца С-121-14.

Считается, что из идентифицированных в настоящее время генов, контролирующих устойчивость к золотистой и бледной нематодам, наиболее эффективную защиту обеспечивают гены *H1*, *GroVI*, *Gro1* и *Gpa2* (Хютти и др., 2017). Согласно литературным данным, доминантный аллель гена *H1* интрогрессирован в селекционные сорта от единичных нематодоустойчивых образцов *S. tuberosum* ssp. *andigenum* и *S. vernei* (Toxopeus, Huijsman, 1953), а ген *Gro1-4* – от образцов *S. spegazzinii* (Barone et al., 1990).

На устойчивость к *G. rostochiensis* в отечественных и зарубежных исследованиях чаще всего используется SCAR-маркер TG 689 гена *H1* (Бирюкова и др., 2008, 2015; Galek et al., 2011; Milczarek et al., 2011, 2014; Shultz et al., 2012; Антонова и др., 2016). Маркер N195, сцепленный с локусом *H1*, предложен группой японских ученых (Asano et al., 2012). В молекулярном скрининге генотипов картофеля на наличие гена устойчивости к золотистой цистообразующей картофельной нематоде в настоящее время также активно используется маркер 57R, сцепленный с локусом гена *H1*, – как в России (Бирюкова и др., 2015; Антонова и др., 2016), так и за рубежом (Shultz et al., 2012, Milczarek et al., 2014). Ген *Gro1-4* тоже имеет большое практическое значение для селекции на устойчивость к глободерозу. Для его идентификации был разработан одноименный внутригенный SCAR-маркер Gro1-4 (Gebhardt et al., 2006).

В исследованной выборке носителями гена устойчивости к золотистой цистообразующей картофельной нематоде *Gro1-4* являются 6 образцов, гена *H1* – 12 образцов, и только у двух образцов (С-31-15 и С-27-15) выявлены оба гена.

Ген *Gpa2* обеспечивает устойчивость селекционных сортов к бледной картофельной нематоде (патотипы Pa2 и Pa3) (Van der Voort et al., 1997; Van der Vossen et al., 2000). Он локализован в составе общего кластера вместе с генами устойчивости к другим патогенам, в частности геном *Rx*, детерминирующим устойчивость к вирусу X картофеля. Маркеры Gpa2-2^{452} (гена *Gpa2*) и PVX (гена *Rx*) обнаружены у 13 образцов. Образец С-87-14 обладает генами устойчивости к раку картофеля, бледной нематоде, золотистой нематоде (ген *Gro1-4*), вирусам X и Y (*Rysto*).

Из 40 исследованных генотипов картофеля максимальное число маркеров пяти генов устойчивости (к вирусам X (*Rx*), Y (*Rysto*), золотистой цистообразующей картофельной нематоде (*H1*, *Gro1-4*), бледной нематоде (*Gpa2*)) обнаружено у образца С-31-15, обладающего по результатам полевых испытаний также высокими показателями урожайности и качества. Выделенный по результатам исследований гибридный образец С-31-15 является источником комплекса хозяйственно ценных признаков, в том числе устойчивости к нескольким вредоносным фитопатогенам картофеля.

Acknowledgments

This work was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations, Program for support of bioresource collections, project 0778-2017-0099. Experiments were conducted with the use of the equipment of the Biotechnology Shared Access Center, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology. DNA isolation was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project 14.579.21.0012 of June 5, 2014, ID RFMEFI57914X0012.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Novikova L.Yu., Shuvalov O.Yu., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and near-abroad countries based on polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance *R*-genes.Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ16.181 (in Russian)

Asano K., Kobayashi A., Tsuda S., Nishinaka M., Tamiya S. DNA marker assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. Breed. Sci. 2012;62:142-150. DOI 10.1270/jsbbs.62.142.

Barone A., Ritter E., Schachtschabel U., Debener T., Salamini F., Gebhardt C. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Mol. Gen. Genet. 1990;224(2):177-182. DOI 10.1007/BF00271550.

Biryukova V.A., Shmyiglya I.V., Abrosimova S.B., Manankov V.V., Mityushkin A.V., Rogozina E.V., Kiru S.D., Chalaya N.A., Meleshin A.A., Zharova V.A. The use of molecular markers in breeding for potato cyst nematode resistance. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2017;178(1):92-103. (in Russian)

Biryukova V.A., Shmyiglya I.V., Abrosimova S.B., Zapekina T.I., Meleshin A.A., Mityushkin A.V., Manankov V.V. Molecular marker-based search for sources of genes for resistance to pathogens among accessions of breeding–genetic collections of the All-Russia Research Institute of Potato Farming. Zashhita kartofelya = Potato Protection.2015;1:3-7. (in Russian)

Biryukova V.A., Shmyiglya I.V., Meleshin A.A., Mityushkin A.V., Manankov V.V., Abrosimova S.B. Study of genetic collections of the All-Russia Research Institute of Potato Farming with the help of molecular markers. Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC. 2016;30(10):22-26. (in Russian)

Biryukova V.A., Zhuravlev A.A., Abrosimova S.B., Kostina L.I., Khromova L.M., Shmyiglya I.V., Morozova N.N., Kirsanova S.N. Use of molecular markers of *H1* and *Gro1* genes for resistance to golden

potato nematode. Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences.2008;6:3-6. (in Russian)

Brodie M., Overstall P., Giorgi L. Multicentre, double-blind, randomised comparison between lamotrigine and carbamazepine in elderly patients with newly diagnosed epilepsy. Epilepsy Research. 1999;37(1):81-87.

CABI/EPPO. Globodera rostochiensis. Distribution maps of plant diseases. 2011. Available at http://www.cabi.org

CABI/EPPO. Synchytrium endobioticum. Distribution maps of plant diseases. 2015. Available at http://www.cabi.org

Carputo D., Frusciante L. Classical genetics and traditional breeding. In: Bradeen J.M., Haynes K.G. (Eds.) Genetics, Genomics and Breeding of Potatoes. Enfield, NH: Science Publ., 2011:20-40.

EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. 2003. Available at https://www.eppo.int/

EPPO. Pest quarantine database. Paris, France, 2014. Available at http://www.eppo.int/

Ermishin A.P., Svitoch O.V., Voronkova E.V., Luksha V.A., Gukasyan O.N., Polyukhovich Yu.V., Zharich V.M. Otsenka iskhodnogo materiala kartofelya po sostavu i allel'nomu sostoyaniyu genov ustoychivosti k boleznyam i vreditelyam s tsel'yu optimizatsii podbora roditel'skikh form dlya gibridizatsii: metodicheskie rekomendatsii [Assessment of the initial potato material by the composition and allelic state of genes for resistance to diseases and pests in order to optimize the selection of parental forms for crossing: methodical. recommendations]. Minsk: Pravo i ekonomika Publ., 2016. (in Russian)

Galek R., Rurek M., De Jong W.S., Pietkiewicz G., Augustyniak H., Sawicka-Sienkiewicz E. Application of DNA markers linked to the potato *H1* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of *Globodera rostochiensis*. J. Appl. Genetics. 2011;52(4):407-411. DOI 10.1007/s13353-011-0056-y.

Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. Trends Genet. 2013;29(4):248-256. DOI 10.1016/j.tig.2012.11.006.

Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. Theor. Appl. Genet. 2006;112(8):1458-1464. DOI 10.1007/s00122-006-0248-8.

Hehl R., Faurie E., Hesselbach J., Salamini F., Whitham S., Baker B., Gebhardt C. TMV resistance gene *N* homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. Theor. Appl. Genet. 1999;98:379-386.

Kasai K., Morikawa Y., Sorri V.A., Valkonen J.P.T., Gebhardt C., Watanabe K.N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ryadg based on a common feature of plant disease resistance genes. Genome. 2000;43:1-8.

Khiutti A.V., Antonova O.Yu., Mironenko N.V., Gavrilenko T.A., Afanasenko O.S. Potato resistance to quarantine diseases. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):51-61. DOI 10.18699/VJ17.223. (in Russian)

Kuznetsova M.A. Potato protection. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2007;5:62(2). (in Russian)

Lellbach H., Effmert M. Ergebnisse einer Diallelanalyse zur Vererung der Resistenz gegen *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc., pathotyp 1 (D1) bei Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.). Potato Res. 1990;33(2):251-256.

Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov O., Antonova O., Khiutti A., Novikova L., Afanasenko O., Spooner D., Gavrilenko T. Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions from the Vavilov Institute of Plant Industry. Plant Breed. 2014;133(5):660-665.

Luksha V.I., Voronkova E.V., Gukasyan O.N., Ermishin A.P. Evaluation of primary dihaploids of S. tuberosum for the presence of resistance genes to diseases and pests by PCR analysis. Sbornik nauchnykh trudov Instituta genetiki i tsitologii NAN Belarusi «Molekulyarnaya i prikladnaya genetika» [Proceedings of the Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, series "Molecular and Applied Genetics"]. Minsk, 2012;13:82-87. (in Russian)

Milbourne D., Pande B., Bryan G.J. Ch. 12. Potato. In: Kole C. (Ed.). Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Vol. 3. Pulses, Sugar and Tuber Crops. Springer, 2007; 205-236.

Milczarek D., Flis B., Przetakiewicz A. Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. Am. J. Potato Res. 2011;88:245-255. DOI 10.1007/s12230-011-9189-0.

Milczarek D., Przetakiewicz A., Kaminski P., Flis B. Early selection of potato clones with the *H1* resistance gene – the relation of nematode resistance to quality characteristics. Czech J. Genet. Plant Breed. 2014;50(4):278-284.

Mironenko N.V., Hjutti A.V., Afanasenko O.S. Characteristics of *Synchytrium endobioticum* populations by virulence, aggressiveness and DNA markers. Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 2009;43(5):460-469. (in Russian)

Mori K., Asano K., Tamiya S., Nakao T., Mori M. Challenges of breeding potato cultivars to grow in various environments and to meet different demands. Breed. Sci. 2015;65:3-16. DOI 10.1270/jsbbs.65.3.

Mori K., Sakamoto Y., Mukojima N., Tamiya S., Nakao T., Ishii T., Hosaka K. Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. Euphytica. 2011;180:347-355.

Natsional'nyy doklad o karantinnom fitosanitarnom sostoyanii na territorii Rossiyskoy Federatsii v 2016 godu [National report on quarantine phytosanitary conditions in the Russian Federation in 2016]. Available at https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/nd2017.pdf. (accessed 17 December 2017) (in Russian)

Ross H. Potato breeding - Problems and perspectives. Suppl. to J. Plant Breeding, Paul Parey, Berlin and Hamburg, 1986. [Russ. ed.: Ross H. Selektsiya kartofelya – problemy i perspektivy. Moscow, Agropromizdat, 1989.].

Schultz L., Cogan N.O.I., McLean K., Dale M.F.B., Bryan G.J., Forster J.W., Slater A.T. Evaluation and implementation of a potential diagnostic molecular marker for *H1*-conferred potato cyst nematode resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Breed. 2012; 131:315-321. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.01949.x.

Simakov E.A., Sklyarova N.P., Yashina I.M. Methodical Guide on the Technology of the Potato Breeding Process. Moscow: Dostizheniya nauki i tekhniki APK Publ., 2006. (in Russian)

Simko I., Jansky S., Stephenson S., Spooner D. Genetics of resistance to pests and disease. In: Vreugdenhil R., Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gebhardt Ch., Govers F., Taylor M., MacKerron D., Ross H. (Eds.) Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives. Amsterdam: Elsevier, 2007;7:117-155.

Slater A.T., Cogan N.O., Forster J.W. Cost analysis of the application of marker-assisted selection in potato breeding. Mol. Breed. 2013; 32(2):299-310. DOI 10.1007/s11032-013-9871-7.

Slater A.T., Cogan N.O., Hayes B.J., Schultz L., Dale M.F., Bryan G.J., Forster J.W. Improving breeding efficiency in potato using molecular and quantitative genetics. Theor. Appl. Genet. 2014;127(11):2279-2292. DOI 10.1007/s00122-014-2386-8.

Song Y.S., Hepting L., Schweizer G., Hartl L., Wenzel G., Schwarzfischer A. Mapping of extreme resistance to PVY (Ry_{sto}) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. Theor. Appl. Genet. 2005;111:879-887.

Toxopeus H.J., Huijsman C.A. Breeding for resistance to potato root eelworm. I. Preliminary data concerning the inheritance and the nature of resistance. Euphytica. 1953;2(3):180-186. DOI 10.1007/BF00053725.

Van der Voort J.R., Wolters P., Folkertsma R., Hutten R., van Zandvoort P., Vinke H., Kanyuka K., Bendahmane A., Jacobsen E., Janssen R., Bakker J. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 1997;95(5):874-880. DOI 10.1007/s001220050638.

Van der Vossen E.A.G., van der Voort J.R., Kanyuka K., Bendahmane A., Sandbrink H., Baulcombe D.C., Bakker J., Stiekema W.J., Klein-Lankhorst R.M. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. Plant J. 2000;23(5):567-576. DOI 10.1046/j.1365-313x.2000.00814.x.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):25-34
DOI 10.18699/VJ18.328

Регуляция биосинтеза стероидных гликоалкалоидов картофеля

К.А. Иванова ✉, С.В. Герасимова, Е.К. Хлесткина

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

Стероидные гликоалкалоиды (СГА) картофеля составляют часть иммунитета растений. Некоторые их модифицированные формы токсичны для человека. В ходе доместикации картофеля происходил отбор растений с пониженным уровнем СГА. В настоящее время с появлением методов, при помощи которых возможно специфично влиять на регуляцию метаболических путей, появляется перспектива преодолеть нежелательную прямую взаимосвязь между устойчивостью картофеля к вредителям и токсичностью его клубней. Однако для таких целенаправленных тонких изменений необходимы глубокие знания о регуляторной сети биосинтеза СГА картофеля. Цель обзора – обобщить сведения об известных генах биосинтеза СГА у растений, суммировать данные об исследовании этих генов у картофеля, а также рассмотреть механизмы защитного токсического действия СГА против патогенов и вредителей. Биосинтез СГА идет по мевалонатному пути, который реализуется в цитозоле и состоит из трех этапов. Первые два этапа относятся к синтезу первичных метаболитов и приводят к циклоартанолу и холестерину соответственно. В биосинтез вовлечены 12 ферментов, половина из которых также участвует в биосинтезе фитостеринов, являющемся ответвлением первого этапа этого метаболического пути. В листьях картофеля при избытке фитостеринов синтез переключается на СГА, повышая их содержание. В клубнях при избытке предшественников СГА происходит вовлечение их в синтез ланостерола, что позволяет поддерживать стабильность уровня СГА в этой части растений. Значимость структурных генов, кодирующих ферменты первых двух этапов биосинтеза, не позволяет рассматривать их в качестве мишеней для нокаута с целью снижения уровня СГА. Однако информация о тканеспецифичных механизмах переключения между путями синтеза СГА и других соединений, имеющих общих с СГА предшественников, может быть использована для манипуляции с тканеспецифичным уровнем стероидных гликоалкалоидов. На третьем этапе (собственно синтез гликоалкалоидов из холестерина) участвуют около 20 ферментов. В геноме картофеля идентифицировано 14 соответствующих им генов, 8 из которых детально изучены при помощи методов обратной генетики. В качестве перспективных мишеней для снижения уровня СГА в клубнях могут рассматриваться гены, кодирующие ферменты PGA (относящиеся к подсемейству CYP72 цитохром-P450-зависимых монооксигеназ, катализирующие превращение гидрохолестерина в тригидрохолестерин) и SGT (СГА-гликозилтрансферазы, осуществляющие превращение соланидина в его токсичные гликозилированные производные – α-соланин и α-хаконин). Описаны цис-регуляторные элементы в промоторных областях некоторых генов биосинтеза гликоалкалоидов, включая элементы, ответственные за тканеспецифичную экспрессию. Накопленные сведения служат основой для создания генотипов картофеля с тканеспецифичной регуляцией СГА, в которых при сохранении высокого

Received 25.12.2017
Accepted for publication 19.01.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: ivanova@bionet.nsc.ru

The biosynthesis regulation of potato steroidal glycoalkaloids

K.A. Ivanova ✉, S.V. Gerasimova, E.K. Khlestkina

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Potato steroidal glycoalkaloids (SGAs) compose a part of plant immunity. Some of their modified variants are toxic to humans. In the course of potato domestication, plants with a lower SGA level were selected. The advent of approaches for manipulation with the regulation of metabolic pathways provides an opportunity to overcome the undesirable direct relationship between the potato resistance to pests and the toxicity of its tubers. However, for such a fine regulation, a deep knowledge of the regulatory network of potato SGA biosynthesis is required. The purpose of this review is to summarize the information on the known SGA biosynthesis genes in plants and the results of the investigation of these genes in potato, as well as to consider the mechanisms of the SGA protective toxic action against pathogens and pests. The SGA biosynthesis is realized via the cytosolic mevalonate pathway and consists of three stages. The first two stages are required for the synthesis of primary metabolites, and lead to cycloartanol and cholesterol, respectively. Twelve enzymes are involved in the biosynthesis, and the half of them are involved in the biosynthesis of phytosterols, which is a branch of the first stage of this metabolic pathway. In the potato leaves with an excess of phytosterols, the synthesis switches to SGAs, increasing the content of the latter. In tubers, with an excess of SGA precursors, they are involved in the synthesis of lanosterol, supporting in this way the stable level of SGA. The importance of structural genes encoding the enzymes of the first two stages of biosynthesis does not allow us to consider them as a target for knockout in order to reduce the level of SGAs. However, information about the tissue-specific mechanisms of switching between the pathways of synthesis of SGA and other compounds having common precursors with SGAs can be used to manipulate the tissue-specific level of steroidal glycoalkaloids. At the third stage (the synthesis of glycoalkaloids from cholesterol), about 20 enzymes participate. In the potato genome, 14 corresponding genes were identified, 8 of which were studied in detail using reverse genetics approaches. As a promising target for reducing SGA levels in tubers, the genes encoding PGA enzymes (belonging to the CYP72 subfamily cytochrome-P450-dependent monooxygenases catalyzing the conversion of hydrocholesterol to trihydrocholesterol) and SGT (SGA glycosyltransferases that catalyze the conversion of solanidine to its toxic glycosylated derivatives α-solanine and α-chaconine) are considered. *Cis*-regulatory elements in the promoter regions of some glycoalkaloid biosynthesis genes, including elements responsible for tissue-specific expression,

уровня СГА в листьях для защиты от патогенов и вредителей будет подавляться синтез токсических веществ в клубнях.

Ключевые слова: *GAME*; *PGA*; *SGT*; *Solanum*; вторичные метаболиты; защита от патогенов и вредителей; нокаут; подавление экспрессии; регуляторные гены; стероидные гликоалкалоиды; структурные гены; тканеспецифичная экспрессия.

are described. The accumulated information provides the base for creating potato genotypes with tissue-specific regulation of SGAs, in which high levels of SGAs in leaves will remain to protect against pathogens and pests and, at the same time, the synthesis of toxic substances in tubers will be suppressed.

Key words: *GAME*; knockout; *PGA*; plant protection against pathogens and pests; *SGT*; regulatory genes; secondary metabolites; *Solanum*; steroidal glycoalkaloids; structural genes; suppression of gene expression; tissue-specific expression.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Иванова К.А., Герасимова С.В., Хлесткина Е.К. Регуляция биосинтеза стероидных гликоалкалоидов картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):25-34. DOI 10.18699/VJ18.328

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ivanova K.A., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. The biosynthesis regulation of potato steroidal glycoalkaloids. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):25-34. DOI 10.18699/VJ18.328 (in Russian)

Растения продуцируют широкий спектр вторичных метаболитов, биологическая роль многих из которых пока не установлена. Часть этих веществ участвует в формировании иммунитета растений, как индуцированного, при котором синтез и накопление вторичных метаболитов повышаются при контакте с патогенами или вредителями, так и конститутивного, который реализуется за счет постоянного присутствия в растениях определенных соединений. К числу последних относятся стероидные гликоалкалоиды (СГА) – биологически активные вторичные метаболиты, синтезирующиеся по холестериновому пути.

Стероидные гликоалкалоиды характерны для растений семейств Solanaceae и Liliaceae, включая возделываемые культуры (картофель, томат, баклажаны, перец и табак). Основными гликоалкалоидами картофеля являются α-соланин и α-хаконин. Для организма человека эти вещества токсичны, поэтому в ходе доместикации картофеля ключевую роль сыграл отбор мутантных форм с пониженным уровнем гликоалкалоидов. В современных селекционных программах в качестве доноров хозяйственно ценных генов (в частности, генов устойчивости к патогенам и вредителям) нередко привлекают дикие формы картофеля (Gebhardt, 2013). В этом случае важен отбор таких гибридных форм, которые, обладая устойчивостью, унаследованной от диких видов картофеля, характеризуются низким содержанием гликоалкалоидов в клубнях, допустимым для столовых сортов.

Для ускоренного отбора гибридов со сниженным уровнем гликоалкалоидов (с помощью маркер-ориентированной селекции) или нарушения их биосинтеза путем направленного мутагенеза (например, с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas) необходим точный подбор генов-мишеней, мутации в которых нарушали бы синтез модифицированных форм СГА, токсичных для организма человека, не затрагивая при этом весь спектр их предшественников, чтобы не снижать уровень неспецифического иммунитета растений картофеля.

Изучение генов, участвующих в биосинтезе СГА, представляет интерес и с точки зрения отбора/создания растений-продуцентов биологически активных веществ, которые могут использоваться в медицинских целях. Среди свойств СГА, значимых для данного направления: цитотоксическое (Kenny et al., 2013), антигликемическое (Satoh, 1967), антиканцерогенное (Reddivari et al., 2010), противомалярийное (Chen et al., 2010), жаропонижающее и противовоспалительное действие (Choi, Koo, 2005; Delporte et al., 1998) .

В настоящем обзоре мы обобщаем сведения об известных генах биосинтеза СГА (включая структурные гены, участвующие в биосинтезе холестерина, стероидных гликоалкалоидов, а также промежуточных продуктов этого пути, и регуляторные гены, которые определяют уровень и тканеспецифичность экспрессии структурных генов), суммируем данные об исследовании этих генов у картофеля (в том числе идентификацию соответствующих нуклеотидных последовательностей в геноме картофеля, проверку функциональной роли данных генов с помощью подходов обратной генетики), а также рассматриваем механизмы защитного токсического действия СГА против патогенов и вредителей.

Структура СГА, выделенных из картофеля

У растений картофеля идентифицировано более 80 различных гликоалкалоидов. СГА состоят из гликозидных остатков и агликона. Неполярное липофильное стероидное ядро (агликон) связано с полярным водорастворимым углеводным компонентом. Структура агликона относится, как правило, к одному из двух классов гетероциклических азотсодержащих структур, соланидану или спиросолану (рис. 1).

Эти структуры агликонов могут быть организованы в пары, каждая из которых отличается насыщенностью углерода-5 (C5, Δ5). К классу соланиданов, например, относятся соланидин и демиссидин (рис. 2), а к классу спиросоланов – соласодин и томатиденол. Демиссидин – это соланидан, насыщенный в положении C5, а соланидин – ненасыщенный.

Как правило, в культивируемом картофеле углеводный компонент представляет собой триозы. Так, гликозиды соланидина – α-хаконин и α-соланин – отличаются только углеводным компонентом (рис. 3).

α-Хаконин содержит углеводную боковую цепь, разветвленную β-хакотриозу (бис-α-L-рамнопиранозил-β-D-глюкопиранозу), присоединенную к 3-OH-группе соланидина, тогда как α-соланин содержит разветвленную β-солатриозу (α-L-рамнопиранозил-β-D-глюкопиранозил-

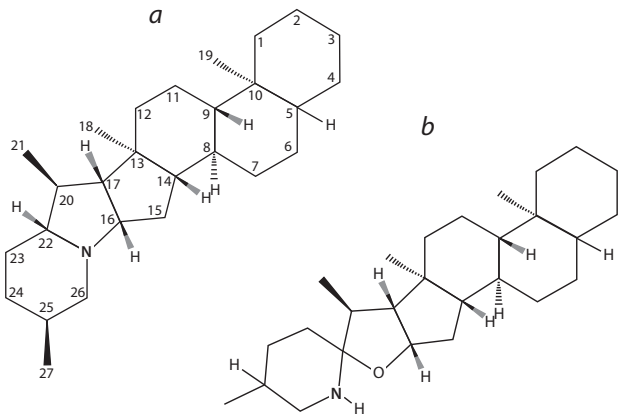


Fig. 1. Structures of two common SGA aglycones: *a*, solanidane; *b*, spirosolane.

Data on structures here and in Figs. 2 and 3 were obtained from the PUBCHEM database (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

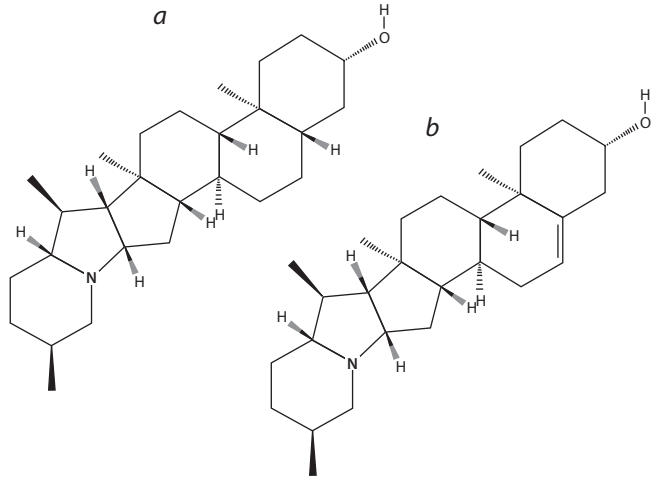


Fig. 2. Structures of solanidane-type SGA aglycones: *a*, solanidine; *b*, demissidine.

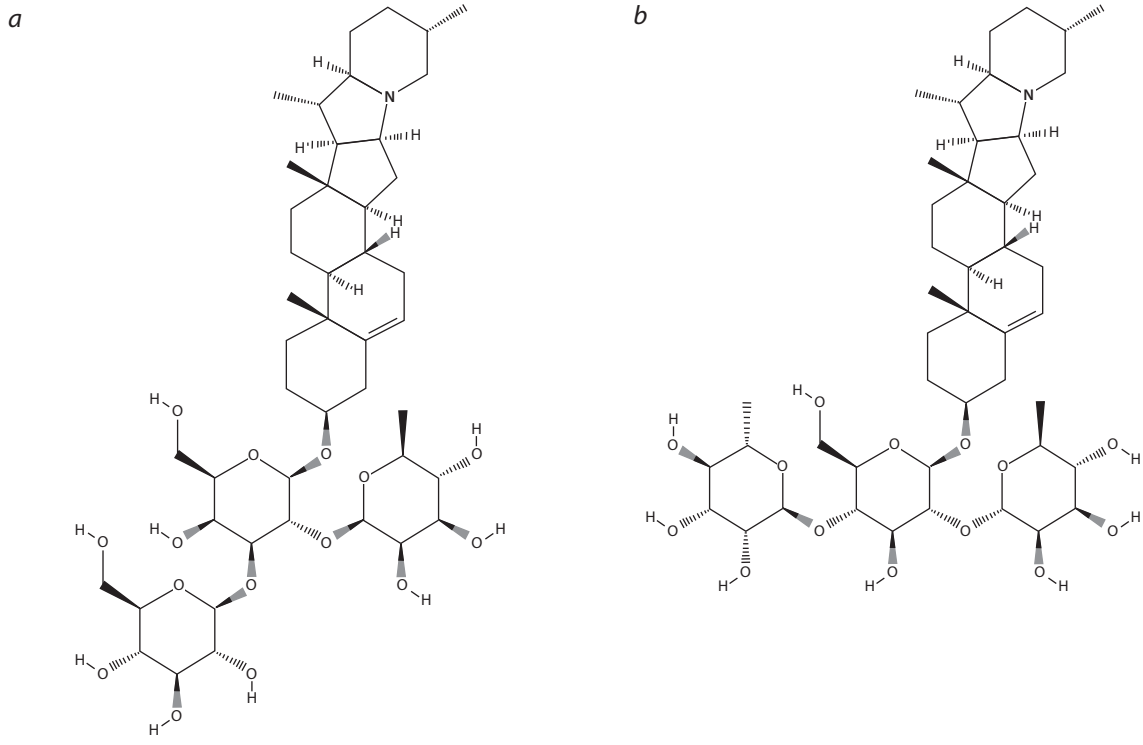


Fig. 3. Structures of glycoalcaloids involving the solanidine aglycone: *a*, α-solanine; *b*, α-chaconine.

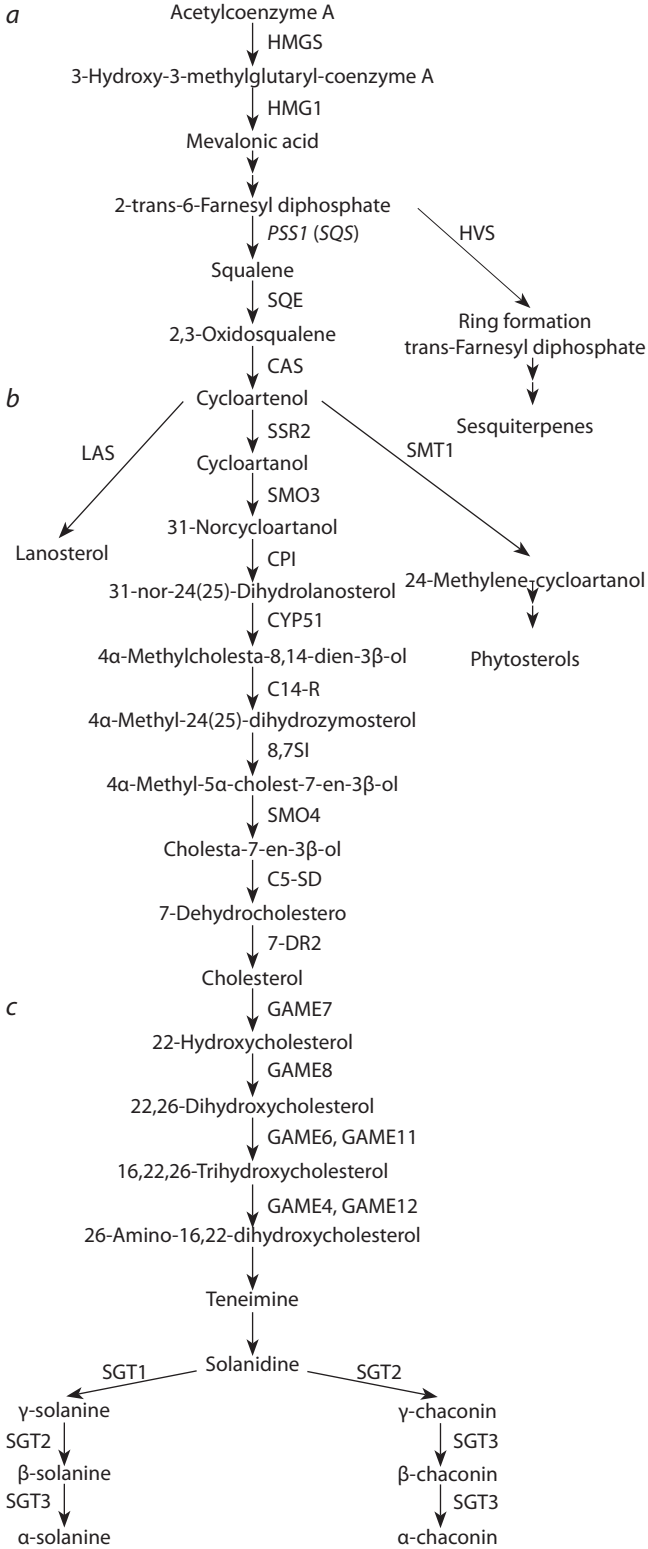
β-галактопиранозу), тоже присоединенную к 3-ОН-группе такого же агликона. При неполном гидролизе α-соланина и α-хаконина возможны β1-, β2- и γ-формы соланина и хаконина. Укороченный углеводный компонент представлен в β-формах дисахаридом, а в γ-формах – моносахаридом (табл. 1).

Триозные гликозиды демиссидина включают дигидрохаконин и дигидросоланин, а тетразогликозиды – демиссин и коммерсонин. Из класса спиросоланов в растениях картофеля преобладают гликозиды соласодина – соламаргин и соласонин, которые являются двумя главными гликоалкалоидами более чем 100 видов *Solanum*. Агликон томатиденол был найден в картофельных проростках, он может служить предшественником α-соламарина и β-соламарина (Nikolic, Stankovic, 2005; Friedman, 2006; Ginzberg et al., 2009).

К двум группам СГА, близким классу соланидана, относят лептинины (лептинидин, 23-гидроксисоланидин) и лептины (23-ацетиллептинидин), которые отличаются друг от друга модификацией в положении С23 (первые гидроксилированы, вторые ацетилированы). Они были обнаружены у нескольких аргентинских образцов вида *Solanum chacoense* (Rangarajan et al., 2000; Ginzberg et al., 2009). Стереохимически группа 23-ОН или 23-ОАс расположена в аксиальном положении кольца. Лептинин I и лептинин II представляют собой соответствующие гли-

Table 1. Potato SGA glycosides

Solanine	Glycone	Chaconine	Glycone
α	Rhamnose–galactose–glucose	α	Rhamnose–glucose–rhamnose
β1	Galactose–glucose	β1	Glucose–rhamnose
β2	Rhamnose–galactose	β2	Rhamnose–glucose
γ	Galactose	γ	Glucose



козиды хакотриозы и солатриозы лептинидина, тогда как лептин I и лептин II – это гликозиды хакотриозы и солатриозы 23-ацетиллептинидина соответственно (Friedman, 2006; Ginzberg et al., 2009).

Биосинтез СГА и промежуточные продукты биосинтеза

Биосинтез СГА идет по мевалонатному пути, который реализуется в цитозоле и состоит из трех этапов (Ginzberg et al., 2009; Sawai et al., 2014). Первые два этапа относятся к синтезу первичных метаболитов и приводят к циклоартанолу и холестерину соответственно. Для большинства растений, кроме семейств Solanaceae и Liliaceae, холестерин является минорным веществом. Превращения второго этапа были недавно подтверждены для растений томата (Sonawane et al., 2016). Установлено, что в биосинтез вовлечены 12 ферментов, половина из которых (CAS, 3βHSD, SDR, CPI, CYP51, C14-R, 8,7SI) имеет низкую субстратную специфичность и участвует в метаболизме как холестерина, так и фитостеринов. Остальные ферменты (SSR2, SMO3, SMO4, C5-SD2, 7-DR2) кодируются генами, которые дуплицировались и дивергировали, став специфичными для каждого из этих двух путей (Sonawane et al., 2016). Третий этап относится к биосинтезу вторичных метаболитов, непосредственно гликоалкалоидов, в течение которого холестерин преобразуется ферментами семейства генов *GAME* (*GLYCOALKALOID METABOLISM*) до индивидуальных СГА.

Первый этап биосинтеза. На первом этапе ацетилКоА превращается в 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А и катализируется семейством ферментов 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктаз до мевалоновой кислоты с последующим образованием 2-транс,6-трансфарнезилдифосфата (рис. 4, *a*). Трансфарнезилдифосфат

Fig. 4. Biosynthesis of steroidal glycoalkaloids (according to Itkin et al., 2013, Cárdenas et al., 2015, Sonawane et al., 2016).

(*a*) Step 1: primary metabolism, the mevalonate pathway of synthesis; (*b*) step 2: primary metabolism, the synthesis of cholesterol; (*c*) step 3: secondary metabolism, synthesis of glycoalkaloids.

HMGS, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase; HMG1, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; PSS1, squalene synthase; HVS, henbane vetispiradiene synthase; SQE, squalene epoxidase; CAS, cycloartenol synthase; LAS, lanosterol synthase; SMT1, sterol C24-methyltransferase; SSR2, sterol side chain reductase 2; SMO3, C-4 sterol methyloxydase 3; CPI, cyclopropyl sterol isomerase; CYP51, sterol C-14 demethylase (Cytochrome P450 Family 51); C14-R, sterol C-14 reductase; 8,7SI, sterol 8,7 isomerase; SMO4-C, 4 sterol methyloxydase 4; C5-SD, sterol C-5 (6) desaturase; 7-DR2, 7-dehydrocholesterol reductase 2; GAME7, C22 hydroxylase; GAME8, C26 hydroxylase; GAME6, C16 hydroxylase; GAME11, 2-hydroxyglutarate-dependent dioxygenase; GAME4, cytochrome P450 88D; GAME12, transaminase; SGT1, galactosyltransferase; SGT2, glucosyltransferase; SGT3, rhamnosyltransferase.

является субстратом для фермента скваленсинтазы, которая конденсирует две его молекулы в сквален. Выявлена корреляция между высоким содержанием СГА и высоким уровнем транскриптов генов этих двух ферментов (Krits et al., 2007). Фермент скваленэпоксидаза превращает сквален в 2,3-оксидосквален (Heftmann, 1983; Cárdenas et al., 2015). Циклоартенолсинтаза преобразует 2,3-оксидосквален в наиболее элементарный стерол – циклоартенол. 2,3-Оксидосквален также является субстратом для ланостеролсинтазы, которая превращает его в ланостерол, обнаруженный в листьях и побегах картофеля (Ginzberg et al., 2009).

Промежуточный продукт первого этапа – трансфарнезилдифосфат – является точкой ответвления метаболического пути, ведущего к синтезу сесквитерпенов картофеля, в том числе фитоалексинов любимина и ришитина (Ginzberg et al., 2009).

Второй этап биосинтеза. На втором этапе редуктаза боковой цепи стерола 2 редуцирует циклоартенол до циклоартанола (см. рис. 4, *б*). Циклоартанол в ходе последующих реакций преобразуется в холестерин. Стеролметилоксидазы SMO3 и SMO4 этого пути работают в мультиферментативном комплексе совместно с 3β-гидроксистероиддегидрогеназой и оксидоредуктазой (Sawai et al., 2014; Sonawane et al., 2016).

Для ферментов SMT1 и SSR2 у картофеля выявлены гены *SMT1* (Ginzberg et al., 2009) и *SSR2* (Sawai et al., 2014).

Промежуточный продукт второго этапа синтеза СГА, циклоартенол является точкой ветвления синтеза стеринов и ведет также к синтезу фитостеринов, в том числе ситостерола и кампистерола (предшественников брассиностероидов) (Sonawane et al., 2016).

Третий этап биосинтеза. Гликоалкалоиды образуются из общего предшественника холестерина (Sawai et al., 2014). Этот процесс изучен для преобладающих в растениях картофеля СГА – α-соланина и α-хаконина. Холестерин превращается в агликон – соланидин, который последовательно декорируется гликозидными цепочками с помощью гликозилтрансфераз (см. рис. 4, *в*). Биосинтез соланидина предполагает три последовательных окислительных превращения по C22, C26 и C16 углеродным атомам молекулы холестерина, в этих процессах участвуют гены подсемейства CYP72 цитохром-P450-зависимых монооксигеназ, кодирующие C-22-гидроксилазу GAME7 (цитохром P450 72A186), C-26-гидроксилазу GAME8 (цитохром P450 72A208) и C-16-гидроксилазу GAME6 (цитохром P450 72A188); а также 2-оксоглутаратзависимая диоксигеназа GAME11. GAME4 (цитохром P450 88D) окисляет 16,22,26-тригидроксихолестерин. В добавлении атома азота участвует трансаминаза GAME12. Два последних шага являются точкой ветвления путей синтеза СГА и безазотистых сапонинов картофеля. Последующие нуклеофильные замены посредством промежуточного соединения тенеимина могут объяснить образование соланидина (Cárdenas et al., 2015). В гликозилировании соланидина участвуют три фермента: SGT1 (гомолог GAME1), SGT2 и SGT3 (GAME2). При последовательном присоединении D-глюкозы и двух L-рамноз образуется α-хаконин; при присоединении D-галактозы, D-глюкозы и L-рамнозы – α-соланин (McCue et al., 2006, 2007; McCue, 2009).

Примечательно, что гены *GAME* организованы в кластеры и коэкспрессируются. Гены *GAME1* (*SGT1*), *GAME2* (*SGT3*), *GAME6*, *GAME7*, *GAME11* находятся в хромосоме 7, гены *GAME4* и *GAME12* – в хромосоме 12 (Itkin et al., 2013), *GAME8a* и *GAME8b* – в хромосоме 6 (Mariot et al., 2016). Обнаружено, что районы коэкспрессирующихся генов в хромосомах 7 и 12 фланкированы похожим образом аннотированными генами, идентично расположенными в геноме. Но эти гены обладают низким уровнем коэкспрессии с генами *GAME* и, вероятно, не связаны с метаболизмом СГА (Itkin et al., 2013).

Для вышеупомянутых генов *GAME* показана прямая корреляция между уровнем их экспрессии и уровнем накопления СГА, за исключением гена *GAME7*. Уровень транскриптов этого гена не изменялся при изменении количества СГА (Mariot et al., 2016).

В работе (Mariot et al., 2016) был получен транскрипционный профиль генов *GAME* и предсказано число кодируемых ими изоформ. *GAME4* кодирует одну изоформу, длина кодирующей части, состоящей из 8 экзонов, – 1614 п. о., общая длина гена – 7804 п. о. *GAME6* (4741 п. о.) представлен четырьмя изоформами, первая из которых кодируется транскриптом с одним экзоном, две – транскриптами с тремя экзонами, состав которых различен, и четвертая – транскриптом с пятью экзонами. *GAME7*, самый протяженный из всех генов *GAME* (11078 п. о.), представлен шестью изоформами, две из которых кодируются транскриптами с пятью экзонами различного состава и четыре изоформы кодируются транскриптами с одним, двумя, тремя и четырьмя экзонами соответственно. Гены *GAME8a* и *GAME8b* являются копиями на одной хромосоме и кодируют по одной изоформе. Они состоят из пяти экзонов каждый и отличаются по длине (4495 и 4545 п. о. соответственно). *GAME11* (4019 п. о.) – самый короткий из генов *GAME*, состоит из пяти экзонов и кодирует две изоформы. *GAME12* длиной 6626 п. о. состоит из 11 экзонов и кодирует одну изоформу. Гены *GAME1* (*SGT1*) и *GAME2* (*SGT3*) длиной 4095 и 4125 п. о. соответственно состоят из одного экзона и кодируют по одной изоформе.

Список генов, участвующих во всех этапах синтеза СГА, идентифицированных для картофеля, представлен в табл. 2.

Регуляция биосинтеза СГА

Содержание СГА варьирует как у различных видов, так и внутри видов рода *Solanum*. Регуляция синтеза гликоалколоидов зависит не только от генотипа, но и от действия внешних факторов (Sinden et al., 1984). Прохладный и влажный климат, различный стресс, поранения, а также экспозиция клубней на свету повышают уровень гликоалкалоидов в растениях (Smith et al., 1996). Это подтверждается результатами исследований регуляции уровня стеролов у растений, в которой наряду с другими факторами участвует сигнальный путь жасмоновой кислоты, один из основных путей передачи сигналов при защите растений от биотического и абиотического стресса.

В промоторных районах генов *GAME* предсказаны различные цис-регуляторные элементы, связанные с биотическим и абиотическим стрессом и светозависимой активацией (Mariot et al., 2016). Кроме того, в геноме *Sola-*

Table 2. Genes for potato glycoalkaloid biosynthesis

Gene designation	Accession no.*	Reference
HMG1	Sotub02g025630	Cárdenas et al., 2016
PSS1 (*SQS*)	Sotub01g047720	»
SQE	PGSC0003DMG400004923	Manrique-Carpintero et al., 2013
CAS	Sotub04g023080 KU313680	Cárdenas et al., 2016 Kumar et al., 2017
LAS	PGSC0003DMB000000328:43281700..43271000	Kumar et al., 2017
SMT1	Sotub01g025880	Cárdenas et al., 2016
SSR2	Sotub02g015720 PGSC0003DMG400021142 AB839750	Cárdenas et al., 2016 Sawai et al., 2014 »
GAME7	PGSC0003DMG402012386	Mariot et al., 2016
GAME8 (*PGA1*) *GAME8a* *GAME8b*	PGSC0003DMG400026586 PGSC0003DMG400026594 PGSC0003DMG400026586	Umemoto et al., 2016 Mariot et al., 2016 »
GAME6 (*PGA2*)	PGSC0003DMG400026594 Sotub07g016580 PGSC0003DMG400011750	Umemoto et al., 2016 Cárdenas et al., 2016 Mariot et al., 2016
GAME11	PGSC0003DMG400011751 Sotub07g016570	Mariot et al., 2016 Cárdenas et al., 2016
GAME4	PGSC0003DMG400024274 Sotub12g011090	Mariot et al., 2016 Cárdenas et al., 2016
GAME12	PGSC0003DMG400024281 Sotub12g011080	Mariot et al., 2016 Cárdenas et al., 2016
GAME1 (*SGT1*)	Sotub07g016600 PGSC0003DMG400011749 STU82367	Cárdenas et al., 2016 Mariot et al., 2016 McCue et al., 2017
SGT2	DQ218276 PGSC0003DMG400017508	McCue et al., 2017 Manrique-Carpintero et al., 2013
GAME2 (*SGT3*)	Sotub07g016550 PGSC0003DMG400011740	Cárdenas et al., 2016 Mariot et al., 2016
GAME9	Sotub01g029510 PGSC0003DMG400025989	Cárdenas et al., 2016 »
StLAS-like	KU313679	Kumar et al., 2017

* Accession numbers follow the databases GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/), Spud DB (Hirsch et al., 2014), and POTATO GENOMICS RESOURSE (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu).

num tuberosum был идентифицирован транскрипционный фактор GAME9, член семейства AP2/ERF (APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTORS), регулирующий биосинтез СГА, а также активность нескольких генов биосинтеза предшественников СГА – мевалоната и холестерина. В растениях картофеля ген *GAME9* коэкспрессируется с *GAME2*, *GAME11*, *GAME6*, *GAME1*, *GAME12* и *GAME4*, а также с геном *SSR2*. В районе локализации гена *GAME9* в хромосоме 1 картофеля был выявлен QTL (quantitative trait locus – локус количественного признака), связанный с высоким уровнем СГА в клубнях (Cárdenas et al., 2016). На растениях *Solanum lycopersicum* показано, что GAME9 – это первичный транскрипционный фактор в сигнальном пути жасмоновой кислоты через рецепторный комплекс, одним из компонентов которого является белок CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) (Abdelkareem et al., 2017).

После этапа биосинтеза с участием CAS и образованием циклоартенола наступает важная точка регуляции пути, в которой контролируется расхождение синтеза первичных метаболитов фитостеринов (доминирующий путь) и вторичных метаболитов СГА. Циклоартенол – основной предшественник фитостеринов и СГА. Избыток конститутивных фитостеринов в листьях растений картофеля компенсируется превращением предшественника (циклоартенола) в СГА, без подавления экспрессии генов, участвующих в синтезе циклоартенола (Kumar et al., 2017). В отличие от регуляции в листьях, в мякоти клубней при участии специфичного для них фермента StLAS-like избыточные промежуточные продукты превращаются в ланостерол, из которого, в свою очередь, могут образовываться лишь следовые количества СГА (Sawai et al., 2006; Kumar et al., 2017). Такой механизм переключения

синтеза с циклоартенола на ланостерол позволяет поддерживать низкий уровень гликоалкалоидов в клубнях. В промоторной области гена *StLAS-like* были найдены цис-элементы, которые обеспечивают непосредственно тканеспецифичную экспрессию. Показано существенное различие в уровнях транскрипции этого гена в разных тканях, причем наиболее высокий уровень транскрипции отмечен в мякоти клубней. Также в его промоторе были обнаружены элементы, свойственные промоторам структурных генов синтеза СГА и связанные с их активацией с помощью фактора транскрипции GAME9. Кроме того, промотор *StLAS-like* содержит элементы, связанные с активацией в ответ на стресс, воздействие гормонами и светом. Предполагается, таким образом, что путь биосинтеза ланостерола у растений ведет к синтезу вторичных метаболитов, задействованных в защите растений от действия стрессовых факторов (Kumar et al., 2017).

Манипуляции с генами СГА

Большинство работ, в которых проводились манипуляции с генами, вовлеченными в синтез СГА, были посвящены выявлению/уточнению функций этих генов. Снижение функции или, наоборот, сверхэкспрессия гена *GAME9*, кодирующего AP2/ERF транскрипционный фактор, влияли на накопление СГА и фитостеринов, соответственно понижая или повышая синтез этих веществ и подтверждая регуляторную роль гена (Cárdenas et al., 2016).

Сверхэкспрессия гена *SMT1* сои (кодирующего ключевой фермент, переключающий синтез стеринов в сторону фитостеринов) в растениях картофеля приводила к понижению уровня СГА, а также свободного холестерина. Уровень СГА был ниже на 41 и 63 % в листьях и клубнях соответственно, уровень холестерина – на 50 %. При этом повышалось содержание фитостеринов (Arnqvist et al., 2003).

Подавление экспрессии гена *SSR2* при помощи РНК-интерференции или нарушение его функций с помощью геномного редактирования (с использованием системы TALLEN) приводило у растений картофеля к снижению уровня холестерина, а также СГА примерно на 10 %, без какого-либо влияния на рост растений (Sawai et al., 2014). Небольшее снижение уровня СГА, несмотря на ключевую роль *SSR2* в их синтезе (см. рис. 4), позволяет предположить наличие дублирующих генов.

Подавление функции *GAME8* (*PGA1*) и *GAME6* (*PGA2*) картофеля при помощи РНК-интерференции приводило к снижению содержания СГА более чем в 10 раз и повышению содержания субстратов этих ферментов (Umemoto et al., 2016). При этом растения характеризовались нормальным вегетативным ростом и клубнеобразованием, но отличались стерильностью по мужскому типу. Показано также, что клубни трансгенных растений не прорастали при хранении на воздухе или в воде, но прорастали при хранении в почве, а также в питательной среде.

Понижение функции гена *GAME4* картофеля при помощи РНК-интерференции приводило к изменению профиля метаболитов этих растений со сдвигом в сторону накопления стероидных сапонинов и фитоэкдистероидов и уменьшения накопления СГА в несколько раз, что сопровождалось снижением резистентности к патогену *Verticillium dahliae* (Paudel et al., 2017).

Серия работ (McCue et al., 2006, 2007, 2017; McCue, 2009) посвящена элиминированию гликозилирования, последнего шага формирования СГА, путем независимого встраивания в геном растений картофеля антисмысловых конструкций для генов гликозилаз (*SGT1*, *SGT2* и *SGT3*). В линиях со встроенными антисмысловыми конструкциями для *SGT1* и *SGT2* наблюдалось изменение соотношения α-соланина и α-хаконина: уменьшение α-соланина с компенсаторным увеличением α-хаконина в линии с антисмысловой конструкцией для *SGT1* и противоположное изменение в линии *SGT2*. Однако трансгенные линии с двойными антисмысловыми конструкциями для обоих генов *SGT1* и *SGT2* не приводили к уменьшению общего уровня СГА, и наблюдалось подавление экспрессии либо *SGT1*, либо *SGT2*. В линии, трансформированной антисмысловой ДНК *SGT3* с клубнеспецифичным промотором, наблюдалось уменьшение α-соланина и α-хаконина с увеличением минорных β- и γ-форм этих гликоалкалоидов в клубнях растений. При подавлении экспрессии генов *SGT* не выявлено побочных эффектов на рост и развитие растений (McCue et al., 2017) или изменения метаболизма за исключением целенаправленных изменений, описанных выше, что подтверждено также в работе (Shepherd et al., 2015).

Метаболизм СГА и распределение в растительных тканях

Ферменты, участвующие в синтезе холестерина, а также фитостеринов, были найдены у растений арабидопсиса и томата в мембране ЭПР (эндоплазматического ретикулума), а также в плазмолемме и липидоподобных частицах клетки (Sonawane et al., 2016). СГА локализованы непосредственно в цитоплазме – главным образом в вакуолях, а также в апопласте растений томата и картофеля (Cárdenas et al., 2015). Они найдены во всех органах и тканях растений картофеля, кроме сердцевины клубня. Наибольшая концентрация СГА в клубнях была обнаружена в полутораміллиметровом слое феллодермы (Mariot et al., 2016). Концентрация гликоалкалоидов в феллодерме может быть в 3–10 раз выше, чем в мякоти клубня (Cantwell, 1996). Информация о наличии транспорта СГА в растениях картофеля отсутствует (Smith et al., 1996; Friedman, 2006; Alyokhin et al., 2012). В связи с этим высказано предположение, что основной биосинтез СГА в клубнях также происходит в феллодерме (Sinden et al., 1984; Alyokhin et al., 2012). Высокий уровень СГА в феллодерме коррелировал с высоким уровнем транскрипции ключевых ферментов биосинтеза СГА, в то время как в других частях растения наблюдали низкий уровень и СГА, и транскриптов генов биосинтеза СГА (Krits et al., 2007). Вероятно, накопление гликоалкалоидов в феллодерме является одним из механизмов защиты клубней картофеля от вредителей.

Стероидные гликоалкалоиды синтезируются в растениях картофеля на всех стадиях развития. Эксперименты по длительному хранению показывают, что содержание СГА в клубнях в начальный период хранения возрастает, а далее снижается (Fitzpatrick et al., 1977). При этом если клубни подвергаются воздействию освещения, в том числе искусственного, а также положительных температур (10 °С), то уровень СГА в клубнях возрастает (Haase,

2010). В клубнях картофеля обнаружено присутствие фермента рамнозидазы, которая катализирует превращение α-хаконина в β-хаконин (Filadelfi, Zitnak, 1982). Этот же фермент может превращать и α-соланин в β-соланин, но имеет большее сродство к α-хаконину (Bushway et al., 1990). В работе (Nikolic, Stankovic, 2005) из ботвы растений картофеля были выделены ферменты, которые гидролизуют α-соланин и α-хаконин, экстрагированные из растений картофеля, до агликона соланидина при воздействии температурой от 30 до 40 °С. Возможно, эти ферменты вовлечены в процесс деградации СГА в растениях во избежание аутотоксичности, но их активность крайне мала в интактных клубнях (Ginzberg et al., 2009).

Токсические свойства СГА

Стероидные гликоалкалоиды – это биологически активные вторичные метаболиты, которые появились в ходе эволюции *Solanum* как компонент защитного механизма от патогенных микроорганизмов и насекомых-вредителей. При высокой концентрации гликоалкалоиды картофеля отпугивают, вызывают гибель и подавляют размножение личинок картофельной тли, *Macrosiphum euphorbiae*, переносчика PVA, PVM, PVY (potato virus A, M, Y) и других вирусов картофеля (Guntner et al., 2000). В работе (Flanders et al., 1992) показана устойчивость картофеля, связанная с различными СГА, к таким вредителям, как картофельная блошка, зеленая персиковая тля, картофельная тля, картофельная цикадка. Гликоалкалоиды ингибируют рост грибного патогена *Alternaria brassicicola* (Smith et al., 1996). В ряде исследований подтверждена связь устойчивости растений картофеля к личинкам и взрослым формам колорадского жука с содержанием в них различных гликоалкалоидов (Tingey, 1984; Flanders et al., 1992; Lorenzen et al., 2001).

Существует два механизма формирования устойчивости к колорадскому жуку, связанных с гликоалкалоидами: отпугивание насекомых (антиксеноз) и токсичность (антибиоз) (Pelletier, Tai, 2001). Детеррентный эффект основан на неспецифическом взаимодействии СГА со вкусовыми рецепторами (хемосенсиллами) жука, влияющем на пищевое поведение насекомого (Mitchell, Harrison, 1985).

Устойчивость растений картофеля к насекомым зависит как от количества, так и от состава индивидуальных СГА. Так, демиссин, соланин, хаконин, соламарин и соласонин не влияют на устойчивость, а томатин, лептин, коммерсонин и дегидрокоммерсонин, напротив, проявляют высокую эффективность в борьбе с насекомыми (Sinden et al., 1980; Mitchell, Harrison, 1985; Flanders et al., 1992; Lorenzen et al., 2001; Friedman, 2006). СГА с разной эффективностью образуют комплексы с холестерином клеточных мембран, приводя к перестановкам в бислое и разрушению мембран. Молекула СГА образует комплекс с холестерином своей агликоновой частью, а эффективность этого процесса зависит от конкретной гликозидной цепи (Friedman, 2006). Есть подтверждение синергетическому разрушительному действию двух различных СГА на синтетические клеточные мембраны *in vitro* (Smith et al., 1996). Гликоалкалоиды транспортируются в клетку через ионные натриевые и кальциевые каналы и ингибируют транспорт ионов (Friedman, 2006). Кроме того, СГА ингибируют ацетилхолинэстеразу и бутирилхолинэстеразу, ферменты, гидролизующие нейротрансмиттер ацетилхолин, в то время как их агликоны имеют низкий ингибиторный эффект или не имеют его совсем (Friedman, 2006).

На человека и животных СГА оказывают общее токсическое, нейротоксическое, эмбриотоксическое, гепатотоксическое и тератогенное действие (Friedman, 2006; Kozukue et al., 2008). При этом α-хаконин гораздо более токсичен, чем α-соланин. Хотя оба вещества блокируют ацетилхолинэстеразу, но α-соланин имеет менее выраженный литический эффект или не имеет его вовсе. Промежуточные продукты гидролиза α-хаконина и α-соланина проявляют все меньшую общую токсичность по мере того, как они теряют углеводные группы. Агликон соланидин наименее токсичен во всех проявлениях. Также соланин и хаконин оказываются более токсичными, чем их соответствующие спиросоланы: соламаргин, соласонин и соласодин. Орально потребляемый томатин, по-видимому, нетоксичен (Kozukue et al., 2008). Пероральные дозы суммарных СГА 1–5 мг/кг массы тела приводят к отравлению от незначительного до тяжелого, тогда как дозы 3–6 мг/кг массы тела могут быть летальными (Smith et al., 1996). Установленный максимальный уровень содержания СГА в клубнях для безопасного использования в пищу не должен превышать 20 мг на 100 г свежего веса (Ginzberg et al., 2009). При употреблении картофеля в пищу важны условия хранения клубней. Известно, что при хранении клубней на свету в них повышается содержание гликоалкалоидов с независимым увеличением количества хлорофилла, приводящим к «позеленению» клубня (Smith et al., 1996).

Заключение

Растения обладают огромным химическим разнообразием вторичных метаболитов, и понимание того, как формируется это разнообразие в многоступенчатом эволюционном пути, – фундаментальный вопрос. Многочисленные современные сорта картофеля возникли благодаря одомашниванию диких видов и их последующему улучшению с помощью селекции. Доместикация картофеля сопровождалась уменьшением содержания стероидных гликоалкалоидов, токсичных для человека. Дальнейшее изучение регуляции накопления СГА и особенностей этого процесса в различных условиях с целью уменьшения содержания стероидных гликоалкалоидов в картофеле позволит эффективнее привлекать к селекции дикие виды картофеля. Такое моделирование процессов доместикации представляет собой еще одну фундаментальную задачу. Известные эффекты гликоалкалоидов, кроме токсического, такие как антиканцерогенная или противомалярийная активность, также делают биосинтез СГА актуальным объектом для изучения. Перспективным направлением является разработка новых сортов картофеля с тканеспецифичной регуляцией СГА, в которых будет сохраняться высокий уровень СГА в листьях для защиты от патогенов и вредителей и одновременно подавляться накопление этих веществ в клубнях.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-29-08006.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Abdelkareem A., Thagun C., Nakayasu M., Mizutani M., Hashimoto T., Shoji T. Jasmonate-induced biosynthesis of steroidal glycoalkaloids depends on COI1 proteins in tomato. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017;489(2):206-210. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.05.132.

Alyokhin A., Vincent C., Giordanengo P. (Eds.). Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management. Academic Press, 2012.

Arnqvist L., Dutta P.C., Jonsson L., Sitbon F. Reduction of cholesterol and glycoalkaloid levels in transgenic potato plants by overexpression of a type 1 sterol methyltransferase cDNA. Plant Physiol. 2003; 131(4):1792-1799. DOI 10.1104/pp.102.018788.

Bushway A.A., Bushway R.J., Kim C.H. Isolation, partial purification and characterization of a potato peel α-solanine cleaving glycosidase. Am. Potato J. 1990;67(4):233-238. DOI 10.1007/BF02987264.

Cantwell M. A review of important facts about potato glycoalkaloids. Perishables Handling Newslett. 1996;87:26-27.

Cárdenas P.D., Sonawane P.D., Heinig U., Bocobza S.E., Burdman S., Aharoni A. The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in *Solanaceae* steroidal alkaloid metabolism. Phytochemistry. 2015;113:24-32. DOI 10.1016/j.phytochem.2014.12.010.

Cárdenas P.D., Sonawane P.D., Pollier J., Bossche R.V., Dewangan V., Weithorn E., Tal L., Meir S., Rogachev I., Malitsky S., Giri A.P., Goossens A., Burdman S., Aharoni A. GAME9 regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway. Nat. Commun. 2016;7:10654. DOI 10.1038/ncomms10654.

Chen Y., Li S., Sun F., Han H., Zhang X., Fan Y., Tay G., Zhou Y. *In vivo* antimalarial activities of glycoalkaloids isolated from Solanaceae plants. Pharm. Biol. 2010;48(9):1018-1024. DOI 10.3109/13880200903440211.

Choi E., Koo S. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanolic extract of potato (Solanum tuberlosum). Food Agric. Immunol. 2005;16(1):29-39. DOI 10.1080/09540100500064320.

Delporte C., Backhouse N., Negrete R., Salinas P., Rivas P., Cassels B.K., Feliciano A.S. Antipyretic, hypothermic and antiinflammatory activities and metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. Phytother. Res. 1998;12(2):118-122. DOI 10.1002/(SICI)1099-1573(199803)12:2<118::AID-PTR207>3.0.CO;2-U.

Filadelfi M.A., Zitnak A. Preparation of chaconines by enzymic hydrolysis of potato berry alkaloids. Phytochemistry. 1982;21(1):250-251. DOI 10.1016/0031-9422(82)80067-8.

Fitzpatrick T.J., Herb S.F., Osman S.F., McDermott J.A. Potato glycoalkaloids: increases and variations of ratios in aged slices over prolonged storage. Am. Potato J. 1977;54(11):539-544. DOI 10.1007/BF02852221.

Flanders K.L., Hawkes J.G., Radcliffe E.B., Lauer F.I. Insect resistance in potatoes: sources, evolutionary relationships, morphological and chemical defenses, and ecogeographical associations. Euphytica. 1992;61(2):83-111. DOI 10.1007/BF00026800.

Friedman M. Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. J. Agric. Food Chem. 2006;54(23):8655-8681. DOI 10.1021/jf061471t.

Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. Trends Genet. 2013;29(4):248-256. DOI 10.1016/j.tig.2012.11.006.

Ginzberg I., Tokuhisa J.G., Veilleux R.E. Potato steroidal glycoalkaloids: biosynthesis and genetic manipulation. Potato Res. 2009; 52(1):1-15. DOI 10.1007/s11540-008-9103-4.

Guntner C., Vazquez A., Gonzalez G., Usubillaga A., Ferreira F., Moyna P. Effect of *Solanum* glycoalkaloids on potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*: Part II. J. Chem. Ecol. 2000;26(5):1113-1122. DOI 10.1023/A:1005471624833.

Haase N.U. Glycoalkaloid concentration in potato tubers related to storage and consumer offering. Potato Res. 2010;53(4):297-307. DOI 10.1007/s11540-010-9162-1.

Heftmann E. Biogenesis of steroids in Solanaceae. Phytochemistry. 1983;22(9):1843-1860. DOI 10.1016/0031-9422(83)80001-6.

Hirsch C.D., Hamilton J.P., Childs K.L., Cepela J., Crisovan E., Vaillancourt B., Hirsch C.N., Habermann M., Neal B., Buell C.R. Spud DB: A resource for mining sequences, genotypes, and phenotypes to accelerate potato breeding. Plant Genome. 2014;7(1). DOI 10.3835/plantgenome2013.12.0042.

Itkin M., Heinig U., Tzfadia O., Bhide A.J., Shinde B., Cárdenas P.D., Bocobza S.E., Unger T., Malitsky S., Finkers R., Tikunov Y., Bovy A., Chikate Y., Singh P., Rogachev I., Beekwilder J., Giri A.P., Aharoni A. Biosynthesis of antinutritional alkaloids in Solanaceous crops is mediated by clustered genes. Science. 2013;341(6142):175-179. DOI 10.1126/science.1240230.

Kenny O.M., Brunton N.P., Rai D.K., Collins S.G., Jones P.W., Maguire A.R., O'Brien N.M. Cytotoxic and apoptotic potential of potato glycoalkaloids in a number of cancer cell lines. J. Agr. Sci. Appl. 2013;2(4):184-192. DOI 10.14511/jasa.2013.020401.

Kozukue N., Yoon K.S., Byun G.I., Misoo S., Levin C.E., Friedman M. Distribution of glycoalkaloids in potato tubers of 59 accessions of two wild and five cultivated *Solanum* species. J. Agric. Food Chem. 2008;56(24):11920-11928. DOI 10.1021/jf802631t.

Krits P., Fogelman E., Ginzberg I. Potato steroidal glycoalkaloid levels and the expression of key isoprenoid metabolic genes. Planta. 2007; 227(1):143-150. DOI 10.1007/s00425-007-0602-3.

Kumar A., Fogelman E., Weissberg M., Tanami Z., Veilleux R.E., Ginzberg I. Lanosterol synthase-like is involved with differential accumulation of steroidal glycoalkaloids in potato. Planta. 2017;246(6): 1189-1202. DOI 10.1007/s00425-017-2763-z.

Lorenzen J.H., Balbyshev N.F., Lafta A.M., Casper H., Tian X., Sagredo B. Resistant potato selections contain leptine and inhibit development of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 2001;94(5):1260-1267. DOI 10.1603/0022-0493-94.5.1260.

Manrique-Carpintero N.C., Tokuhisa J.G., Ginzberg I., Holliday J.A., Veilleux R.E. Sequence diversity in coding regions of candidate genes in the glycoalkaloid biosynthetic pathway of wild potato species. G3 Genes Genom. Genet. 2013;3(9):1467-1479. DOI 10.1534/g3.113.007146.

Mariot R.F., De Oliveira L.A., Voorhuijzen M.M., Staats M., Hutten R.C., van Dijk J.P., Kok E.J., Frazzon J. Characterization and transcriptional profile of genes involved in glycoalkaloid biosynthesis in new varieties of *Solanum tuberosum* L. J. Agric. Food Chem. 2016;64(4):988-996. DOI 10.1021/acs.jafc.5b05519.

McCue K.F. Potato glycoalkaloids, past present and future. Fruit Veget. Cereal Sci. Biotechn. 2009;3(7):65-71.

McCue K.F., Allen P.V., Shepherd L.V., Blake A., Whitworth J., Maccree M.M., Rockhold D.R., Stewart D., Davies H.V., Belknap W.R. The primary *in vivo* steroidal alkaloid glucosyltransferase from potato. Phytochemistry. 2006;67(15):1590-1597. DOI 10.1016/j.phytochem.2005.09.037.

McCue K.F., Allen P.V., Shepherd L.V., Blake A., Maccree M.M., Rockhold D.R., Novy R.G., Stewart D., Davies H.V., Belknap W.R. Potato glycosterol rhamnosyltransferase, the terminal step in triose side-chain biosynthesis. Phytochemistry. 2007;68(3):327-334. DOI 10.1016/j.phytochem.2006.10.025.

McCue K.F., Breksa A., Vilches A., Belknap W.R. Modification of potato steroidal glycoalkaloids with silencing RNA constructs. Am. J. Potato Res. Online 2017;1-6. DOI 10.1007/s12230-017-9609-x.

Mitchell B.K., Harrison G.D. Effects of *Solanum* glycoalkaloids on chemosensilla in the Colorado potato beetle. J. Chem. Ecol. 1985; 11(1):73-83. DOI 10.1007/BF00987607.

Nikolic N.C., Stankovic M.Z. Hydrolysis of glycoalkaloids from *Solanum tuberosum* L. haulm by enzymes present in plant material and by enzyme preparation. Potato Res. 2005;48(1):25-33. DOI 10.1007/BF02733679.

Paudel J.R., Davidson C., Song J., Maxim I., Aharoni A., Tai H.H. Pathogen and pest responses are altered due to rnai-mediated knockdown of *GLYCOALKALOID METABOLISM 4* in *Solanum tuberosum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 2017;30(11):876-885. DOI 10.1094/MPMI-02-17-0033-R.

Pelletier Y., Tai G.C.C. Genotypic variability and mode of action of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) resistance in seven *Solanum* species. J. Econ. Entomol. 2001;94(2):572-578. DOI 10.1603/0022-0493-94.2.572.

Rangarajan A., Miller A.R., Veilleux R.E. Leptine glycoalkaloids reduce feeding by Colorado potato beetle in diploid *Solanum* sp. hybrids. J. Am. Soc. Horticult. Sci. 2000;125(6):689-693.

Reddivari L., Vanamala J., Safe S.H., Miller (Jr.) J.C. The bioactive compounds α-chaconine and gallic acid in potato extracts decrease survival and induce apoptosis in LNCaP and PC3 prostate cancer cells. Nutr. Cancer. 2010;62(5):601-610. DOI 10.1080/01635580903532358.

Satoh T. Glycemic effects of solanine in rats. Jap. J. Pharmacol. 1967; 17(4):652-658.

Sawai S., Akashi T., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Ayabe S.I., Aoki T. Plant lanosterol synthase: divergence of the sterol and triterpene biosynthetic pathways in eukaryotes. Plant Cell Physiol. 2006; 47(5):673-677. DOI 10.1093/pcp/pcj032.

Sawai S., Ohyama K., Yasumoto S., Seki H., Sakuma T., Yamamoto T., Takebayashi Y., Kojima M., Sakakibara H., Aoki T., Muranaka T., Saito K., Umemoto N. Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. Plant Cell. 2014;26(9):3763-3774. DOI 10.1105/tpc.114.130096.

Shepherd L.V.T., Hackett C.A., Alexander C.J., McNicol J.W., Sungurtas J.A., Stewart D., McCue K.F., Belknap W.R., Davies H.V. Modifying glycoalkaloid content in transgenic potato – Metabolome impacts. Food Chem. 2015;187:437-443. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.04.111.

Sinden S.L., Sanford L.L., Osman S.F. Glycoalkaloids and resistance to the Colorado potato beetle in *Solanum chacoense* Bitter. Am. J. Potato Res. 1980;57(7):331-343. DOI 10.1007/BF02854028.

Sinden S.L., Sanford L.L., Webb R.E. Genetic and environmental control of potato glycoalkaloids. Am. J. Potato Res. 1984;61(3):141-156. DOI 10.1007/BF02854035.

Smith D.B., Roddick J.G., Jones J.L. Potato glycoalkaloids: some unanswered questions. Trends Food Sci. Technol. 1996;7(4):126-131. DOI 10.1016/0924-2244(96)10013-3.

Sonawane P.D., Pollier J., Panda S., Szymanski J., Massalha H., Yona M., Unger T., Malitsky S., Arendt P., Pauwels L., Almekias-Siegl E., Rogachev I., Meir S., Cárdenas P.D., Masri A., Petrikov M., Schaller H., Schaffer A.A., Kamble A., Giri A.P., Goossens A., Aharoni A. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. Nat. Plants. 2016;3:16205. DOI 10.1038/nplants.2016.205.

Tingey W.M. Glycoalkaloids as pest resistance factors. Am. Potato J. 1984;61(3):157-167. DOI 10.1007/BF02854036.

Umemoto N., Nakayasu M., Ohyama K., Yotsu-Yamashita M., Mizutani M., Seki H., Saito K., Muranaka T. Two cytochrome p450 monooxygenases catalyze early hydroxylation steps in the potato steroid glycoalkaloid biosynthetic pathway. Plant Physiol. 2016;171(4): 2458-2467. DOI 10.1104/pp.16.00137.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):35-45
DOI 10.18699/VJ18.329

Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации

Т.А. Гавриленко[1, 4] ✉, Н.С. Клименко[1], О.Ю. Антонова[1], В.А. Лебедева[2, 3], З.З. Евдокимова[2], Н.М. Гаджиев[2, 3], О.В. Апаликова[1], Н.В. Алпатьева[1], Л.И. Костина[1], Н.М. Зотеева[1], Ф.Т. Мамадбокирова[4], К.В. Егорова[1, 4]

[1] Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
[2] Ленинградский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Белогорка», Ленинградская область, Гатчинский район, Россия
[3] ООО Селекционная фирма «ЛиГа», Ленинградская область, Гатчинский район, Россия
[4] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Задача повышения устойчивости сортов к болезням и вредителям является приоритетной для селекции картофеля. Многие сорта, созданные селекционерами северо-западной зоны Российской Федерации, являются многовидовыми гибридами, обладают комплексной устойчивостью к наиболее вредоносным патогенам в сочетании с высокой пластичностью, о чем свидетельствует их районирование в разных регионах нашей страны. В статье представлены результаты молекулярного скрининга сортов и гибридов, созданных в разные годы в ЛенНИИСХ «Белогорка» и в ООО Селекционная фирма «ЛиГа». Молекулярный скрининг проведен с использованием 22 маркеров 14 *R*-генов устойчивости к вирусам PVY и PVX, к цистообразующим нематодам – *Globodera pallida* (патотипы Pa2, Pa3) и *G. rostochiensis* (патотип Ro1) и к фитофторозу. Данные молекулярно-генетического анализа сопоставлялись с результатами Государственного испытания сортов на устойчивость к болезням и с другими опубликованными источниками. В работе использованы также маркеры стерильных и фертильных типов цитоплазм. По результатам молекулярного скрининга выделены сорта и гибриды с разными сочетаниями маркеров *R*-генов (Ry_{sto}, $Ry\text{-}f_{sto}$, *Rx1*, *Rx2*, *Gro1-4*, *H1*, *Gpa2*, *R1*, *R3a*, *Rpi-blb1*, *Rpi-sto1*), обладающие D-, T-, W/gamma стерильными типами цитоплазм. Анализ фертильности пыльцы, результатов скрещиваний и данных родословных показал, что селекционерам удалось получить фертильные формы с D- и T-типами цитоплазм, несущие генетический материал мексиканских полиплоидных видов *Solanum stoloniferum* и *S. demissum*. Информация о наличии у гибридов и сортов маркеров *R*-генов и о типах цитоплазм, полученная в настоящей работе, позволит повысить эффективность дальнейших селекционных программ, в том числе направленных на пирамидирование генов устойчивости к патогенам. Данные молекулярного скрининга позволили уточнить родословные ряда сортов и гибридов, которые создавались на протяжении нескольких десятилетий.

Ключевые слова: *Solanum*; картофель; селекция; MAS; устойчивость к болезням; *R*-гены; типы цитоплазм; мужская стерильность.

Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation

T.A. Gavrilenko[1, 4] ✉, N.S. Klimenko[1], O.Yu. Antonova[1], V.A. Lebedeva[2, 3], Z.Z. Evdokimova[2], N.M. Gadjiyev[2, 3], O.V. Apalikova[1], N.V. Alpatyeva[1], L.I. Kostina[1], N.M. Zoteyeva[1], F.T. Mamadbokirova[4], K.V. Egorova[1, 4]

[1] Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia
[2] Leningrad Scientific Research Institute "Belogorka", Gatchinsky district, Leningrad region, Russia
[3] Ltd Breeding company "LiGa", Gatchinsky district, Leningrad region, Russia
[4] St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Increasing the resistance of varieties to diseases and pests is a priority in potato breeding. Many potato varieties created in the Leningrad Scientific Research Institute of Agriculture "Belogorka" are multi-species hybrids possessing complex resistance to the most spread pathogens in combination with a high plasticity, which determined their zoning in many regions of the Russian Federation. Potato varieties and hybrids created in different periods of time in this institute and in the Ltd Breeding company "LiGa" were included in marker-assisted selection with 22 markers of 14 *R* genes conferring extreme resistance to viruses PVY and PVX, resistance to cyst nematodes *Globodera pallida* (patotypes Pa2, Pa3) and *G. rostochiensis* (pathotype Ro1) and resistance to late blight. The data of molecular screening were compared with the results of the State Test of Varieties for Disease Resistance, as well as with other published sources. Markers of sterile and fertile cytoplasm types were also used in the study. Based on the results of molecular screening, varieties and hybrids with different combinations of markers of *R* genes conferring resistance to the most harmful pathogens (Ry_{sto}, $Ry\text{-}f_{sto}$, *Rx1*, *Rx2*, *Gro1-4*, *H1*, *Gpa2*, *R1*, *R3a*, *Rpi-blb1*, *Rpi-sto1*) were detected. Among them, genotypes with sterile D-, T-, W/gamma cytoplasmic types were selected. Analysis of their pollen fertility, crossability and pedigree data showed that breeders succeed in obtaining fertile forms with the D- and

Received 10.01.2017
Accepted for publication 19.10.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: tatjana9972@yandex.ru

T-types of cytoplasm carrying genetic material of Mexican polyploid species *Solanum stoloniferum* and *S. demissum*. The information about the presence of markers of *R* genes and about cytoplasm types of hybrids and varieties will allow an effective implementation of further breeding programs for resistance to a complex of pathogens, including pyramiding of *R* genes. The data of molecular screening made it possible to specify the pedigrees of several varieties and hybrids that have been created over several decades.

Key words: *Solanum*; potato breeding; MAS; diseases resistance; *R* genes; cytoplasmic types; male sterility.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Апаликова О.В., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Зотеева Н.М., Мамадбокирова Ф.Т., Егорова К.В. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Gavrilenko T.A., Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Lebedeva V.A., Evdokimova Z.Z., Gadjiyev N.M., Apalikova O.V., Alpatyeva N.V., Kostina L.I., Zoteyeva N.M., Mamadbokirova F.T., Egorova K.V. Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation . Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329 (in Russian)

Основными факторами, лимитирующими потенциальную урожайность картофеля в Северо-Западном регионе РФ, являются короткий вегетационный период, изменчивость погодных условий, повышенная влажность и связанные с этими факторами заболевания. Поэтому усилия селекционеров традиционно направлены на создание сортов картофеля ранней группы с высоким потенциалом продуктивности, с комплексной устойчивостью к неблагоприятным абиотическим факторам, заболеваниям и вредителям. Именно селекционеры северо-запада впервые в нашей стране создали сорта среднеранних сроков созревания, характеризующиеся горизонтальной устойчивостью к фитофторозу и экологической пластичностью, что стало большим успехом отечественной селекции.

Этот успех связан с именами двух выдающихся селекционеров – Е.А. Осиповой и Н.А. Лебедевой, которые не только создавали сорта, высокоадаптированные к условиям северо-запада и при этом востребованные во многих регионах нашей страны (Осипова, 1979, 1980, 1982), но и внесли большой вклад в развитие важных направлений в селекции картофеля – экспериментальную полиплоидию и многовидовую гибридизацию (Лебедева, 1961, 1963). Е.А. Осипова и Н.А. Лебедева были ученицами Сергея Михайловича Букасова, под руководством которого в ВИРе проводились приоритетные работы по изучению, систематизации и мобилизации генетических ресурсов картофеля. В свою очередь исследования Е.А. Осиповой и Н.А. Лебедевой были продолжены их учениками в Северо-Западном, а теперь Ленинградском НИИСХ «Белогорка». Усилиями селекционеров двух поколений созданы многовидовые гибриды с участием дикорастущих видов *Solanum acaule*, *S. berthaultii*, *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. vernei*, *S. verrucosum* и образцов культурных видов – *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, *S. phureja* (Гаджиев, Лебедева, 2010; Лебедева, 2010; Лебедева, Гаджиев, 2011; Евдокимова, Калашник, 2013, 2015, 2016) (Приложение 1)[1]. Целенаправленный отбор в чередующихся поколениях насыщающих скрещиваний многовидовых гибридов и в потомствах, полученных от их самоопыления, привел к созданию сортов, обладающих комплексом хозяйственно ценных признаков: среднеранних, высокоурожайных, с хорошим качеством клубней, устойчивых к грибным болезням (в том числе с высокой полевой устойчивостью к фитофторозу), бактериальным гнилям и ряду других заболеваний (Евдокимова, 2010; Лебедева, 2010; Гаджиев, Лебедева, 2014; Лебедева, Гаджиев, 2014–2016). Селекционерами северо-запада получен и первый российский нематодоустойчивый сорт – Гибрид 390, который, к сожалению, не был районирован, но дал начало ряду других сортов.

Многие гибриды и сорта, полученные Н.А. Лебедевой и Е.А. Осиповой, показали хорошую комбинационную способность и были использованы при создании современных поколений сортов, позволяющих решать новые селекционные задачи, связанные с распространением в северо-западной зоне РФ вирусных болезней и расширением площадей, зараженных золотистой картофельной нематодой (ЗКН) – *Globodera rostochiensis* (Груздева, Матвеева, 2010). На территории РФ встречается только один патотип *G. rostochiensis* – Ro1 (Хютти и др., 2017). Другой вид цистообразующих нематод – бледная картофельная нематода (*G. pallida*) в РФ не выявлен, однако существует потенциальная опасность проникновения этого вида на территорию нашей страны, поскольку *G. pallida* встречается во многих странах Европейского союза, включая и страны, граничащие с Северо-Западным регионом РФ (CABI/EPPO, 2015). В связи с этим актуальны исследования по молекулярному скринингу селекционного материала с маркерами *R*-генов, вовлеченных в контроль устойчивости к разным видам цистообразующих нематод.

На современном этапе селекционеры должны располагать базами данных, включающими не только результаты фенотипизации селекционного материала, но и информацию о наличии ДНК-маркеров, ассоциированных с генами и QTL, детерминирующими хозяйственно ценные признаки. За последние два десятилетия для картофеля разработаны многочисленные ДНК-маркеры, позволя-

[1] Приложения 1–3 см. по адресу:
http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx1.pdf

ющие проводить маркер-опосредованный отбор (MAS) перспективных генотипов (см. обзоры (Simko et al., 2007; Tiwari et al., 2012, 2013; Gebhardt, 2013; Ramakrishnan et al., 2015)) и широко применяющиеся в молекулярном скрининге исследователями разных стран (Flis et al., 2005; Gebhardt et al., 2006; Milczarek et al., 2011; Mori et al., 2011, 2012; Asano et al., 2012; Schultz et al., 2012; Бирюкова и др., 2015; Антонова и др., 2016; Asano, Tamiya, 2016; Зотеева и др., 2017; Клименко и др., 2017).

Информация о наличии в селекционном материале диагностических маркеров *R*-генов необходима в том числе для интенсификации работ по пирамидированию генов, контролирующих устойчивость к патогенам и другие ценные признаки. Наряду с этой информацией в последнее время большое значение придают и данным о типах цитоплазм у отбираемых для скрещиваний родительских форм (Mori et al., 2011, 2012; Sanetomo, Gebhardt, 2015; Зотеева и др., 2017). Hosaka, Sanetomo (2012) разработали набор ДНК-маркеров, с помощью которых идентифицировали шесть основных типов цитоплазм картофеля: A, D (W/alpha), M, P, T, W. Типы D, T и W/gamma относят к стерильным, при этом каждый из них отличается по фенотипическому проявлению признака мужской стерильности (Hosaka, Sanetomo, 2012). Случаи выявления фертильных форм при наличии стерильных типов цитоплазм связывают с наличием доминантных аллелей генов восстановления фертильности, например *Rt* (male fertility Restorer gene), и/или рецессивных аллелей ядерного гена *Ms* (Male sterility gene) (Анисимова, Гавриленко, 2017). Молекулярный скрининг зарубежных селекционных сортов картофеля показал, что практически все они обладают стерильными типами цитоплазм (Hosaka, Sanetomo, 2012; Sanetomo, Gebhardt, 2015). Так, подавляющее большинство старых европейских сортов, созданных в XIX – начале XX века, имеют тип T от чилийских аборигенных сортов, тогда как среди современного сортимента преобладают сорта с W/gamma и D-типами, полученными ими от образцов диких мексиканских видов картофеля – *S. stoloniferum* и *S. demissum* соответственно. Образцы этих диких видов вовлекают в селекцию в качестве источников устойчивости к Y вирусу картофеля (PVY) и к фитофторозу (Ross, 1986) и в скрещиваниях с *S. tuberosum* используют как материнские формы (реципрокные скрещивания не успешны) (Dionne, 1961; Janssen et al., 1997).

В данном исследовании представлены результаты молекулярного скрининга сортов и гибридов, созданных селекционерами ЛенНИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционная фирма «ЛиГа», выполненного с использованием маркеров *R*-генов, контролирующих устойчивость к важнейшим патогенам, а также маркеров фертильных и стерильных типов цитоплазм картофеля. Полученная информация позволила также уточнить родословные сортов и гибридов, многие из которых создавались на протяжении нескольких десятилетий.

Материал и методы исследования

Материалом для исследований послужили 33 сорта, созданных селекционерами ЛенНИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционная фирма «ЛиГа» начиная с 1960-х гг. по настоящее время: Алый парус, Арина, Балтийский, Белогорский ранний, Вдохновение, Весна белая, Гатчинский, Гусар, Даная, Евразия, Елизавета, Жемчужина, Загадка Питера, Лига, Ломоносовский, Майский цветок, Наяда, Невский, Очарование, Оредежский, Памяти Осиповой, Петербургский, Рождественский, Русская красавица, Сиреневый туман, Сказка, Снегирь, Столовый 19, Сударыня, Суйдинский ранний, Холмогорский, Чародей, Чароит. Некоторые сорта не были включены в производство, однако активно использовались в скрещиваниях для получения нового селекционного материала. Помимо сортов в выборку вошли шесть гибридов, в разное время созданных селекционерами ЛенНИИСХ «Белогорка» (см. Приложение 1).

Выделение ДНК. Материал для выделения ДНК был получен из двух источников: полевой коллекции ВИР и из учреждений-оригинаторов – Ленинградского НИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционная фирма «ЛиГа». ДНК выделяли из листьев растений с использованием модифицированного нами метода CTAB-экстракции (Gavrilenko et al., 2013). В случае необходимости очистку препаратов от полифенольных соединений проводили с помощью поливинилполипирролидона.

Маркер-опосредованный отбор (MAS) проводился с использованием CAPS-, SCAR- и STS-маркеров, ассоциированных с *R*-генами, детерминирующими устойчивость к вирусам PVYи PVX, к цистообразующим нематодам *G. pallida* (патотипы Pa2 и Pa3) и *G. rostochiensis* (патотип Ro1), а также к фитофторозу (табл. 1). Для работы были отобраны как аллель-специфичные, так и тесно сцепленные с *R*-генами маркеры, наиболее часто применяемые в селекционных программах.

Типы цитоплазм сортов картофеля (A, M, D, P, T, W) определяли с помощью набора праймеров, предложенного Hosaka, Sanetomo (2012) (табл. 2).

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг тотальной ДНК, 1× реакционный буфер («Диалат», Москва), 2.5 мМ $MgCl_2$, по 0.6 мМ каждого из dNTPs, по 0.2 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Taq-полимеразы («Диалат», Москва). Протоколы и температуры отжига соответствовали указанным разработчиками праймеров (см. табл. 1 и 2). В ряде случаев программы молекулярного скрининга были оптимизированы нами путем введения функции TouchDown. Все реакции при работе со SCAR-маркерами осуществляли не менее чем в трех повторностях.

Для CAPS-маркеров использовали ферменты фирмы «СибЭнзим»; рестрикцию проводили в течение ночи согласно протоколам фирмы-изготовителя. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2 % агарозных гелях в буфере TBE с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

При молекулярном скрининге в выборку были включены дополнительные образцы, для которых наличие определенных маркеров описано в литературе. Для генов нематодоустойчивости *H1* и *Gro1-4* положительными контролями служили соответственно сорт Sante и клон i-144844 образца k-12403 *S. gourlayi* (Limantseva et al., 2014). Для генов, контролирующих устойчивость к вирусам, использовали сорта: Amado и Ania – для Ry_{sto} (Song, Schwarzfischer, 2008; Valkonen et al., 2008), Saikai 35 – для

Table 1. DNA markers used in molecular screening

Gene	Chromosome	Source of the alien gene in the breeding material according to literature	Marker	T°m	Diagnostic fragment (bp)	Reference
			Potato virus Y			
Ry$_{sto}$	XII	sto	YES3-3A	55	341	Song, Schwarzfischer, 2008
Ry-f$_{sto}$	XII	sto	GP122-406/EcoRV	52	406	Flis et al., 2005; Valkonen et al., 2008
Ry$_{adg}$	XI	adg	RYSC3	60	321	Kasai et al., 2000
Ry$_{chc}$	IX	chc	Ry364	55	298	Mori et al., 2012
			Potato virus X			
Rx1	XII	adg	PVX	58	1230	Ohbayashi et al., 2010; Mori et al., 2011
			CP60/DdeI	58	350	Bendahmane et al., 1997; Gebhardt et al., 2006
			5Rx1	62	186	Ahmadvand et al., 2013
Rx2	V	acl	106Rx2	66	543	»
			G. pallida (pathotypes Pa2, Pa3)			
Gpa2	XII	adg	Gpa2-1	60	1120	Asano et al., 2012
			Gpa2-2	60	452	»
			G. pallida (pathotypes Pa2, Pa3) и *G. rostochiensis* (pathotype Ro5)			
Grp1	V	Неизвестен	TG432/RsaI	66	1900	Asano et al., 2012
			G. rostochiensis (pathotypes Ro1 and Ro4)			
H1	V	adg	57R	60	450	Schultz et al., 2012
			TG 689	55	141	Milczarek et al., 2011
			N146	55	506	Takeuchi et al., 2008; Mori et al., 2011
			N195	55	337	
			239E4left/AluI	51	120+230	Bakker et al., 2004
Gro1-4	VII	spg	Gro1-4	58	602	Gebhardt et al., 2006
			Phytophthora infestans			
QTL R1	V	dms	R1	65	1400	Ballvora et al., 2002; Mori et al., 2011
R3a	XI	dms	RT-R3a	56	982	Huang et al., 2005
Rpi-sto1	VIII	sto	Rpi-sto1	65	890	Zhu et al., 2012
Rpi-blb1	VIII	blb	blb1F/R	58	821	Wang et al., 2008
			1/1′	50	213	Colton et al., 2006

T_m, annealing temperature. Three-letter species notation: adg, *S. tuberosum* ssp. *andigenum*; acl, *S. acaule*; blb, *S. bulbocastanum*; chc, *S. chacoense*; dms, *S. demissum*; spg, *S. spegazzinii*; sto, *S. stoloniferum*; tbr, *S. tuberosum*; ver, *S. verrucosum*.

Table 2. Varieties and hybrids with genetic material of S. stoloniferum detected in molecular screening

Locus	Organelle	Marker	Primer	T°m	Restrictase	Reference
ndhC/trnV	хл	T	H1	55	–	Hosaka, 2003; Hosaka, Sanetomo, 2012
rps16/trnQ	хл	S	NTCP6	58	–	Bryan et al., 1999; Hosaka, Sanetomo, 2012
cemA	хл	SAC	SAC	60	BamHI	Hosaka, Sanetomo, 2012
rpl32/ccsA	хл	A	A	60	BamHI	»
rps 10	мт	ALM4/5	ALM4/5	55	–	Lössl et al., 2000; Hosaka, Sanetomo, 2012
Band1	мт	D	Band1-F11/R6	60	–	Hosaka, Sanetomo, 2012

Ry_{chc} (Mori et al., 2011), Эффект – для Ry_{adg} (Бирюкова и др., 2015), Cara и Sante – для *Rx1*, сорт White Lady – для *Rx2* (Ahmadvand et al., 2013).

Данные молекулярного скрининга сопоставлялись с результатами Государственного испытания сортов на устойчивость к *G. rostochiensis* (патотип Ro1) (http://reestr.gossort.com/) и с данными каталогов сортов разных лет об устойчивости сортов к вирусным болезням, а также с другими опубликованными источниками.

Секвенирование ДНК. Продукты амплификации выделяли из ПЦР-смеси с помощью наборов фирмы «Евроген» и секвенировали по методу Сенгера в ЦКП «Геномные технологии и клеточная биология» (ВНИИСХМ). В качестве референсных использовали последовательность AY426259.1 гена *Rpi-blb1* дикого вида *S. bulbocastanum* (van der Vossen et al., 2003) и гомологичную последовательность EU884422.1 гена *Rpi-sto1 S. stoloniferum* (Vleeshouwers et al., 2008). Выравнивание полученных последовательностей и их анализ проводили с помощью программы MEGA Version 7.0.

Изучение полевой устойчивости листьев к фитофторозу. Многолетние данные по устойчивости к фитофторозу, полученные авторами сортов, были дополнены результатами изучения, проведенного в 2016 и 2017 гг. на экспериментальном поле ВИР (г. Пушкин, Ленинградская область). Оценку проводили методом, описанным в Sieczka (2001). Полевые наблюдения осуществляли каждые пять дней с начала появления инфекции на контрольных неустойчивых сортах по 9-балльной шкале, где 9 – отсутствие симптомов болезни, 1 – целиком пораженное растение. В качестве стандартов использовали растения межвидового гибрида NZ-2010-N6-17 (высокоустойчивый), а также сортов Аврора (умеренно устойчивый) и Dorisa (чувствительный). Полевые сезоны 2016 и 2017 гг. характеризовались сильным распространением инфекции *Phytophthora infestans*, близким к эпифитотии, чему способствовало обильное выпадение осадков, значительно превышавшее многолетние нормы. Появление симптомов фитофтороза на растениях в оба года отмечали в начале июля. Распространение инфекции происходило интенсивно, и уже к концу июля было поражено более половины сортов коллекции ВИР. В этой связи данные проведенной оценки фитофтороустойчивости растений в 2016 и 2017 гг. можно рассматривать как высокодостоверные.

Оценка фертильности сортов и гибридов. Фертильность пыльцы оценивали ацетокарминовым методом (Паушева, 1988), подсчитывая не менее 300 пыльцевых зерен на образец. Препараты окрашенных пыльцевых зерен анализировали под световым микроскопом Axio Scope A1 (ZEISS, Германия) при увеличении ×200. Кроме того, проводили оценку скрещиваемости образцов, используя в качестве опылителей сорта с разными типами цитоплазм.

Результаты и обсуждение

MAS с маркерами *R*-генов, детерминирующих устойчивость к Y и X вирусам картофеля

PVY и PVX – наиболее распространенные и вредоносные вирусы, поражающие картофель. Одним из эффективных и экологически безопасных методов защиты возделываемого картофеля от разных штаммов этих вирусов является интрогрессия в селекционный материал *R*-генов сверхустойчивости (extreme resistance – ER), доминантные аллели которых ингибируют развитие патогенов в инфицированных тканях растений (Solomon-Blackburn, Barker, 2001). В результате межвидовой гибридизации в селекционный материал от диких и культурных видов картофеля были перенесены следующие гены ER-устойчивости к PVY и PVX: Ry_{chc} (IX) – от *S. chacoense*, Ry_{sto} и $Ry\text{-}f_{sto}$ (картированные в одном и том же районе хромосомы XII) – от *S. stoloniferum*, Ry_{adg} (XI) и *Rx1* (XII) – от *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, *Rx2* (V) – от *S. acaule* (см. обзоры (Simko et al., 2007; Tiwari et al., 2012; Gebhardt, 2013; Ramakrishnan et al., 2015)). В настоящем исследовании использовано восемь маркеров, ассоциированных с этими генами.

MAS с маркерами генов Ry_{sto}, $Ry\text{-}f_{sto}$, Ry_{chc}, Ry_{adg}. Маркеры YES3-3A$_{341}$ и GP122-406/EcoRV$_{406}$, тесно сцепленные с генами Ry_{sto} и $Ry\text{-}f_{sto}$, были детектированы только у двух сортов – Гусар и Сударыня (см. Приложение 1) и у контрольного сорта Amado. Маркеры двух других генов – Ry_{adg} и Ry_{chc}, контролирующих ER-устойчивость к PVY, в анализируемой выборке выявлены не были, за исключением контрольных сортов Эффект и Saikai 35 соответственно.

MAS с маркерами гена *Rx2*, интрогрессированного в сорта от *S. acaule*. Диагностический фрагмент маркера 106Rx2 (543 п. о.) был обнаружен у контрольного сорта White Lady и у образцов анализируемой выборки: Гусар, Евразия, Русская красавица, 1101/10, Майский цветок, Наяда, Очарование, Сказка, Чародей, Чароит, гибрид vrn × гибрид 390 (см. Приложение 1). Согласно информации о родословных, *S. acaule* участвовал в создании многих сортов и гибридов, однако корреляции между детекцией маркера 106Rx2$_{543}$ и наличием *S. acaule* в родословных не выявлено.

MAS с маркерами гена *Rx1*. У обоих контрольных сортов Cara и Sante, имеющих доминантный аллель гена *Rx1*, были выявлены диагностический фрагмент аллель-специфичного маркера 5Rx1 (186 п. о.) и CAPS-маркер CP60/DdeI$_{350}$, который находится на расстоянии 0.02 сМ от гена *Rx1* (XII) (Rouppe van der Voort et al., 1999). Маркер PVX амплифицировался только у сорта Sante (в двух из трех проведенных повторностей). Кроме нестабильной амплификации, маркер PVX проявлял недостаточную специфичность, поскольку был выявлен и у сорта White Lady, несущего доминантный аллель гена *Rx2*.

В пределах изучаемой выборки результаты молекулярного скрининга с маркерами 5Rx1 и PVX полностью совпали (см. Приложение 1). Эти маркеры были детектированы у пяти сортов: Алый парус, Даная, Оредежский, Сиреневый туман, Чароит. Отметим, что у каждого из них в родословных участвовали зарубежные сорта – либо иммунные (Saco – у сорта Чароит, Saphir – у сорта Оредежский), либо высокоустойчивые к вирусу X (Latona – у сорта Сиреневый туман, Omega – у сорта Даная, Latona и Omega – у сорта Алый парус).

Диагностический фрагмент CP60/DdeI$_{350}$ был обнаружен у 10 образцов: сортов Белогорский ранний, Даная, Евразия, Гусар, Лига, Наяда, Чароит и гибридов 1101/10,

2103/7 и 211/9 (см. Приложение 1). Только у двух сортов – Даная и Чароит – одновременно детектированы все три маркера гена *Rx1* (CP60/DdeI, PVX, 5Rx1). Результаты MAS с CAPS-маркером CP60/DdeI представляются менее надежными, следует учитывать, что эффективность использования данного маркера может быть снижена из-за рекомбинационных событий.

У сорта Чароит одновременно выявлены доминантные аллели обоих генов – *Rx1* и *Rx2*, детерминирующих сверхустойчивость к PVX.

MAS с маркерами генов устойчивости к цистообразующим нематодам

Информация о наличии в селекционном материале маркеров генов устойчивости к цистообразующим нематодам – объектам внутреннего и внешнего карантина, имеет особое значение, поскольку возможности проведения отбора устойчивых к этим патогенам генотипов с использованием фитопатологических методов ограничены.

MAS с маркерами гена *Gpa2*. Аллельный состав гена *Gpa2*, контролирующего устойчивость к бледной картофельной нематоде (патотипы Pa2, Pa3), проанализирован с использованием двух аллельспецифичных маркеров – Gpa2-1 и Gpa2-2, разработанных Asano et al. (2012). Результаты скрининга для обоих маркеров в целом совпадали: доминантный аллель гена *Gpa2* имели только пять из 33 сортов. Оба маркера – Gpa2-1 и Gpa2-2 обнаружены у сортов Даная, Оредежский, Сиреневый туман, Чароит. У сорта Алый парус выявлен только маркер Gpa2-2 (см. Приложение 1).

MAS с маркерами генов *Gro1-4* и *H1*. Маркеры генов *Gro1-4* и *H1*, детерминирующих устойчивость растений к *G. rostochiensis* (патотипы Ro1 и Ro4), были использованы нами ранее (Антонова и др., 2016; Клименко и др., 2017) в молекулярном скрининге более чем 200 отечественных сортов, созданных в различных селекционных центрах нашей страны; в эту выборку входили и некоторые сорта селекции ЛенНИИСХ «Белогорка». Результаты настоящей работы в целом подтверждают опубликованные нами данные. Однако для двух сортов – Ломоносовский и Рождественский – результаты молекулярного скрининга с маркерами гена *H1* (см. Приложение 1) отличались от полученных ранее (Антонова и др., 2016), что связано с повторным привлечением в MAS материала, прошедшего в 2017 г. дополнительную верификацию по морфологическим признакам.

Суммарно из 39 образцов выборки 15 обладают доминантным аллелем гена *H1*, два (сорт Сударыня и гибрид 1604/16) имеют доминантные аллели обоих генов *H1* и *Gro1-4*, у оставшихся 22 генотипов не выявлено ни одного маркера этих генов (см. Приложение 1).

Сопоставление результатов MAS с данными Государственного испытания сортов на устойчивость к *G. rostochiensis* (патотип Ro1) показало, что все изученные образцы с маркерами гена *H1* относятся к нематодоустойчивым, а у сортов, поражаемых *G. rostochiensis*, эти маркеры отсутствовали.

Два сорта – Алый парус и Даная – одновременно несут доминантные аллели генов *H1* и *Gpa2*, детерминирующих устойчивость к двум видам цистообразующих нематод – *G. rostochiensis* (патотипы Ro1, Ro4) и *G. pallida* (патотипы Pa2, Pa3) соответственно.

Дополнительно изучали наличие у образцов выборки маркера TG432/RsaI$_{1900}$ гена *Grp1*, детерминирующего устойчивость к обоим видам цистообразующих нематод – *G. pallida* (патотипы Pa2, Pa3) и *G. rostochiensis* (патотип Ro5) (Finkers-Tomczak et al., 2009). Диагностический фрагмент маркера TG432/RsaI – 1900 п. о. – был выявлен у сортов Оредежский и Сиреневый туман, имеющих и маркеры гена *Gpa2*, однако отсутствовал у других сортов с маркерами этого гена (Алый парус, Даная, Чароит). В то же время маркер TG432/RsaI$_{1900}$ был детектирован у сортов Лига, Загадка Питера и Чародей, у которых маркеры Gpa2-1 и Gpa2-2 отсутствовали.

MAS с маркерами генов устойчивости к фитофторозу

Известно большое число генетических факторов, вовлеченных в контроль устойчивости растений картофеля к фитофторозу (Simko et al., 2007; Tiwari et al., 2013; Ramakrishnan et al., 2015; Haverkort et al., 2016). В нашей работе использованы маркеры лишь нескольких генов (см. табл. 1), которые, согласно литературным данным, могли быть интрогрессированы в селекционный материал от мексиканских полиплоидных видов *S. stoloniferum* и *S. demissum*, принимавших участие в создании большинства изученных сортов (см. Приложение 1).

MAS с маркерами генов *R1* и *R3a* расоспецифичной устойчивости к *P. infestans*. Маркеры генов *R1* и/или *R3a* были выявлены у 28 образцов изученной выборки, за исключением сортов Алый парус, Весна белая, Гатчинский, Евразия, Жемчужина, Майский цветок, Русская красавица, Столовый 19, Холмогорский и гибрида 2103/7 (см. Приложение 1).

MAS с маркерами генов *Rpi-sto1* и *Rpi-blb1* устойчивости к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза. Маркер Rpi-sto1 (ген *Rpi-sto1*) обнаружен у трех сортов (Балтийский, Евразия, Сударыня) и двух гибридов – 1604/16 и 1101/10. Одновременно у этих образцов был выявлен и маркер blb1F/R (см. Приложение 1). У всех пяти образцов с маркерами Rpi-sto1 и blb1F/R в родословных присутствует гибрид 8889/3 (или его потомки – 943/6 и 943/9), созданный с участием *S. stoloniferum* (табл. 3, Приложение 2). Анализ нуклеотидных последовательностей ампликонов, полученных с праймерами blb1F/R у сортов Евразия, Сударыня и гибридов 1101/10, 1604/16, показал их 100 % идентичность соответственному участку референсных последовательностей AY426259.1 и EU884422.1. Результаты дополнительной ПЦР с праймерами 1/1′ показали наличие у всех пяти образцов последовательности 18 п. о., характерной для активной копии гена *Rpi-blb1* (*RB*) (Colton et al., 2006). У сортов, полученных на основе других межвидовых гибридов с *S. stoloniferum*, маркеры Rpi-sto1 и blb1F/R не выявлены.

Как известно, гены *Rpi-blb1* и *Rpi-sto1* являются ортологами, их последовательности высоко гомологичны (van der Vossen et al., 2003; Wang et al., 2008). Поэтому представляется вероятным, что маркер, разработанный для гена *Rpi-blb1* у мексиканского вида *S. bulbocastanum*, одновременно детектирует и ген *Rpi-sto1*.

Оценка полевой устойчивости сортов к фитофторозу

Среди сортов, находившихся в двухлетнем изучении (2016–2017) в условиях сильного распространения инфекции *P. infestans*, к концу периода вегетации фактически не имели симптомов поражения фитофторозом Балтийский, Очарование и Сударыня. Слабые симптомы болезни в эти сроки отмечены на растениях сортов Арина, Гусар, Русская красавица и Сказка (устойчивость от 7.0 до 6.0 баллов). Умеренно устойчивыми были растения сортов Елизавета, Жемчужина, Наяда, Памяти Осиповой, Рождественский, Чародей, Евразия, Белогорский ранний, Гатчинский с оценкой от 5.9 до 5.0 баллов.

Практически все эти сорта (за исключением Гатчинского и Русской красавицы) имели маркеры генов *R1*, *R3a* и/или *Rpi-sto1*, *Rpi-blb1*, однако их устойчивость может быть обусловлена и другими генами, которые не были включены в MAS.

Остальные сорта оценивали как восприимчивые (от 1 до 4 баллов). Среди восприимчивых сильное поражение ботвы, оцениваемое от 1 до 3 баллов, отмечено у сортов Весна белая, Даная, Лига и Холмогорский.

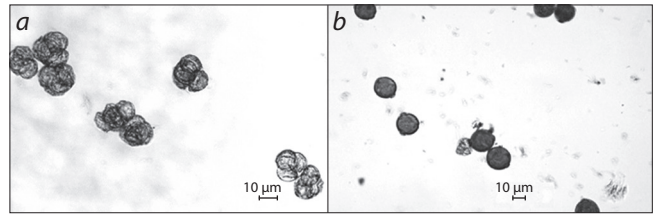
MAS с маркерами разных типов цитоплазм. Определение фертильности пыльцы у сортов и гибридов

Согласно результатам молекулярного скрининга с маркерами из набора (Hosaka, Sanetomo, 2012), в анализируемой выборке не обнаружены образцы с фертильными P- и A-типами цитоплазм. У 39 образцов были выявлены разные типы стерильных цитоплазм: у 9 образцов – T, у 26 – D и у 4 образцов – W/gamma-тип (см. Приложение 1). Однако среди сортов с D- и T-типами цитоплазм были выделены генотипы с высоким уровнем фертильности пыльцы (см. Приложение 1). Часть из них можно отнести к эффективным опылителям – высокий показатель завязываемости ягод с большим числом семян отмечен в контролируемых скрещиваниях при использовании в качестве опылителей сортов с D- (Алый Парус, Наяда, Русская красавица, Сиреневый туман, Чародей, Чароит) и T- (Балтийский и Вдохновение) типами цитоплазм. Можно предполагать наличие у этих сортов доминантных аллелей генов восстановления фертильности (Анисимова, Гавриленко, 2017).

Все генотипы с W/gamma-типом цитоплазмы (Гусар, Евразия, Сударыня, гибрид 1604/16) проявляли мужскую стерильность. Только у них обнаружена «тетрадная стерильность», когда распада тетрад не наблюдается и микроспоры не освобождаются из тетрад (см. рисунок, *a*). В результате принудительного самоопыления ягодообразование на растениях этих образцов не наблюдалось, и в дальнейших скрещиваниях они используются только как материнские формы.

Анализ родословных сортов

Многие сорта и гибриды анализируемой выборки создавались на протяжении нескольких десятилетий (до 40 лет), поэтому в ряде случаев информация о родословных требовала уточнений. Совместное использование маркеров разных типов цитоплазм и маркеров *R*-генов позволяет



Pollen pubescence in (*a*) sterile and (*b*) fertile plants:
(*a*) Tetrad sterility in hybrid 1604/16 (W/gamma cytoplasm); (*b*) Stained pollen in hybrid 1101/10 (D cytoplasm).

прояснить родословные сортов, а также определить доноров *R*-генов и доноров разных типов цитоплазм.

Как отмечалось выше, образцов с фертильным P-типом цитоплазмы в анализируемой выборке не обнаружено. Такой результат был неожиданным, поскольку, согласно данным авторов сортов Алый парус, Вдохновение, Загадка Питера, Лига, Русская красавица, Сиреневый туман, Снегирь, Чародей, по материнской линии эти сорта ведут свое начало от тетраплоидного образца 175-13 *S. phureja* – диплоидного культурного вида, для которого характерен фертильный P-тип цитоплазмы (P-тип пластид и beta-тип митохондрий (Hosaka, Sanetomo, 2012, 2014)). Соответственно, у потомков *S. phureja* по материнской линии также предполагалось наличие цитоплазмы P-типа (см. Приложение 2, сорт Вдохновение). Однако перечисленные выше восемь сортов имели либо D-, либо T-тип цитоплазмы (см. Приложение 1).

Анализ ДНК образца 175-13 *S. phureja*, выделенной из семян, хранившихся более 50 лет, показал отсутствие у него P-типа цитоплазмы. Пластиды относились к W-типу, мтДНК амплифицировать не удалось.

Сорта с генетическим материалом *S. stoloniferum*. Согласно литературным данным, W/gamma-тип и ассоциированная с ним тетрадная стерильность встречаются у европейских сортов, созданных на основе лишь нескольких образцов мексиканского вида *S. stoloniferum*, образцы которого являлись источником сверхустойчивости к PVY и в начальных скрещиваниях выступали в роли материнских форм. В свою очередь, использование в дальнейшем селекционном процессе иммунных к PVY сортов и гибридов с геном Ry_{sto} привело к широкому распространению среди европейских сортов стерильной цитоплазмы W/gamma-типа (Lössl et al., 2000; Song, Schwarzfischer, 2008; Sanetomo, Gebhardt, 2015). В то же время W/gamma-тип цитоплазмы среди коллекционных образцов *S. stoloniferum* встречается не часто, более распространен у них D-тип (Sanetomo, Hosaka, 2013). Среди образцов *S. stoloniferum* с D-типом цитоплазмы удалось выделить фертильные генотипы, которые в межвидовых скрещиваниях проявляли себя как эффективные опылители (Зотеева и др., 2017).

В родословных большинства (27 из 39) образцов анализируемой выборки также участвовал *S. stoloniferum* (см. Приложение 1), однако W/gamma-тип обнаружен лишь у сортов Гусар, Евразия, Сударыня и у гибрида 1604/16. Ядерные маркеры генов *S. stoloniferum* – Ry_{sto} и $Ry\text{-}f_{sto}$ – детектированы у сортов Гусар и Сударыня, маркеры

Table 3. Varieties and hybrids with genetic material from *S. stoloniferum* detected by molecular screening

Variety or hybrid	Cytoplasm type	Markers of *R* genes detected in molecular screening in the analyzed accessions				Parental forms (cytoplasm type)	
		YES3-3A/Ry_{sto}	GP122-406/$Ry\text{-}f_{sto}$	Rpi-sto1/*Rpi-sto1*	blb1/*Rpi-blb1*	♀	♂
Gusar	W/gamma	+	+	–	–	Arosa (W/gamma)	Vdokhnovenie (T)
Sudarynya	W/gamma	+	+	+	+	89181/6	8889/3
Evraziya	W/gamma	–	–	+	+	95100/27	943/9 (T)
1604/16	W/gamma	–	–	+	+	95100/27	943/6 (T)
1101/10	D	–	–	+	+	Чародей (D)	943/6 (T)
Baltiyskiy (=943/9)	T	–	–	+	+	Ласунак	8889/3

Hybrid 8889/3 was derived from species adg, dms, and sto (Evdokimova, Kalashnik, 2013). It is parental to hybrids 943/6 and 943/9. Hybrid 95100/27 was derived from species adg, dms, and sto. Hybrid 68(65)-8 was derived from species dms, sto, and tbr.

Rpi-sto1 и blb1F/R – у Сударыня, Евразия, Балтийский и у гибридов 1604/16 и 1101/10 (см. табл. 3, Приложения 1 и 2). Анализ родословных показал, что перечисленные выше образцы являются потомками разных (с мужской стерильностью и фертильностью) межвидовых гибридов и сортов, созданных на основе *S. stoloniferum*, которые использовались в скрещиваниях или как материнские, или как отцовские формы (см. табл. 3, Приложения 2 и 3). Информация родословных подтверждает передачу по материнской линии стерильного типа цитоплазмы W/gamma от *S. stoloniferum* сортам Гусар, Евразия и гибриду 1604/16 (см. табл. 3). Так, материнской формой сорта Гусар был немецкий сорт Arosa, который послужил донором признака мужской стерильности W/gamma-типа. В свою очередь сорту Arosa W/gamma-тип был передан от материнской формы – клона MPI 54.4129/288(208), происходящего от гибрида *S. stoloniferum* × Erika (см. Приложение 3). Наличие у сорта Arosa маркера YES3-3A, сцепленного с геном Ry_{sto}, было показано ранее (Song, Schwarzfischer, 2008), и, согласно нашим данным, этот маркер был унаследован сортом Гусар. От своей отцовской формы – сорта Вдохновение – Гусар получил доминантные аллели генов *H1* и *R1*.

Гибрид 1604/16 и сорт Евразия были отобраны в комбинациях скрещиваний, в которых материнской формой был иммунный к PVY немецкий сорт Barbara (W/gamma-тип), донором стерильной W/gamma-цитоплазмы которого, в свою очередь, послужил клон MPI 64.956/68, происходящий от гибрида *S. stoloniferum* × Frühmolle (см. Приложение 2). У сорта Barbara были выявлены маркеры YES3-3A и YES3-3B гена Ry_{sto} (Song, Schwarzfischer, 2008) и CAPS-маркер GP122/EcoRV гена $Ry\text{-}f_{sto}$ (Flis et al., 2005). Однако гены сверхустойчивости к PVY не были переданы от сорта Barbara ни гибриду 1604/16, ни сорту Евразия. В то же время оба эти образца имели маркер Rpi-sto1 (см. табл. 3, Приложение 3).

Нам не удалось включить в MAS сорт Barbara, однако мы проанализировали ряд немецких сортов (Forelle, Kuba, Kuras, Maxi), имеющих общее происхождение с Barbara (Song, Schwarzfischer, 2008). Ни у одного из них маркер Rpi-sto1 (как и маркер blb1F/R) не обнаружен. Поэтому мы полагаем, что маркеры Rpi-sto1 и blb1F/R в анализируемом материале получены от гибридов 8889/3 и 943/9, созданных с участием *S. stoloniferum* и использованных в скрещиваниях в качестве опылителей. Именно поэтому сорта и гибриды, выведенные с их участием, несут разные типы цитоплазм (W/gamma, D, T), которые соответствуют цитоплазме различных материнских форм (см. табл. 3, Приложение 2).

Сорта с генетическим материалом *S. demissum*. У 26 из 39 образцов был выявлен D-тип цитоплазмы, характерный для вида *S. demissum*. Как известно, этот тип был интрогрессирован в селекционные сорта от *S. demissum* вместе с *R*-генами расоспецифической устойчивости к фитофторозу *R1–R11* (Ross, 1986; Sanetomo, Hosaka, 2013; Tiwari et al., 2013; Haverkort et al., 2016).

В анализируемой выборке фактически все сорта и гибриды с D-типом цитоплазмы также являются производными от *S. demissum* или от сортов, выведенных на основе этого вида (см. Приложение 1). Подавляющее большинство из них (18 из 26) имеют маркеры генов расоспецифической устойчивости к фитофторозу – *R1*, *R3a*. У сортов Весна белая, Русская красавица, Холмогорский генов *R1*, *R3a* не выявлено, однако участие в их создании *S. demissum* подтверждается наличием у них D-типа цитоплазмы.

Присутствие маркеров генов *R1* и/или *R3a* у семи сортов с T-типом цитоплазмы (см. Приложение 1) можно объяснить тем, что донорами данных генов в их родословных выступили фертильные формы с цитоплазмой D-типа, использованные в качестве опылителей, например гибриды 68(65) и 1101/10 (см. рисунок, *б*). Это является дополнительным доказательством встречаемости растений с мужской фертильностью среди образцов с D-типом цитоплазмы.

Заключение

В Государственный реестр селекционных достижений 2017 г. входят 26 сортов, возделываемых на северо-западе РФ и в других регионах нашей страны, которые были выведены в разные годы селекционерами ЛенНИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционная фирма «ЛиГа». Наряду с устойчивостью к важнейшим патогенам, эти сорта обладают хорошей формой клубней, поверхностными глазками и отличными вкусовыми качествами (Государственный реестр…, 2017).

Генетически разнообразные сорта и гибриды, созданные на основе многовидовой гибридизации, обладают доминантными аллелями генов устойчивости к важнейшим патогенам. Важно отметить, что селекционерам удалось получить фертильные гибриды и сорта, несущие генетический материал мексиканских полиплоидных видов – *S. stoloniferum* и *S. demissum* (например, гибриды 8889/3, 68(65)-8, 943/6, 943/9). Использование в скрещиваниях гибридов с мексиканскими полиплоидными видами не только в качестве материнских форм, но и одновременно в качестве опылителей, увеличило вероятность интрогрессии в селекционный материал генетического материала *S. stoloniferum* и *S. demissum*. Отметим, что в большинстве зарубежных селекционных программ эти дикие виды и их гибриды применялись в качестве материнских форм (Dionne, 1961; Janssen et al., 1997).

Информация о наличии у гибридов и сортов маркеров генов устойчивости к разным патогенам и о типах цитоплазм позволит эффективно реализовывать дальнейшие селекционные программы, в том числе направленные на пирамидирование *R*-генов. Наиболее перспективны для дальнейшего селекционного процесса следующие сорта и гибриды:

– сорта Алый парус и Даная обладают доминантными аллелями генов *H1* и *Gpa2*, детерминирующих устойчивость к обоим видам цистообразующих нематод – *G. rostochiensis* (патотип Ro1) и *G. pallida* (патотипы Pa2, Pa3) соответственно, а также доминантным аллелем гена *Rx1* (сверхустойчивость к PVX). Гены *Gpa2* и *Rx1* картированы на хромосоме XII в одном и том же локусе (van der Vossen et al., 2000), что увеличивает вероятность их совместной передачи потомству;
– сорта Гусар и Сударыня несут маркеры генов устойчивости к вирусам PVY (Ry_{sto}, $Ry\text{-}f_{sto}$) и PVX (Гусар), а также обладают доминантными аллелями генов устойчивости к *G. rostochiensis* (патотип Ro1);
– выделены генотипы с маркерами генов *Rpi-sto1*, *Rpi-blb1*; планируются дальнейшие комплексные исследования, в том числе анализ расщепляющихся популяций, полученных на основе выделенного материала.

Сорта Гусар, Сударыня, гибрид 1604/16 в дальнейших скрещиваниях могут использоваться только в качестве материнских форм, тогда как сорт Алый парус и гибрид 1101/10 – также в качестве опылителей.

Acknowledgments
This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-16-04125.

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest.

References
Ahmadvand R., Wolf I., Gorji A.M., Polgár Z., Taller J. Development of molecular tools for distinguishing between the highly similar *Rx1* and *Rx2* PVX extreme resistance genes in tetraploid potato. Potato Res. 2013;56(4):277-291. DOI 10.1007/s11540-013-9244-y.

Anisimova I.N., Gavrilenko T.A. Cytoplasmic male sterility and prospects for its utilization in breeding, genetic studies and seed production of potato. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017,21(1):83-95. DOI 10.18699/VJ17.226.

Antonova O.Y., Shvachko N.A., Novikova L.Y., Shuvalov O.Y., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and near-abroad countries based on polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance *R*-genes. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ16.181 (in Russian)

Asano K., Kobayashi A., Tsuda S., Nishinaka M., Tamiya S. DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. Breed. Sci. 2012;62(2):142-150. DOI 10.1270/jsbbs.62.142.

Asano K., Tamiya S. Breeding of pest and disease resistant potato cultivars in Japan by using classical and molecular approaches. JARQ. 2016;50(1):1-6.

Bakker E., Achenbach U., Bakker J., Vliet J., Peleman J., Segers B., Heijden S., Linde P., Graveland R., Hutten R., Eck H., Coppoolse E., Vossen E., Bakker J., Goverse A. A high-resolution map of the *H1* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Theor. Appl. Genet. 2004;109:146-152. DOI 10.1007/s00122-004-1606-z.

Ballvora A., Ercolano M.R., Weiss J., Meksem K., Bormann C.A., Oberhagemann P., Salamini F., Gebhardt C. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. Plant J. 2002; 30:361-371. DOI 10.1046/j.1365-313X.2001.01292.x.

Bendahmane A., Kanyuka K., Baulcombe D.C. High-resolution genetical and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. Theor. Appl. Genet. 1997;95:153-162. DOI 10.1007/s001220050543.

Biryukova V., Shmyglya I., Abrosimova S., Zapekina T., Meleshin A., Mityushkin A., Manankov V. Molecular marker-based search for sources of genes for resistance to pathogens among accessions of breeding–genetic collections of the All-Russia Research Institute of Potato Farming. Zashhita kartofelya = Potato Protection. 2015;1: 3-7. (in Russian)

Bryan G.J., McNicoll J., Ramsay G., Meyer R.C., DeJong W.S. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. Theor. Appl. Genet. 1999;99:859-867. DOI 10.1007/s001220051306.

CABI/EPPO. *Synchytrium endobioticum*. Distribution maps of plant diseases. 2015. Available at http://www.cabi.org.

Colton L.M., Groza H.I., Wielgus S.M., Jiang J. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene *RB* derived from a wild potato species. Crop Sci. 2006;46:589-594. DOI 10.2135/cropsci2005.0112.

Dionne L.A. Cytoplasmic sterility in derivatives of *Solanum demissum*. Am. Potato J. 1961;38:117-120.

Evdokimova Z.Z. Creation of high-performance early-ripening potato varieties of a new generation, resistant to late blight and environmental stress factors. Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktual'nye problemy sovremennoy industrii proizvodstva kartofelya» [Proceedings of the Research and Practical Conference "Urgent Problems of Present-Day Potato Industry"]. Cheboksary, 2010;49-53. (in Russian)

Evdokimova Z.Z., Kalashnik M.V. Use of the genetic resources of complex interspecies hybrids in potato breeding. Kartofelevodstvo. Sbornik nauchnyh trudov [Potato Farming: Collection of Research Papers]. Minsk, 2013;21:161-168. (in Russian)

Evdokimova Z.Z., Kalashnik M.V. Search for sources of late blight resistance and other economically valuable traits among complex interspecific potato hybrids. Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Sovremennye problemy i strategiya razvitiya agrarnoy nauki Evropeyskogo Severa Rossii» [Proceedings of the International Research Conference "Current Issues and Strategy of Development of the Agrarian Science in northern European Russia"]. Petrozavodsk, 2015;75-80. (in Russian)

Evdokimova Z.Z., Kalashnik M.V. Potential of complex interspecific potato hybrids in resistance to diseases and other economically

valuable traits. Trudy Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo universiteta = Works of the Kuban State Agrarian University. 2016;3(60):73-76. (in Russian)

Finkers-Tomczak A., Danan S., van Dijk T., Beyene A., Bouwman L., Overmars H., van Eck H., Goverse A., Bakker J., Bakker E. A high-resolution map of the *Grp1* locus on chromosome V of potato harbouring broad-spectrum resistance to the cyst nematode species *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis*. Theor. Appl. Genet. 2009;119:165-173. DOI 10.1007/s00122-009-1026-1.

Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Żyta D., Gebhardt C., Marczewski W. The *Ry-f*$_{sto}$ gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122718 in PVY resistant potato cultivars. Mol. Breed. 2005;15(1):95-101. DOI 10.1007/s11032-004-2736-3.

Gadzhiev N.M., Lebedeva V.A. Origin of some Belogorsk potato cultivars. Kartofel i ovoshchi = Potatoes and Vegetables. 2010;8:21. (in Russian)

Gadzhiev N.M., Lebedeva V.A. High plasticity of varieties that are multi-species potato hybrids. Materialy VI mezhregional'noy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Sovremennaya industriya kartofelya: sostoyanie i perspektivy razvitiya» [Proceedings of the 6th Interregional Research and Practical Conference "Present-day Potato Industry: State and Prospects"]. Cheboksary, 2014:39-40. (in Russian)

Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A., Krylova E., Alpatyeva N., Spooner D., Novikova L. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism. Genet. Resour. Crop Evol. 2013;60:1997-2015. DOI 10.1007/s10722-013-9968-1.

Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. Trends Genet. 2013;29(4):248-256. DOI 10.1016/j.tig.2012.11.006.

Gebhardt C., Bellin A., Henselewski A., Lehmann W., Schwarzfischer A., Valkonen J. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. Theor. Appl. Genet. 2006;112:1458-1464. DOI 10.1007/s00122-006-0248-8.

Gosudarstvennyy reestr selektsionnykh dostizheniy, dopushchennykh k ispol'zovaniyu [State Register of Breeding Achievements Approved for Use]. Available at: http://reestr.gossort.com/docs/reestr_2017.pdf. (in Russian)

Gruzdeva L.I., Matveeva E.M. Expansion of the area of potato cyst-forming nematodes in northwestern Russia. Trudy Tsentra parazitologii = Transactions of Center for Parasitology. 2010;XLVI:71-80. (in Russian)

Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Vossen J.H., Visser R.G.F. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh Project. Potato Res. 2016:59:35-66. DOI 10.1007/s11540-015-9312-6.

Hosaka K. T-type chloroplast DNA in *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* was conferred from some populations of *S. tarijense* Hawkes. Am. J. Potato Res. 2003;80:21-32.

Hosaka K., Sanetomo R. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. Theor. Appl. Genet. 2012;125(6):1237-1251. DOI 10.1007/s00122-012-1909-4.

Hosaka K., Sanetomo R. Application of a PCR-based cytoplasm genotyping method for phylogenetic analysis in potato. Am. J. Potato Res. 2014;91:246-253. DOI 10.1007/s12230-013-9344-x.

Huang S., van der Vossen E.A.G., Kuang H., Vleeshouwers V.G., Zhang N., Borm T.J.A., van Eck H.J., Baker B., Jacobsen E., Visser R.G.F. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. Plant J. 2005;42(2):251-261. DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02365.x.

Janssen G.J.W., van Norel A., Verkerk-Bakker B., Janssen R., Hoogendoorn J. Introgression of resistance to root-knot nematodes from wild Central American *Solanum* species into *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. Theor. Appl. Genet. 1997;95(3):490-496.

Kasai K., Morikawa Y., Sorri V.A., Valkonen J.P.T., Gebhardt C., Watanabe K.N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry*$_{adg}$ based on a common feature of plant disease resistance genes. Genome. 2000;43:1-8. DOI 10.1139/g99-092.

Khiutti A.V., Antonova O.Yu., Mironenko N.V., Gavrilenko T.A., Afanasenko O.S. Potato resistance to quarantine diseases. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):51-61. DOI 10.18699/VJ17.223. (in Russian)

Klimenko N.S., Antonova O.Y., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Gavrilenko T.A. Marker-associated selection of Russian potato varieties with using markers of resistance genes to the golden potato cyst nematode (pathotype Ro1). Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2017;178(4):70-79.

Lebedeva V.A. Selektsiya kartofelya na osnove mezhvidovoy gibridizatsii: obobshchenie 60-letnego opyta nauchnoy raboty [Potato breeding involving interspecific hybridization: summary of 60 years of research experience]. SPb: Renome Publ., 2010;139. (in Russian)

Lebedeva V.A., Gadzhiev N.M. Creation of ultra-early potato hybrids using wild species. Kartofel i ovoshchi = Potatoes and vegetables 2011;7:21. (in Russian)

Lebedeva V.A., Gadzhiev N.M. Experimental polyploidy and inbreeding in potato breeding for high performance and tuber quality. Zashhita kartofelya = Potato Protection. 2014;1:16-17. (in Russian)

Lebedeva V.A., Gadzhiev N.M. Breeding for resistance to diseases and pests is a basis of environmentalization in potato production. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Metody i tekhnologii v selektsii rasteniy i rastenievodstve» [Proceedings of the Research and Practical Conference "Methods and Technologies in Plant Breeding and Farming"]. Kirov, 2015;137-139. (in Russian)

Lebedeva V.A., Gadzhiev N.M. More intense use of the gene pool is the main pathway for potato breeding. Kartofelevodstvo. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Razvitie novykh tekhnologiy selektsii i sozdanie otechestvennogo konkurentosposobnogo semennogo fonda kartofelya» [Potato Farming. Proceedings of the International Research and Practical Conference "Development of New Breeding Technologies and Raise of a Commercially Viable Domestic Potato Seed Stock]. Moscow, 2016: 42-45. (in Russian)

Lebedeva N.A. Polyploids of wild potato species and hybrids with polyploids in a multi-year planting. Botanicheskiy zhurnal = Botanical Journal. 1961;6:14-15. (in Russian)

Lebedeva N.A. Raise and use of polyploids in potato breeding. Vtoroe soveshchanie po poliploidii, Leningrad, 14–18 yanvarya 1963 g.: Tezisy dokladov [Abstracts from the 2nd Conference on Polyploidy. Leningrad January 14-18, 1963]. Leningrad, 1963;28-29.

Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov O., Antonova O., Khiutti A., Novikova L., Afanasenko O., Spooner D., Gavrilenko T. Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions. Plant Breed. 2014; 133(5):660-665. DOI 10.1111/pbr.12195.

Lössl A., Götz M., Braun A., Wenzel G. Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. Euphytica. 2000; 116:221-230. DOI 10.1023/A:1004039320227.

Milczarek D., Flis B., Przetakiewicz A. Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. Am. J. Potato Res. 2011;88:245-255. DOI 10.1007/s12230-011-9189-0.

Mori K., Mukojima N., Nakao T., Tamiya S., Sakamoto Y., Sohbaru N., Hayashi K., Watanuki H., Nara K., Yamazaki K., Ishii T., Hosaka K. Germplasm release: Saikai 35, a male and female fertile breeding line carrying *Solanum phureja*-derived cytoplasm and potato cyst nematode resistance (*H1*) and *Potato virus Y* resistance (*Ry*$_{chc}$) genes. Am. J. Potato Res. 2012;89:63-72. DOI 10.1007/s12230-011-9221-4.

Mori K., Sakamoto Y., Mukojima N., Tamiya S., Naka T., Ishii T., Hosaka K. Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. Euphytica. 2011;18(3):347-355. DOI 10.1007/s10681-011-0381-6.

Ohbayashi K., Nakata N., Chaya M., Komura K. Development of a detection method of resistance to potato disease and pest using DNA markers. 1. Detection methods of resistance to potato virus X, potato cyst nematode and late blight. Bull. Nagasaki Agri. Fore. Tech. Dev. Cen. 2010;1:1-26.

Osipova E.A. Potato domestication and breeding achievements. Sbornik nauchnykh trudov SZNIISKh «Uluchshenie kul'turnykh rasteniy metodami selektsii» [Collection of Works of the Northwestern Research Institute for Agriculture "Crop Improvement by Breeding Methods"]. 1979;233-264. (in Russian)

Osipova E.A. Breeding of high-yield late blight-resistant potato varieties for the Non-Black Earth Area. Byulleten VIR = Bulletin of the Institute of Plant Industry (Leningrad). 1980;105:41-45. (in Russian)

Osipova E.A. Using of interspecific hybridization in potato breeding. Chetvertyy s"ezd Vsesoyuznogo obshchestva genetikov i selektsionerov im. N.I. Vavilova, Kishinev, 1–5 fevralya 1982 g.: Tezisy dokladov [Abstracts from the 4th Congress of the Vavilov All-Union Society for Geneticists and Breeders, Kishinev, February 1–5, 1982]. Kishinev, 1982;3:131-139. (in Russian)

Pausheva Z.P. Praktikum po tsitologii rasteniy [Practical Course on Plant Cytology]. Moscow: Agropromizdat Publ., 1988. (in Russian).

Ramakrishnan A.P., Ritland C., Blas Sevillano R.H., Riseman A. Review of potato molecular markers to enhance trait selection. Am. J. Potato Res. 2015;92(4):455-472. DOI 10.1007/s12230-015-9455-7.

Ross H. Potato Breeding – Problems and Perspectives. Berlin: V.P. Parey, 1986.

Rouppe van der Voort J., Kanyuka K., van der Vossen E., Bendahmane A., Mooijman P., Klein-Lankhorst R., Stiekema W., Baulcombe D., Bakker J. Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. Mol. Plant-Microbe Interact. 1999;12(3):197-206. DOI 10.1094/MPMI.1999.12.3.197.

Sanetomo R., Gebhardt C. Cytoplasmic genome types of European potatoes and their effects on complex agronomic traits. BMC Plant Biol. 2015;15:162. DOI 10.1186/s12870-015-0545-y.

Sanetomo R., Hosaka K. A recombination-derived mitochondrial genome retained stoichiometrically only among *Solanum verrucosum* Schltdl. and Mexican polyploid wild potato species. Genet. Resour. Crop Evol. 2013;60:2391-2404. DOI 10.1007/s10722-013-0007-z.

Schultz L., Cogan N.O.I., McLean K., Dale M.F.B., Bryan G.J., Forster J.N.W., Slater A.T. Evaluation and implementation of a potential diagnostic molecular marker for *H1*-conferred potato cyst nematode resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Breed. 2012; 131:315-321. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.01949.x.

Sieczka M. Ocena odpornosci na zaraze ziemniaka w warunkach naturalnej infekcji. Monografie i rozprawy naukowe. IHAR, Radzikow. 2001;10:74-76.

Simko I., Jansky S., Stephenson S., Spooner D. Genetics of resistance to pests and disease. In: Vreugdenhil D. (Ed.). Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives. Amsterdam: Elsevier, 2007;117-155.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):46-53
DOI 10.18699/VJ18.327

Опушение листа у картофеля *Solanum tuberosum*: морфология, функциональная роль и методы исследования

А.В. Дорошков[1, 2], Д.А. Афонников[1, 2] ✉

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Опушение – один из важных биотических факторов защиты растений от повреждающих факторов среды. Интерес к изучению опушения картофеля связан преимущественно с тем, что оно играет заметную роль в защите растений от насекомых-вредителей. Обзор посвящен функциональной роли и генетическому контролю опушения листьев у картофеля. Рассматриваются морфологические особенности опушения картофеля, которое состоит из несекретирующих и секретирующих трихом нескольких типов. Соотношение трихом разных типов у разных видов картофеля отличается большим разнообразием, характерным в первую очередь для дикорастущих видов. Опушение может служить классифицирующим признаком. Описана роль трихом как «фабрик» вторичных метаболитов картофеля, среди которых сложные эфиры сахарозы и терпеновые производные, служащие репеллентами насекомых. Трихомы также синтезируют полифенолоксидазу, которая за счет окисления фенолов приводит к синтезу метаболитов, вредных для насекомых. Представлена информация об известных в настоящее время генах, ответственных за контроль опушения. Это гены, участвующие в формировании комплекса MYB-bHLH-WD40, который контролирует процессы дифференцировки и развития трихом у растений. У картофеля белки этого комплекса изучаются прежде всего в связи с регуляцией биосинтеза антоцианов. Фундаментальной основой для идентификации генов, контролирующих опушение картофеля, в настоящее время являются данные о последовательности полного генома картофеля. Это позволяет на основе анализа гомологии с генами модельных организмов идентифицировать гены-кандидаты, контролирующие важные признаки у картофеля. Работы в этом направлении уже ведутся, однако они находятся на начальном этапе. В заключительном разделе обзора описаны методы фенотипирования трихом, основанные на визуальном анализе микроскопических изображений (полученных с помощью как оптических, так и электронных микроскопов). Показана актуальность разработки новых высокопроизводительных подходов к изучению морфологии этого признака у картофеля.

Ключевые слова: картофель; опушение листа; трихомы; защита от вредителей; фенотипирование.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Дорошков А.В., Афонников Д.А. Опушение листа у картофеля *Solanum tuberosum*: морфология, функциональная роль и методы исследования. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):46-53. DOI 10.18699/VJ18.327

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Doroshkov A.V., Afonnikov D.A. Leaf hairiness in potato *Solanum tuberosum*: morphology, function and methods of analysis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):46-53. DOI 10.18699/VJ18.327 (in Russian)

Received 22.12.2017
Accepted for publication 01.02.2018
© UTHORS, 2018

✉ e-mail: ada@bionet.nsc.ru

Leaf hairiness in potato *Solanum tuberosum*: morphology, function and methods of analysis

A.V. Doroshkov[1, 2], D.A. Afonnikov[1, 2] ✉

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Pubescence is one of the important biotic factors in plants related to protection from stressful environmental factors. In potato, the interest in the study of pubescence is associated primarily with the fact that it plays a significant role in the protection of plants from insect pests. The review focuses on the functional role and genetic control of leaf pubescence in potato. The review describes morphological features of pubescence of potatoes, which consists of simple and glandular trichomes of several types. The ratio of trichomes of different types in potato species potato is diverse, especially for wild species. Therefore, the pubescence may serve as a classifying trait. The role of trichomes as "factories" of secondary metabolites of potatoes, among which are the esters of sucrose and terpene derivatives that serve as insect repellents. Trichomes also synthesize polyphenol oxidases, which lead to the biosynthesis of compounds which are harmful to the insects. The review presents information about the currently known genes responsible for pubescence. These are genes involved in the formation of a complex of MYB-bHLH-WD40, which controls the differentiation and development of trichomes in plants. The proteins of this complex in potatoes are primarily studied in connection with the regulation of the biosynthesis of anthocyanins. The fundamental basis for identification of genes controlling pubescence in potato is currently sequence data from complete genome sequencing. By analysis of homology with the genes of model organisms, it allows candidate genes that control important traits in potato to be identified. Work in this direction is already underway, but at the initial stage. In the final section, the review describes the methods of phenotyping trichomes, based on the visual analysis of microscopic images (obtained both with optical and electron microscopes). The urgency of developing new high-performance approaches to the study of the morphology of the trait in potatoes has been demonstrated.

Key words: potato; leaf hairiness; trichomes; protection from pests; phenotyping.

Опушение листовой пластинки растений формируется за счет поверхностных образований – трихом. Это один из адаптивных признаков растений, отвечающий за взаимодействие со внешней средой. Он складывается из нескольких характеристик – морфологии трихом, их размеров, плотности (число трихом на единицу поверхности листа). Трихомы бывают несекретирующие и секретирующие (депонирующие и/или выделяющие секрет). Первые участвуют в формировании микроклимата у поверхности листа, в защите от неблагоприятных биотических и абиотических факторов среды. В частности, опушение рассеивает избыточную солнечную энергию и увеличивает эффективность фотосинтеза (Morales et al., 2002; Liakopoulos et al., 2006). В холодный период опушение регулирует температуру листа, приближая ее к оптимальной (Ehleringer, Mooney, 1978). Также трихомы могут физически препятствовать движениям растительноядных членистоногих и поеданию тканей растения (Cardoso, 2008; Pott et al., 2012).

Особый интерес представляют секретирующие (или железистые) трихомы, найденные на поверхности листовой пластинки многих видов растений (примерно у 30 % всех сосудистых растений). Такие трихомы способны синтезировать, хранить и выделять большое количество специализированных метаболитов, многие из которых важны для приготовления лекарственных средств, ароматизаторов, пищевых добавок и природных пестицидов (Wagner, 1991; Duke et al., 2000; Wagner et al., 2004). Железистые трихомы развивались главным образом как оружие для защиты от патогенных насекомых и микроорганизмов (Glas et al., 2012).

У пасленовых (Solaneae), к которым относится картофель *Solanum tuberosum* L., опушение листа представлено широким спектром многоклеточных, обычно не ветвистых трихом разного размера (Luckwill, 1943; Tingey et al., 1982).

В середине прошлого века было опубликовано подробное морфологическое описание разных типов трихом для томата (*Solanum lycopersicon*, соврем. син.: *Lycopersicum esculentum*) (Luckwill, 1943), растения которого даже на фоне остальных представителей сем. Пасленовые характеризуются очень большим разнообразием типов трихом. Трихомы томата различаются по размеру, морфологии и химическому составу секретируемых веществ, что свидетельствует о разной их функциональной нагруженности:

– тип I – секретирующие трихомы с многоклеточным основанием, длинной (~2 мм) многоклеточной ножкой и небольшим железистым кончиком;
– тип II – короткие (0.2–1.0 мм) несекретирующие трихомы, характеризующиеся многоклеточным основанием;
– тип III – короткие (0.2–1.0 мм) несекретирующие трихомы, характеризующиеся одноклеточным основанием;
– тип IV – более короткие (~0.3 мм) трихомы, которые имеют одноклеточное основание, многоклеточный стебелек, короче, чем у типа I, и небольшой железистый кончик;
– тип V – короткие (0.1–0.3 мм) несекретирующие трихомы с одноклеточным основанием;
– тип VI – трихомы, характеризующиеся четырехклеточной железистой головкой на короткой (~0.1 мм) многоклеточной ножке;
– тип VII – короткие трихомы (<0.05 мм), состоящие из одноклеточной ножки и железы неправильной формы, включающей от 4 до 8 секретирующих клеток (Luckwill, 1943).

Основные классы вторичных метаболитов, которые способны производить железистые трихомы, – это терпеноиды (Gershenzon, Dudareva, 2007), фенилпропены (Gang et al., 2001), флавоноиды (Treutter, 2006), метилкетоны (Fridman et al., 2005), ацильные сахара (Kroumova, Wagner, 2003).

С использованием методов электронной микроскопии были описаны детальные различия в форме и поверхности трихом разных видов рода *Solanum* (Edmonds, 1982). Авторами отмечено большое разнообразие изученных видов по этому признаку, различия в соотношении трихом разных типов и отсутствие секретирующих трихом у некоторых видов. Кроме того, выявлено меж- и внутривидовое разнообразие не только по соотношению трихом разного типа, но и по химическому составу их содержимого (Schilmiller et al., 2008). Например, для дикого вида томата *S. pennellii* характерно присутствие ацетилированных форм сахаров в железистых трихомах типа IV, тогда как в трихомах культурных форм томата подобные соединения отсутствуют (Luckwill, 1943; Antonius, 2001).

Помимо вторичных метаболитов, трихомы многих видов пасленовых способны производить разнообразные белки с защитными функциями, такие как ингибиторы протеаз (Liu et al., 2006), полифенолоксидазы (Yu et al., 1992) и филлопанины (Shepherd et al., 2005). Ингибиторы протеаз, вероятно, снижают эффективность пищеварения вредителей, питающихся листьями, замедляя их развитие (Glas et al., 2012). Синтез ингибиторов протеаз и других защитных веществ может быть как постоянным, так и индуцироваться в ответ на поранение (Tian et al., 2012). Полифенолоксидазы представляют собой класс ферментов, которые экспрессируются в ответ на различные повреждающие факторы растений (Jukanti, 2017). В частности, они обеспечивают окисление моно- и О-дифенолов до О-дигидрооксихинонов, которые могут связываться с аминокислотами в кишечнике насекомых, тем самым снижая их питательную ценность. В норме разные представители этого ферментативного класса хранятся в лейкопластах трихом I, IV и VI типа у томата, тогда как фенольные субстраты присутствуют в вакуолях соответствующих клеток трихом. При повреждении трихом компартменты разрушаются и соответствующие фенольные производные ферментативно окисляются до хинонов. Эти хиноны обладают высокой реакционной способностью и связываются с $-NH_2$ и -SH группами биологических молекул (Thipyapong et al., 1997). Наличие такой системы повышает устойчивость не только к насекомым, но также к поражению бактериальными (например, *Pseudomonas syringae* (Li, Steffens, 2002)) и грибными патогенами (например, *Peronospora tabacina*) за счет ингибирования развития спор у последних (Shepherd et al., 2005).

Было показано, что мутация томата hairless (hl), вызывающая образование дефектных (искривленных или увеличенных) трихом, уменьшает содержание полифенольных и терпеновых соединений в них (Kang et al., 2010).

Эти соединения играют важную роль в защите от насекомых-паразитов (например, *Manduca sexta* на стадии гусеницы и бабочки).

Морфология опушения листа картофеля

Трихомы, формирующие опушение листа у картофеля, по своей морфологии сходны с трихомами, описанными у других видов пасленовых, однако конкретные характеристики опушения у разных видов могут существенно различаться. М.А. Сизова (1965) провела систематический анализ особенностей опушения у картофеля 102 видов. Автор характеризует опушение четырьмя типами трихом. Первый тип – это простые волоски, различающиеся по длине и толщине. На их стенках имеется отложение кутикулы, которое определяет жесткость трихомы. Остальные три типа трихом представлены секретирующими волосками. Первый тип секретирующих трихом похож на простые трихомы; различие заключается в том, что они содержат на вершине одноклеточную железку. Такой тип трихом встречается очень редко, лишь у одного из изученных видов – *S. berthaultii*. Второй тип секретирующих трихом характеризуется железкой округлой формы, состоящей из четырех секретирующих клеток. Нижележащая клетка является ножкой трихомы. У некоторых видов такой тип трихом преобладает. Третий тип секретирующих трихом включает головку из шести клеток, расположенных в три ряда. Ножка такой трихомы сформирована одной клеткой, которая почти всегда изогнута. Автор отмечает, что различным видам свойственно опушение с определенным типом трихом, так что эта характеристика может служить систематическим признаком. Степень опушения сильно варьирует в зависимости от условий произрастания, но соотношение типов волосков можно считать постоянным признаком.

В этой же работе (Сизова, 1965) для двух видов *S. tarijense* и *S. pinnatisectum* исследовалась изменчивость опушения в процессе развития листьев. В результате наблюдений оказалось, что проростки *S. tarijense* в период появления семядолей имеют опушение, не свойственное взрослому растению. Отличия касаются преимущественно соотношения трихом разного типа, а сходство с опушением у взрослого растения наступает лишь на 10-й день после всходов. Таким образом, разные типы трихом формируются в разное время. Например, железистые трихомы, содержащие головку из четырех клеток, появляются только в момент формирования устьиц листа, тогда как трихомы других типов формируются на более ранних стадиях развития листа. Анализ расположения трихом на начальной стадии формирования листа показал, что волоски инициируются в основном вблизи проводящих тканей, ближе к формирующейся главной жилке.

В работе (McCauley, Evert, 1988) у сорта Russet Burbank было отмечено наличие секретирующих трихом с секретирующей головкой из четырех клеток, а также более крупных несекретирующих многоклеточных трихом.

При изучении ультраструктуры трихом сорта картофеля Bintje установлено наличие двух типов секретирующих трихом, различающихся по структуре (Lyshede, 1980). Первый тип имеет восьмиклеточную шаровидную головку на одноклеточной ножке. Железистые клетки, составляющие головку, содержат множество вакуолей, крупное ядро, многочисленные рибосомы и митохондрии, несколько телец Гольджи и потемневшие хлоропласты. Пластиды в основном расположены вблизи осевой стенки клетки, граничащей с центральным межклеточным пространством, заполненным секретом. Предполагается, что пластиды участвуют в формировании секрета. Наружная стенка покрыта тонкой кутикулой (Lyshede, 1980). Второй тип имеет булавовидные многоклеточные головки, также на одноклеточной ножке. Клеточные особенности подобны описанным для трихом предыдущего типа, за исключением того, что железистые клетки несут одну большую центральную вакуоль и пластиды, распределенные по всей клетке. Объемное межклеточное пространство заполнено секретом (Lyshede, 1980).

Установлено, что трихомы этих двух типов различаются по составу содержащихся в них соединений (Lyshede, 1980). Короткие железистые трихомы с круглой головкой (в англоязычной литературе их часто называют «тип А» (Gibson, 1971)) содержат фенольные соединения (Avé, Tingey, 1986). Более длинные железистые трихомы с булавовидной головкой (тип В) содержат сложные эфиры сахарозы (Neal et al., 1990). Следует отметить, что для большинства культурных форм картофеля, в отличие от диких видов, характерны трихомы типа А и крупные трихомы без булавовидной головки и не содержащие характерного для трихом типа В секрета (см. рисунок) (Tingey, Laubengayer, 1981; Tingey et al., 1982; McCauley, Evert, 1988; Kowalski et al., 1992).

Защитная роль опушения листовой пластинки у культурных форм картофеля и их диких сородичей

У возделываемых форм картофеля опушение – один из важных факторов сопротивления растения насекомым (Gregory et al., 1986; Flanders et al., 1992), в частности картофельной блохе, картофельной цикадке, колорадскому жуку (Maharijaya, Vosman, 2015), а также тлям (Радченко, 2017). Известно, что генетическое разнообразие возделываемых культур с течением времени снижается и может быть повышено за счет использования диких сородичей как источника селекционно значимых аллелей.

В исследовании (Tingey et al., 1982) выявлено, что опушение дикого картофеля *Solanum berthaultii* Hawkes., устойчивого к поражению насекомыми и распространенного в Южной Америке, отличается от опушения сортов *S. tuberosum* не только по количественным характеристикам, но и по морфологии трихом (см. рисунок). Можно заметить, что количество трихом дикого сородича в разы больше, чем у культурного сорта. Как известно, плотность расположения трихом является одним из основных факторов, коррелирующих с устойчивостью к насекомым-вредителям (Kennedy, 2003; Simmons, Gurr, 2005). Одновременно с этим у дикого вида картофеля наблюдается два разных типа (А и В) головчатых (секретирующих) трихом (см. рисунок, *б*), тогда как у культурной формы обнаружен тип А секретирующих трихом и многоклеточные трихомы без головки (см. рисунок, *а*). Установлено, что секретирующие трихомы обоих типов (А и В) совместно обеспечивают более эффективную защиту от тли *Myzus*

persicae (Sulzer), чем один только тип A (Tingey, Laubengayer, 1981), а также противодействуют широкому спектру насекомых-вредителей, таких как картофельный мотылек *Phthorimaea operculella* Zell., бобовая цикадка *Empoasca fabae* Harris., жук-листоед *Epitrix cucumeris* Harris. и др. (Neal et al., 1991).

Секрет трихом типа A способен обездвиживать мелких членистоногих, способствуя их гибели (Gibson, Turner, 1977). Это происходит вследствие быстрой полимеризации секрета трихомы, содержащего полифенолоксидазу, после повреждения в результате контакта с насекомыми (Kowalski et al., 1992). Было показано, что содержимое трихом *S. tuberosum* не проявляет полифенолоксидазной активности (Kowalski et al., 1992).

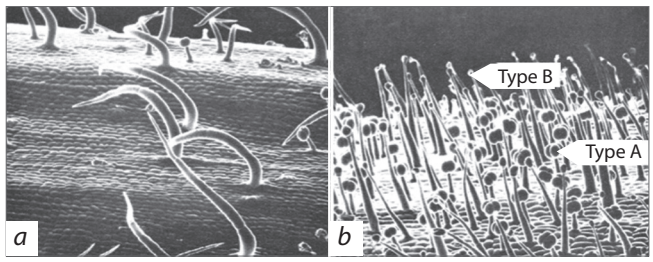
Более длинные железистые трихомы типа B выделяют сложные эфиры сахарозы и терпеновые производные, которые являются репеллентами и способствуют гибели насекомых, в частности тлей и гусениц, оказывающихся на поверхности листа (Neal et al., 1990; Kang et al., 2010). Интересно, что содержащийся в этих трихомах (E)-β-фарнезин противодействует тле *M. persicae* не только напрямую, но и опосредованно, привлекая тлевых наездников *Diaeretiella rapae* (Gibson, Pickett, 1983; Beale et al., 2006). Кроме того, наличие густого железистого опушения типа B противодействует поражению растений колорадским жуком (Фасулати и др., 2011).

Методами масс-спектрометрии проведен сравнительный анализ состава секрета диких видов картофеля, устойчивых к колорадскому жуку и восприимчивых к поражению им (*S. tarijense*, *S. oplocense*, *S. piurae*, *S. acroglossum*, *S. chomatophilum*, *S. paucissectum*), а также культурных форм (Tai et al., 2014). Авторы определили наборы метаболитов, отличающие эти группы устойчивости к колорадскому жуку, и показали ключевое влияние глюкоалкалоидов, гидроксикумарина и фенилпропаноидов, содержащихся в трихомах большинства диких видов и отсутствующих у *S. tuberosum*.

Генетико-селекционные исследования признака «опушение листовой пластинки» картофеля

Плотное опушение железистыми трихомами (см. рисунок), эффективное в защите от вредителей, распространено среди диких видов картофеля и рассматривается как перспективный признак для интрогрессии в культурные формы (Фасулати и др., 2011). Особенности опушения могут быть успешно перенесены между видами *S. tuberosum* и *S. berthaultii* и впоследствии использованы при создании сортов картофеля, устойчивых к насекомым-вредителям (Tingey et al., 1982).

Для комплексной устойчивости картофеля к насекомым-вредителям были выявлены локусы количественных признаков (QTL) при использовании картирующей популяции *S. tuberosum* × *S. berthaultii* (с двумя беккроссами), генотипированной при помощи RFLP-маркеров (restriction fragments length polymorphism – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) (Bonierbale et al., 1994). При этом авторы идентифицировали локусы комплексной устойчивости к насекомым-вредителям, ассоциированные с плотностью трихом и их защитными характеристиками: активностью полифенолоксидазы и синтезом сложного эфира сахарозы в трихомах типа A и B, а также реакцией ферментативного потемнения.



Scanning electron micrographs of leaf hairiness in (*a*) Hudson cultivar and (*b*) the wild potato species *S. berthaultii* (Tingey et al., 1982).

Однако при переносе в сорта картофеля генетического материала диких сородичей вместе с полезными признаками (в том числе защитным опушением листовой пластинки) происходит коселекция нежелательных признаков, от которых необходимо избавляться путем дальнейших скрещиваний и уменьшения доли чужеродного хроматина в геноме культурных форм картофеля. Для того чтобы не проходить этот путь каждый раз, создаются интрогрессивные линии, несущие только желаемые признаки, унаследованные от диких сородичей, которые могут затем широко применяться в селекции сортов. Одной из первых удачных линий, унаследовавших опушение от «дикаря» *S. berthaultii*, была линия NYL 235-4 (Plaisted et al., 1992).

В результате секвенирования генома картофеля (Potato Genome Sequencing Consortium, 2011) были расшифрованы последовательности ДНК его хромосом. Это позволило идентифицировать гены-кандидаты, контролирующие важные селекционные признаки, на основе сходства их последовательностей с уже известными генами модельных организмов, таких как *Arabidopsis thaliana*. Для *A. thaliana* гены, контролирующие инициацию и рост трихом, изучены достаточно подробно. Они формируют генную сеть, включающую как пути передачи сигналов от фитогормонов (An et al., 2011), так и регуляторные гены (Hauser, 2014). Известно, что положительная регуляция роста трихом у *A. thaliana* обеспечивается регуляторным комплексом MYB-bHLH-WD40, включающим белок WD40 (TTG1), три транскрипционных фактора (ТФ) MYB, принадлежащих к классу R2R3 (GL1, MYB23, MYB5) и четыре ТФ, относящихся к классу bHLH (GL3, EGL3, TT8, MYC-1) (Hauser, 2014). Комплекс MYB-bHLH-WD40 связывается с регуляторным районом белка GLABRA2 (GL2, ТФ класса «гомеодомен»), который активирует процессы эндоредупликации, ветвления и созревания клеточной стенки, необходимые для формирования трихом. К числу негативных регуляторов роста трихом относятся ТФ класса MYB типа R3 *A. thaliana* – CPC, TRY, ETC1, ETC2, ETC3 и TCL1, TCL2. Несмотря на наличие полногеномных данных, семейства указанных транскрипционных факторов у картофеля охарактеризованы недостаточно полно. Классификация по типу ДНК-связывающих доменов для последовательностей ТФ картофеля существует в базе данных транскрипционных факторов растений PlantTFBD

(Jin et al., 2017), однако для более точного определения функциональной роли этих генов необходим детальный анализ и сопоставление с гомологами из других таксонов. Такой анализ проведен в работе (Wang et al., 2018) для транскрипционных факторов картофеля класса bHLH, к которым относятся положительные регуляторы GL3 (идентификатор базы данных TAIR AT5G41315), EGL3 (AT1G63650), TT8 (AT4G09820), MYC-1 (AT4G00480). Филогенетический анализ последовательностей белков bHLH, представленных у *A. thaliana* и *S. tuberosum*, показал, что все указанные выше транскрипционные факторы bHLH *A. thaliana* попадают в группу L, а их ближайшими гомологами у картофеля являются белки StbHLH97 и StbHLH93 (Wang et al., 2018).

Необходимо отметить, что комплекс MYB-bHLH-WD40 у растений участвует не только в регуляции формирования и роста трихом, но также в экспрессии генов биосинтеза антоцианов (Li, 2014). Это одна из причин активного исследования транскрипционных факторов, вовлеченных в формирование данного комплекса у картофеля (Стрыгина, Хлесткина, 2017). В работе (Payyavula et al., 2013) для гомолога белка TTG1 у картофеля, StWD40, было обнаружено, что уровень его экспрессии значимо положительно коррелирует с содержанием фенилпропаноидов в клубнях картофеля. На основе филогенетического анализа последовательностей были определены гомологи для транскрипционных факторов *A. thaliana* GL3 и EGL3 – StbHLH2 и TT8 – StbHLH1, а также продемонстрирована их экспрессия в клубнях картофеля (Payyavula et al., 2013).

В исследовании (Liu et al., 2016) анализировались функциональные различия активаторов биосинтеза антоцианов картофеля AN1, MYBA1 и MYB113. Авторы приводят филогенетические деревья для последовательностей семейства ТФ bHLH, связанных с биосинтезом антоцианов у картофеля и других видов, на которых в кластер, содержащий последовательность белка *A. thaliana* TT8, попадает последовательность картофеля StbHLH1, а в кластер, который содержит последовательность ТФ *A. thaliana* GL3, попадает StJAF13. Дифференциальная экспрессия генов в клубнях трех сортов с разной окраской мякоти (красной, темно-пурпурной и белой) исследовалась в работе (Cho et al., 2016) при помощи широкомасштабного РНК-секвенирования. Среди генов, демонстрирующих дифференциальную экспрессию, в этих образцах оказались гены, кодирующие белки StbHLH1 и StWD40. Анализ генов, ассоциированных с биосинтезом антоцианов у картофеля, демонстрирует функциональную роль белков комплекса MYB-bHLH-WD40, связь их экспрессии с изменением окраски как клубней, так и листьев картофеля. Однако при реконструкции системы генов, контролирующих опушение, к этим данным необходимо относиться с осторожностью. Только широкомасштабный анализ полного набора белковых последовательностей картофеля и идентификация ортологов могут быть надежной основой для поиска генов-кандидатов, вовлеченных в контроль опушения листа. Такой анализ актуален и для остальных элементов регуляторной сети контроля опушения у картофеля, которые в настоящее время остаются слабо изученными.

Применение современных геномных технологий позволило изучить генетический контроль биосинтеза соединений, накапливающихся внутри трихом (Tissier, 2012). Это дало возможность вносить изменения в состав секрета трихом методами селекции и генной инженерии (Glas et al., 2012). В связи с тем, что трихомы частично изолированы от всего организма растения и имеют специфическую структуру регуляторных областей генов, контролирующих их развитие (Wang et al., 2002), они становятся перспективной основой для создания систем, производящих разный набор вторичных метаболитов, в том числе токсичных для самого растения. На модельных организмах достигнуты успехи в повышении защитных свойств путем изменения уровня экспрессии генов (Wang et al., 2001; Glas et al., 2012). Подобные технологии в перспективе могут служить для создания устойчивых к большинству вредителей сортов картофеля, что позволит свести на нет необходимость применения инсектицидов для сохранения урожая.

Методы оценки характеристик трихом картофеля

Опушение листовой пластинки картофеля обладает двумя составляющими, значимыми для направленной селекции: морфологической (типы трихом, их количество) и биохимической (содержащиеся в трихомах вещества).

Для оценки содержания тех или иных веществ применяют химический анализ или масс-спектрометрию (Tai et al., 2014). Это трудоемкие процедуры, позволяющие достаточно точно оценить состав секретирующих трихом. Однако множество данных свидетельствует в пользу того, что состав секрета трихом во многом определяется их морфологией (Tingey et al., 1982; Antonius, 2001; Kang et al., 2010), поэтому для целей высокопроизводительного фенотипирования в широкомасштабных проектах возможно применять критерии, основанные на оценке морфологического типа трихом.

Для описания морфологии трихом широко используется сканирующая электронная микроскопия (Edmonds, 1982; Tingey et al., 1982; McCauley, Evert, 1988). Этот метод позволяет детально описать каждую трихому, оценить форму и взаимное расположение клеток основания и головки, особенности поверхности (Edmonds,1982). Вместе с тем у метода есть ограничения, связанные со скоростью обработки образцов, и он требует весьма дорогостоящего оборудования, поэтому не подходит для массового анализа.

Традиционным является применение световой микроскопии (Luckwill, 1943; Channarayappa et al., 1992). Этот метод прост и позволяет отличать основные типы трихом друг от друга, а также оценивать их количество и расположение.

При широкомасштабной селекционной работе возникает дополнительная задача, связанная с ускорением и оптимизацией всех процессов анализа генотипа и фенотипа. При этом для трихом картофеля разработаны системы комплексного фенотипирования с помощью спектрометрических подходов (Cobb et al., 2013). Однако они не учитывают признаки трихом достаточно подробно. Наоборот, морфология трихом может вносить шум в ряд измеряемых характеристик (Araus, Cairns, 2014).

Была предложена технология быстрой количественной оценки характеристик опушения у картофеля для задач

генетики и селекции этой культуры, основанная на получении и компьютерной обработке контрастных изображений сгиба листа. Предложенная технология описания опушения поверхности листа картофеля с помощью программы LHDetect2 (Genaev et al., 2012) позволяет провести оценку числа трихом и их длины (Дорошков и др., 2016а). В этой технологии на данный момент отсутствует распознавание типа трихомы, однако в связи с тем, что размеры трихом разных типов у картофеля значительно различаются, есть возможность оценить их косвенно по размеру.

Предложенный метод оценки количественных характеристик опушения листовой пластинки картофеля показал высокую производительность. С его помощью получены количественные характеристики опушения листьев для 35 сортов картофеля, выделены сорта, имеющие наиболее интенсивное опушение (Великан, Танай, Кемеровчанин, Танго) (Дорошков и др., 2016б).

Заключение

Трихомы картофеля являются передовой линией обороны против растительноядных насекомых и возбудителей болезней. На настоящем этапе развития селекции этой культуры в рамках классических селекционных программ, а также методов генной инженерии возможно более широкое вовлечение данного признака с целью создания наиболее подходящих характеристик опушения для усиления защиты растений от вредителей. Применение современных геномных методов породило большой массив данных о генетических основах развития трихом и биосинтеза различных соединений, содержащихся в их секрете. В связи с тем что существует ассоциация между морфологией трихом и их защитной ролью, должна проводиться широкомасштабная селекционная работа с использованием методов высокопроизводительного фенотипирования морфологии трихом.

Acknowledgments

This work was supported by the state program on bioresource collections at the ICG, Novosibirsk (State Budgeted Project 0324-2017-0001 «Inventory and development of the GenAgro collection»).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

An L., Zhou Zh., Yan A., Gan Y. Progress on trichome development regulated by phytohormone signaling. Plant Signaling Behav. 2011; 6(12):1959-1962. DOI 10.4161/psb.6.12.18120.

Antonious G.F. Production and quantification of methyl ketones in wild tomato accessions. J. Environ. Sci. Health. Pt. B. 2001;36(6):835-848. DOI 10.1081/PFC-100107416.

Araus J.L., Cairns J.E. Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. Trends Plant Sci. 2014;19(1):52-61. DOI 10.1016/j.tplants.2013.09.008.

Avé D.A., Tingey W.M. Phenolic constituents of glandular trichomes on *Solanum berthaultii* and *S. polyadenium*. Am. Potato J. 1986; 63(9):473-480. DOI 10.1007/BF02852942.

Beale M.H., Birkett M.A., Bruce T.J., Chamberlain K., Field L.M., Huttly A.K., Martin J.L., Parker R., Phillips A.L., Pickett J.A., Prosser I.M., Shewry P.R., Smart L.E., Wadhams L.J., Woodcock C.M., Zhang Y. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006;103(27):10509-10513. DOI 10.1073/pnas.0603998103.

Bonierbale M.W., Plaisted R.L., Pineda O., Tanksley S.D. QTL analysis of trichome-mediated insect resistance in potato. Theor. Appl. Genet. 1994;87(8):973-987. DOI 10.1007/BF00225792.

Cardoso M.Z. Herbivore handling of a Plant's trichome: the case of *Heliconius charithonia* (L.) (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Passiflora lobata* (Killip) Hutch. (Passifloraceae). Neotrop. Entomol. 2008;37(3):247-252. DOI 10.1590/S1519-566X2008000300002.

Channarayappa C., Shivashankar G., Muniyappa V., Frist R.H. Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. Can. J. Bot. 1992;70(11):2184-2192. DOI 10.1139/b92-270.

Cho K., Cho K.S., Sohn H.B., Ha I.J., Hong S.Y., Lee H., Kim Y.M., Nam M.H. Network analysis of the metabolome and transcriptome reveals novel regulation of potato pigmentation. J. Exp. Bot. 2016; 67(5):1519-1533. DOI 10.1093/jxb/erv549.

Cobb J.N., De Clerck G., Greenberg A., Clark R., McCouch S. Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype–phenotype relationships and its relevance to crop improvement. Theor. Appl. Genet. 2013;126(4):867-887. DOI 10.1007/s00122-013-2066-0.

Doroshkov A.V., Genaev M.A., Afonnikov D.A. A protocol for analysis of the quantitative characteristics of leaf pubescence in potato. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016a;20(6):863-868. DOI 10.18699/VJ16.218. (in Russian)

Doroshkov A.V., Simonov A.V., Safonova A.D., Afonnikov D.A., Lihenko N.E., Kolchanov N.A. Estimation of quantitative characteristics of potato leaf hairiness using microscopic image analysis. Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC. 2016б;(30):12-14. (in Russian)

Duke S.O., Canel C., Rimando A.M., Telle M.R., Duke M.V., Paul R.N. Current and potential exploitation of plant glandular trichome productivity. Adv. Bot. Res. 2000;31:121-151. DOI 10.1016/S0065-2296(00)31008-4.

Edmonds J.M. Epidermal hair morphology in *Solanum* L. section *Solanum*. Bot. J. Linn. Soc. 1982;85(3):153-167. DOI 10.1111/j.1095-8339.1982.tb02583.x.

Ehleringer J., Mooney H.A. Leaf hairs: Effects on physiological activity and adaptive value to a desert shrub. Oecologia. 1978;37(2):183-200. DOI 10.1007/BF00344990.

Fasulati S.R., Ivanova O.V., Rogozina E.V. Complex resistance to Colorado potato beetle, 28-spotted potato ladybird, and potato golden cyst nematode in potato. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2011;10(1):14-17. (in Russian)

Flanders K.L., Hawkes J.G., Radcliffe E.B., Lauer F.I. Insect resistance in potatoes: sources, evolutionary relationships, morphological and chemical defenses, and ecogeographical associations. Euphytica. 1992;61(2):83-111. DOI 10.1007/BF00026800.

Fridman E., Wang J., Iijima Y., Froehlich J.E., Gang D.R., Ohlrogge J., Pichersky E. Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. Plant Cell. 2005;17(4):1252-1267. DOI 10.1105/tpc.104.029736.

Gang D.R., Wang J., Dudareva N., Nam K.H., Simon J.E., Lewinsohn E., Pichersky E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. Plant Physiol. 2001;125(2):539-555. DOI 10.1105/tpc.104.029736.

Genaev M.A., Doroshkov A.V., Pshenichnikova T.A., Kolchanov N.A., Afonnikov D.A. Extraction of quantitative characteristics describing wheat leaf pubescence with a novel image-processing technique. Planta. 2012;236(6):1943-1954. DOI 10.1007/s00425-012-1751-6.

Gershenzon J., Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. Nat. Chem. Biol. 2007;3(7):408-414. DOI 10.1038/nchembio.2007.5.

Gibson R.W. Glandular hairs providing resistance to aphids in certain wild potato species. Ann. Appl. Biol. 1971;68(2):113-119. DOI 10.1111/j.1744-7348.1971.tb06448.x.

Gibson R.W., Pickett J.A. Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone. Nature. 1983;302(5909):608-609. DOI 10.1038/302608a0.

Gibson R.W., Turner R.H. Insect-trapping hairs on potato plants. PANS. 1977;23(3):272-277.

Glas J.J., Schimmel B.C., Alba J.M., Escobar-Bravo R., Schuurink R.C., Kant M.R. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. Int. J. Mol. Sci. 2012;13(12): 17077-17103. DOI 10.3390/ijms131217077.

Gregory P., Tingey W.M., Ave D.A., Bouthyette P.Y. Potato glandular trichomes: a physicochemical defense mechanism against insects. In: Green M.B., Hedin P.A. (Eds.). Natural Resistance of Plants to Rests. Vol. 296. Washington City: Am. Chem. Soc., 1986;160-167. DOI 10.1021/bk-1986-0296.ch013.

Hauser M.T. Molecular basis of natural variation and environmental control of trichome patterning. Front. Plant Sci. 2014;5:320. DOI 10.3389/fpls.2014.00320.

Jin J.P., Tian F., Yang D.C., Meng Y.Q., Kong L., Luo J.C., Gao G. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. Nucleic Acids Res. 2017;45(D1): D1040-D1045. DOI 10.1093/nar/gkw982.

Jukanti A. Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants. Singapore: Springer, 2017. DOI 10.1007/978-981-10-5747-2.

Kang J.H., Shi F., Jones A.D., Marks M.D., Howe G.A. Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. J. Exp. Bot. 2010;61(4):1053-1064. DOI 10.1093/jxb/erp370.

Kennedy G.G. Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. Annu. Rev. Entomol. 2003;48(1):51-72. DOI 10.1146/annurev.ento.48.091801.112733.

Kowalski S.P., Eannetta N.T., Hirzel A.T., Steffens J.C. Purification and characterization of polyphenol oxidase from glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. Plant Physiol. 1992;100(2):677-684. DOI 10.1104/pp.100.2.677.

Kroumova A.B., Wagner G.J. Different elongation pathways in the biosynthesis of acyl groups of trichome exudate sugar esters from various solanaceous plants. Planta. 2003;216(6):1013-1021. DOI 10.1007/s00425-002-0954-7.

Li L., Steffens J.C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Planta. 2002;215(2):239-247. DOI 10.1007/s00425-002-0750-4.

Li S. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis. Plant Signal. Behav. 2014;9(1):27522. DOI 10.4161/psb.27522.

Liakopoulos G., Nikolopoulos D., Klouvatou A., Vekkos K.-A., Manetas Y., Karabourniotis G. The photoprotective role of epidermal anthocyanins and surface pubescence in young leaves of grapevine (*Vitis vinifera*). Ann. Bot. 2006;98(1):257-265. DOI 10.1093/aob/mcl097.

Liu J., Xia K.-F., Zhu J.-C., Deng Y.-G., Huang X.-L., Hu B.-L., Xu X., Xu Z.-F. The nightshade proteinase inhibitor IIb gene is constitutively expressed in glandular trichomes. Plant Cell Physiol. 2006; 47(9):1274-1284. DOI 10.1093/pcp/pcj097.

Luckwill L. The Genus Lycopersicon: Historical, Biological, and Taxonomic Survey of the Wild and Cultivated Tomatoes. Aberdeen, Scotland: Aberdeen Univ. Press, 1943.

Lyshede O.B. The ultrastructure of the glandular trichomes of *Solanum tuberosum*. Ann. Bot. 1980;46(5):519-526. DOI 10.1093/oxfordjournals.aob.a085949.

Maharijaya A., Vosman B. Managing the Colorado potato beetle; the need for resistance breeding. Euphytica. 2015;204 (3):487-501. DOI 10.1007/s10681-015-1467-3.

McCauley M.M., Evert R.F. Morphology and vasculature of the leaf of potato (*Solanum tuberosum*). Am. J. Bot. 1988;75(3):377-390.

Morales F., Abadia A., Abadia J., Montserrat G., Gil-Pelegrin E. Trichomes and photosynthetic pigment composition changes: responses of *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. and *Quercus coccifera* L. to Mediterranean stress conditions. Trees. 2002;16(7): 504-510. DOI 10.1007/s00468-002-0195-1.

Neal J.J., Plaisted R.L., Tingey W.M. Feeding behavior and survival of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), larvae on *Solanum berthaultii* Hawkes and an F_6 *S. tuberosum* L. × *S. berthaultii* hybrid. Am. Potato J. 1991;68(10):649-658. DOI 10.1007/BF02853740.

Neal J.J., Tingey W.M., Steffens J.C. Sucrose esters of carboxylic acids in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* deter settling and probing by green peach aphid. J. Chem. Ecol. 1990;16(2):487-497. DOI 10.1007/BF01021780.

Plaisted R.L., Tingey W.M., Steffens J.C. The germplasm release of NYL 235-4, a clone with resistance to the Colorado potato beetle. Am. Potato J. 1992;69(12):843-846. DOI 10.1007/BF02854192.

Pott C., McLoughlin S., Wu S., Friis E.M. Trichomes on the leaves of *Anomozamites villosus* sp. nov. (Bennettitales) from the Daohugou beds (Middle Jurassic), Inner Mongolia, China: Mechanical defence against herbivorous arthropods. Rev. Palaeobot. Palynol. 2012;169: 48-60. DOI 10.1016/j.revpalbo.2011.10.005.

Payyavula R.S., Singh R.K., Navarre D.A. Transcription factors, sucrose, and sucrose metabolic genes interact to regulate potato phenylpropanoid metabolism. J. Exp. Bot. 2013;64(16):5115-5131. DOI 10.1093/jxb/ert303.

Radchenko E.E. Aphid resistance in potato. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):74-82. DOI 10.18699/VJ17.225. (in Russian)

Schilmiller A.L., Last R.L., Pichersky E. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. Plant J. 2008; 54(4):702-711. DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03432.x.

Shepherd R.W., Bass W.T., Houtz R.L., Wagner G.J. Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on aerial surfaces by short glandular trichomes. Plant Cell. 2005;17(6):1851-1861. DOI 10.1105/tpc.105.031559.

Simmons A.T., Gurr G.M. Trichomes of *Lycopersicon* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. Agric. For. Entomol. 2005;7(4):265-276. DOI 10.1111/j.1461-9555.2005.00271.x.

Sizova M.A. Potato leaf pubescence as a taxonomic character. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1965;37(3):109-128. (in Russian)

Strygina K.V., Khlestkina E.K. Anthocyanin synthesis in potato (*Solanum tuberosum* L.): genetic markers for smart breeding. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017;52(1):37-49. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.37rus. (in Russian)

Tai H.H., Worrall K., Pelletier Y., De Koeyer D., Calhoun L.A. Comparative metabolite profiling of *Solanum tuberosum* against six wild *Solanum* species with Colorado potato beetle resistance. J. Agric. Food Chem. 2014;62(36):9043-9055. DOI 10.1021/jf502508y.

The Potato Genome Sequencing Consortium. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. Nature. 2011;475(7355):189. DOI 10.1038/nature10158.

Thipyapong P., Joel D.M., Steffens J.C. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. Plant Physiol. 1997;113(3): 707-718. DOI 10.1104/pp.113.3.707.

Tian D., Tooker J., Peiffer M., Chung S.H., Felton G.W. Role of trichomes in defense against herbivores: comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (*Solanum lycopersicum*). Planta. 2012;236(4):1053-1066. DOI 10.1007/s00425-012-1651-9.

Tingey W.M., Laubengayer J.E. Defense against the green peach aphid and potato leafhopper by glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. J. Econ. Entomol. 1981;74(6):721-725. DOI 10.1093/jee/74.6.721.

Tingey W.M., Plaisted R.L., Laubengayer J.E., Mehlenbacher S.A. Green peach aphid resistance by glandular trichomes in *Solanum tuberosum* × *S. berthaultii* hybrids. Am. Potato J. 1982;59(6):241-251. DOI 10.1007/BF02856560.

Tissier A. Trichome specific expression: promoters and their applications. In: Çiftçi Y.O. (Ed.). Transgenic Plants – Advances and Limitations. InTech, 2012;353-378.

Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. Environ. Chem. Lett. 2006;4(3):147-157. DOI 10.1007/s10311-006-0068-8.

Wagner G.J. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. Plant Physiol. 1991;96(3):675-679. DOI 10.1104/pp.96.3.675.

Wagner G.J., Wang E., Shepherd R.W. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. Ann. Bot. 2004;3(11):3-11. DOI 10.1093/aob/mch011.

Wang E., Gan S., Wagner G.J. Isolation and characterization of the CYP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum* L. J. Exp. Bot. 2002;53(376):1891-1897. DOI 10.1093/jxb/erf054.

Wang E., Wang R., DeParasis J., Loughrin J.H., Gan S., Wagner G.J. Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. Nat. Biotechnol. 2001;19(4):371-374. DOI 10.1038/86770.

Wang R., Zhao P., Kong N., Lu R., Pei Y., Huang C., Ma H., Chen Q. Genome-wide identification and characterization of the potato bHLH transcription factor family. Genes. 2018;9(1):54. DOI 10.3390/genes9010054.

Yu H., Kowalski S.P., Steffens J.C. Comparison of polyphenol oxidase expression in glandular trichomes of *Solanum* and *Lycopersicon* species. Plant Physiol. 1992;100(4):1885-1890. DOI 10.1104/pp.100.4.1885.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):54-59
DOI 10.18699/VJ18.331

Анапская ампелографическая коллекция – крупнейший центр аккумуляции и изучения генофонда винограда в России

М.И. Панкин[1], В.С. Петров[1], А.А. Лукьянова[2] ✉, Е.Т. Ильницкая[1], Г.Е. Никулушкина[2], А.Г. Коваленко[2], В.А. Большаков[2]

[1] Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия
[2] Анапская зональная опытная станция виноградарства и виноделия – филиал Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия, Анапа, Россия

В современном отечественном виноградарстве острой проблемой является совершенствование сортимента для создания высокоадаптивных насаждений и устойчивого производства конкурентоспособного винограда в нестабильных стрессовых погодных условиях умеренно континентального климата юга России. В этой связи актуально изучение происхождения, формирования и сохранения генетических ресурсов с целью их вовлечения в селекционный процесс для решения важнейших народно-хозяйственных задач. Возрастает роль сорта и ампелографических коллекций. Анапская ампелографическая коллекция (http://azosviv.info/category/osnovnye_razdely/anapskaya_ampelograficheskaya_kollekciya) является крупнейшим хранителем генофонда сортов винограда в России, завезенных из различных стран Европы, Азии, Америки и регионов России. В ней сконцентрирован 4921 сортообразец, в том числе *Vitis vinifera* L. – 2975, *V. amurensis* Rupr. – 40, *V. labrusca* L. – 50, межвидовые сорта *V. vinifera* L.×*V. amurensis* Rupr. – 210, *V. vinifera* L.×*V. labrusca* L. – 168, сложные межвидовые гибриды *V. vinifera* L.×гибриды SV – 220, *V. vinifera* L.×*V. amurensis* Rupr.×гибриды SV – 70 и другие образцы. На коллекции ведется научно-исследовательская работа по изучению сортов для производственных и селекционных целей. Выделяются сорта и формы по положительным хозяйственно ценным признакам – продуктивности, качественным показателям винограда, винопродукции, устойчивости к морозам, засухе и вредным организмам. Выделены, сохраняются и используются в селекции как источники хозяйственно ценных признаков на устойчивость к низким температурам во время зимовки сорта: Рислинг рейнский, Ркацители, Алиготе, Рислинг итальянский, Траминер розовый, Пино черный, Рара нягра, Каберне-Совиньон, Корна нягра, Пино серый, Гаме фрео, Саперави, Мускат оттонель, Мадлен Анжевин, Каберне фран, Хихви, Жемчуг саба, Шардоне, Красностоп Анапский, Достойный, Красностоп АЗОС и др. На базе коллекции создано 27 сортов и элитных форм, в том числе 12 сортов передано в Государственное сортоиспытание (Плутон, Мужественный, Гордый, Маран, Варваровский, Гармония, Прогресс, Горный, Сатурн, Дмитрий, Владимир, Курчанский). Проводятся молекулярно-генетические исследования накопленного генофонда и ДНК-паспортизация сортов. Изучен полиморфизм микросателлитных локусов в генотипах аборигенных донских и дагестанских сортов винограда. Выполняется ДНК-паспортизация сортов селекции СКФНЦСВВ, что перспективно для определения чистосортности посадочного материала и насаждений винограда, уточнения родительских форм образцов и в спорных вопросах авторства сорта.

Ключевые слова: генофонд; виноград; сорт; ампелография.

The Anapa ampelographic collection is the largest center of vine gene pool accumulation and research in Russia

M.I. Pankin[1], V.S. Petrov[1], A.A. Lukianova[2] ✉, E.T. Ilnitskaya[1], G.E. Nikulushkina[2], A.G. Kovalenko[2], V.A. Bolshakov[2]

[1] North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Krasnodar, Russia
[2] Anapa Zonal Experimental Station of Viticulture and Winemaking – Branch of the North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Anapa, Russia

Nowadays there is much tension in the Russian modern vine growing industry around the issue of enhancing the range of grape varieties, which is aimed at production of highly adaptive grape plants and sustainable production of competitive grape varieties in the unstable stressing weather conditions of the moderate continental climate in the south of Russia. In this view, we believe it important to carry out research into the origin, generation and preservation of genetic resources so that they can be involved in the selection process and reach most important objectives of the national economy. The role of a variety and ampelographic collections becomes more important. The Anapa ampelographic collection (http://azosviv.info/category/osnovnye_razdely/anapskaya_ampelograficheskaya_kollekciya) is Russia's largest gene pool depository of grape varieties brought from various countries of Europe, Asia and America, and Russia's regions as well. It contains 4921 grape varieties, including *Vitis vinifera* L. (2975), *V. amurensis* Rupr. (40), *V. labrusca* L. (50), the interspecies varieties *V. vinifera* L.×*V. amurensis* Rupr. (210), *V. vinifera* L.×*V. labrusca* L. (168), blended interspecies hybrids *V. vinifera* L.× hybrids SV (220), *V. vinifera* L.×*V. amurensis* Rupr.×hybrids SV (70), and other samples. We carry out extensive research into collection varieties for their production and selection. We select varieties and forms showing good agronomic characters in productivity, quality of grapes and wine products, winter hardiness, drought resistance, and resistance to pests. We have identified, preserved and now use in selection, as sources of good agronomic characters of resistance to low temperatures in winter, such varieties as Riesling of the Rhine, Rkatsiteli, Aligoté, Riesling of Italy, Traminer Pink, Pinot Noir, Rara Neagra, Cabernet Sauvignon, Coarna Neagra, Pinot Gris, Gamay Freaux, Saperavi, Muscat Ottonel, Madeleine Angevine, Cabernet Franc, Khikhvi, Pearl of Csaba, Chardonnay, Krasnostop of Anapa, Dostoiniy, Krasnostop AZOS, etc. The collection has given birth to twenty seven varieties and elite forms, of which

Received 21.11.2017
Accepted for publication 27.12.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: lykanna@list.ru

twelve varieties have been sent to the State Committee for the Testing of New Varieties of Agricultural Plants (Pluto, Muzhestvenniy (Courageous), Gordiy (Proud), Maran, Varvarovsky, Harmony, Progress, Gorniy (Mountaneous), Saturn, Dimitry, Vladimir, Kurchansky). We carry out a molecular genetic testing of the accumulated gene pool and DNA-classification of varieties. We have studied the microsatellite polymorphism in the genotypes of autochthonous grape varieties of the Don River and the Republic of Dagestan. We are performing the DNA-classification of varieties selected by the North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture (Krasnodar), which is advantageous for the identification of pure varieties in planting material and vineyards and specifying of the parent forms of grape varieties, as well as when any disputes arise as to the variety authorship.

Key words: gene pool; grapes; variety; ampelography.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Панкин М.И., Петров В.С., Лукьянова А.А., Ильницкая Е.Т., Никулушкина Г.Е., Коваленко А.Г., Большаков В.А. Анапская ампелографическая коллекция – крупнейший центр аккумуляции и изучения генофонда винограда в России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):54-59. DOI 10.18699/VJ18.331

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Pankin M.I., Petrov V.S., Lukianova A.A., Ilnitskaya E.T., Nikulushkina G.E., Kovalenko A.G., Bolshakov V.A. The Anapa ampelographic collection is the largest center of vine gene pool accumulation and research in Russia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):54-59. DOI 10.18699/VJ18.331 (in Russian)

В современном отечественном виноградарстве острой проблемой является совершенствование сортимента для создания высокоадаптивных насаждений и устойчивого производства конкурентоспособного винограда в нестабильных стрессовых погодных условиях умеренно континентального климата юга России. В этой связи актуально изучение происхождения, формирования и сохранения генетических ресурсов с целью их вовлечения в селекционный процесс для решения важнейших народно-хозяйственных задач. Фундаментальной основой для решения теоретических и прикладных задач в использовании биоразнообразия растений, в том числе винограда, служит генофонд культуры. Во всем мире (США, Германия, Франция, Китай, Индия, Испания, Италия, Словакия) изучению, сохранению и приумножению генетического потенциала культурных растений уделяется особое внимание (He et al., 2012; Jung, Fischer, 2012; Pospisilova, 2012; Авидзба и др., 2015).

В российском виноградарстве традиционно уделялось большое внимание генофонду винограда. Одна из первых коллекций была создана в 1910 г. в Анапе, на базе организованного опытного поля по виноградарству, преобразованного позднее в Анапскую зональную опытную станцию виноградарства и виноделия. В 1911–1912 гг. здесь были заложены первые виноградные насаждения на площади 10.5 га, в 1928 г. они были расширены, в том числе за счет коллекции подвойных сортов. Сортоизучение проводилось на опытном поле и производственных насаждениях винограда, которые не отличались однородностью по сортовому составу и имели примеси. При этом решалась задача идентификации сортов, их изучения и выделения наиболее продуктивных и качественных для практического использования в экологических условиях Черноморского побережья.

Наряду с сортоизучением на станции с 1928 г. велась работа по селекции. В 1928–1930 гг. в ходе селекционных работ и создания гибридных форм в количестве 1 172 шт. коллекция была расширена. В последующем из перспективных гибридных форм были выделены столовые сорта винограда Мускат ранний, Мускат АЗОС, Мускат анапский, Матовый и технические сорта Бархатный, Фруктовый. Отдельные наиболее востребованные сорта – Мускат ранний и Бархатный – до настоящего времени используют в промышленном производстве.

В послевоенные годы учеными станции было изучено свыше 600 сортов. Исследования проводили на ампелоколлекции опытной станции и на сортоучастках, заложенных в пяти совхозах и колхозах зоны деятельности станции. Весьма полезными оказались результаты изучения филлоксероустойчивости европейских сортов в корнесобственной культуре на ампелоколлекции Туапсинского опытного участка Анапской зональной опытной станции виноградарства и виноделия. С 1950 по 1966 г. изучены на устойчивость к филлоксере 117 сортов, среди которых 27 западно-европейских (*Convar occidentalis* Negr.), 60 сортов бассейна Черного моря (*Convar pontica* Negr.) и 30 сортов Восточной группы (*Convar orientalis* Negr.). По результатам этих исследований выделены неустойчивые к филлоксере сорта – 84 шт., слабоустойчивые – 28 шт. и относительно устойчивые – 5 сортов бассейна Черного моря (Мцвани, Ркацители, Санапачах, Чинури, Шааба).

В 1961 г. ампелоколлекция была перезаложена на новом месте в ОПХ «Анапа». С 1964 г. на коллекции проводилось изучение 147 столовых сортов. В 1980 г. новая посадка ампелоколлекции произведена привитыми саженцами 203 сортообразцов и 1118 гибридных форм.

Основанием для реорганизации и активного расширения действующей в настоящее время ампелографической коллекции в городе-курорте Анапе стал приказ Россельхозакадемии № 50 от 13.04.1995. Во исполнение этого приказа весной 1997 г. была активизирована закладка современной коллекции (Егоров и др., 2009). В коллекции сконцентрирован 4921 образец. В настоящее время это самая крупная коллекция генофонда винограда в России

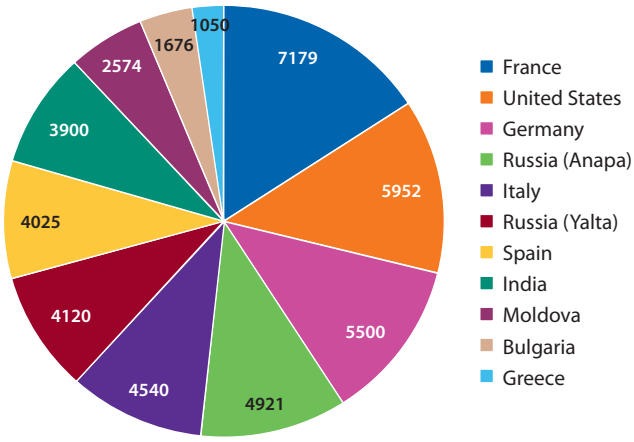


Fig. 1. World's largest grapevine gene pool collections (Polulyakh et al., 2017).

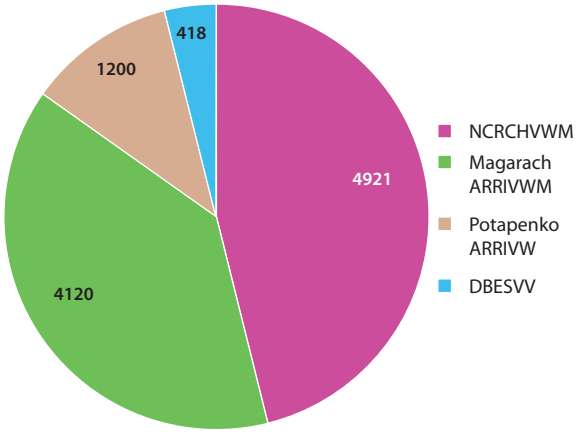


Fig. 2. Grapevine gene pool collections in Russia (Polulyakh et al., 2017; Naumova, Ganich, 2015; Nosul'chak et al., 2006).

и крупнейшая в мире после Франции, США и Германии (рис. 1 и 2).

Анапская ампелографическая коллекция формировалась за счет поступлений посадочного материала из 32 коллекций восемнадцати государств, традиционно занимающихся виноградарством. При этом самое большое количество сортообразцов получено из стран ближнего зарубежья. Из Среднеазиатского региона (Узбекистан и Туркмения) завезено 640 сортообразцов винограда, в том числе 400 сортов местной селекции (преимущественно столовые и бессемянные). Из Республики Молдова привлечено 218 сортов и гибридных форм, из Республики Грузия собрано 211 сортообразцов. Из региона северного виноградарства – Республики Беларусь – интродуцировано 90 образцов, в основном селекции ученых прибалтийских государств. Большое количество сортообразцов получено из Греции (450) и Соединенных Штатов Америки (223). Имеются сорта из Болгарии, Сербии, Чехии, Италии, Японии, Австрии, Франции, Казахстана, Армении.

В формировании коллекции активное участие принимали научно-исследовательские и учебные организации России. К примеру, от Национального НИИ виноградарства и виноделия «Магарач» было получено 1350 сортообразцов. Всероссийский НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко передал в коллекцию более 500 образцов, в том числе 162 своей селекции и 66 сортов-аборигенов Ростовской области; Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства – 56 образцов; Анапская зональная опытная станция виноградарства и виноделия – 109 образцов; Дагестанская селекционная опытная станция виноградарства и овощеводства и Дагестанская опытная станция ВИР им. Н.И. Вавилова – 176 образцов; Дальневосточная опытная станция ВИР им. Н.И. Вавилова – 168 образцов, в основном сорта и гибриды с участием *Vitis amurensis* Rupr.; Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева – 78 сортов и гибридов селекции Е.Н. Губина; Кубанский государственный аграрный университет – 33 сорта и гибрида селекции Л.П. Трошина. Значительное количество сортообразцов прошло интродукцию через Крымскую опытную селекционную станцию ВИР им. Н.И. Вавилова и Кубанский государственный аграрный университет. Генетическое разнообразие коллекции винограда в г.-к. Анапе представлено в табл. 1.

Межвидовое происхождение в анапской коллекции имеют 13.6 % сортов. В мировом каталоге на их долю приходится 27.6 % (Носульчак и др., 2006). Межвидовые сорта ампелоколлекции получены от 46 комбинаций скрещиваний 15 видов *Vitis* L. и межвидовых гибридов Сейв Виллара и Зейбеля.

От родительских форм *V. vinifera* L. × *V. amurensis* Rupr. выделено 210 сортов, *V. vinifera* L. × гибриды SV и *V. vinifera* L. × *V. labrusca* L. – 220 и 168 сортов соответственно. Привлекают внимание сорта с высокой устойчивостью к низкотемпературным стрессорам, полученные с участием *V. amurensis* Rupr. Благодаря этому качеству стало возможным продвинуть виноградарство России в более холодные регионы.

В межвидовой группе наибольшая доля сортов (90 %) от *V. vinifera* L. Далее следуют *V. amurensis* Rupr., *V. labrusca* L. и Сейв Виллара – с их участием получен каждый третий сорт. Многие из них обладают повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессорам. Гибриды Зейбеля составляют 9.6 %, *V. riparia* Michx. – 5.8 %, *V. rupestris* Scheele – 4.4 % (Носульчак и др., 2006).

По направлению использования доминируют столовые сорта. На их долю приходится 48.1 %, технические составляют 40.3 %, универсальные – 11.6 %.

В коллекции 110 бессемянных сортов – более 30 % мирового списка. Имеются межвидовые гибриды, которые привлечены впервые и в европейских странах не применялись в селекции на бессемянность (Mars, Concord seedless, Niagara seedless, Remaily seedless, Sovereign coronafion, Vanessa seedless, Venus и др.).

По срокам созревания винограда в коллекции семь групп сортов. Среди них ранние составляют 27.8 %, среднего и среднепозднего срока созревания – 48.3 %, поздние и очень поздние – 23.9 %.

Прикладное значение коллекции связано с обеспечением фундаментальных исследований, выделением источников ценных признаков для использования в комбинативной селекции в качестве родительских форм, сортов

Table 1. Genetic diversity of the Anapa grapevine collection

Species, Genetic Groups	Accessions	
	pcs	%
Vitis vinifera L. varieties, inclusive of:	2975	60.5
Local	2120	43.1
Hybrid	855	17.4
Varieties of other *Vitis* L. species, inclusive of:	90	1.8
V. amurensis Rupr.	40	0.8
V. labrusca L.	50	1.0
Interspecies varieties, inclusive of:	668	13.6
V. vinifera L. × *V. amurensis* Rupr.	210	4.3
V. vinifera L. × *V. labrusca* L.	168	3.4
Blended interspecies hybrids (*V. vinifera* L. × hybrids SV)	220	4.5
Blended interspecies hybrids (*V. vinifera* L. × *V. amurensis* Rupr. x hybrids SV)	70	1.4
Varieties of unknown origin	675	13.7
Others (clone selection, hybrid forms, wild forms, etc.)	513	10.4
Total	4921	100

Table 2. Winter hardiness of grape varieties with regard to origin

Origin	Evolved buds, %									
	0–20		21–40		41–60		61–80		81–100	
	Number of varieties									
	pcs.	%	pcs.	%	pcs.	%	pcs.	%	pcs.	%
Interspecies hybrids	26	44	18	31	11	18	4	7	0	0
	V. vinifera L.									
Intraspecies hybrids	49	62	22	28	5	6	3	4	0	0
P. occidentalis Negr.	2	100	0	0	0	0	0	0	0	0
P. orientalis Negr.	17	77	4	18	1	5	0	0	0	0
P. pontica Negr.	4	36	4	36	2	18	1	10	0	0

для адаптивного, хозяйственно-биологического испытания и применения в промышленном производстве.

Исследования показывают неодинаковую адаптивность генофонда винограда разного происхождения и видовой принадлежности в нестабильных погодных условиях умеренно континентального климата юга России. В 2006 г. после жестких условий зимовки (–28 °С) больше всего сортов высоко- и удовлетворительно устойчивых к морозу встречалось в группе межвидового происхождения. Далее в убывающем порядке следуют группа сортов *Proles pontica* Negr. (бассейн Черного моря), внутривидовых гибридов и *Proles orientalis* Negr. (Восточная группа). В группе *Proles occidentalis* Negr. (западноевропейские) не оказалось сортов, устойчивых к морозу. При понижении температуры воздуха до –28 °С у них практически полностью погибли глазки (табл. 2).

Сорта винограда разного эколого-географического происхождения показывают неодинаковый уровень реализации потенциала хозяйственной продуктивности. Наибольший потенциал хозяйственной продуктивности в агроэкологических условиях юга России проявляют автохтонные сорта и сорта местной селекции, самый низкий – у сортов-интродуцентов из Европы (рис. 3).

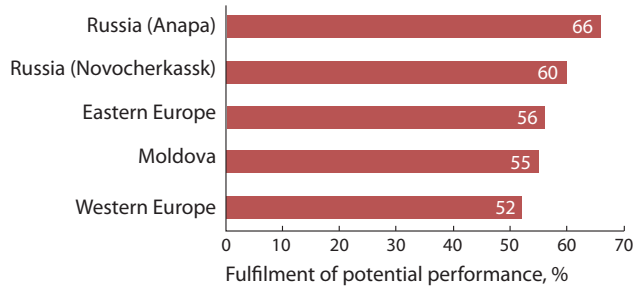


Fig. 3. Fulfilment of the potential performance of grape varieties of various ecological and geographical origins from the Anapa ampelographic collection.

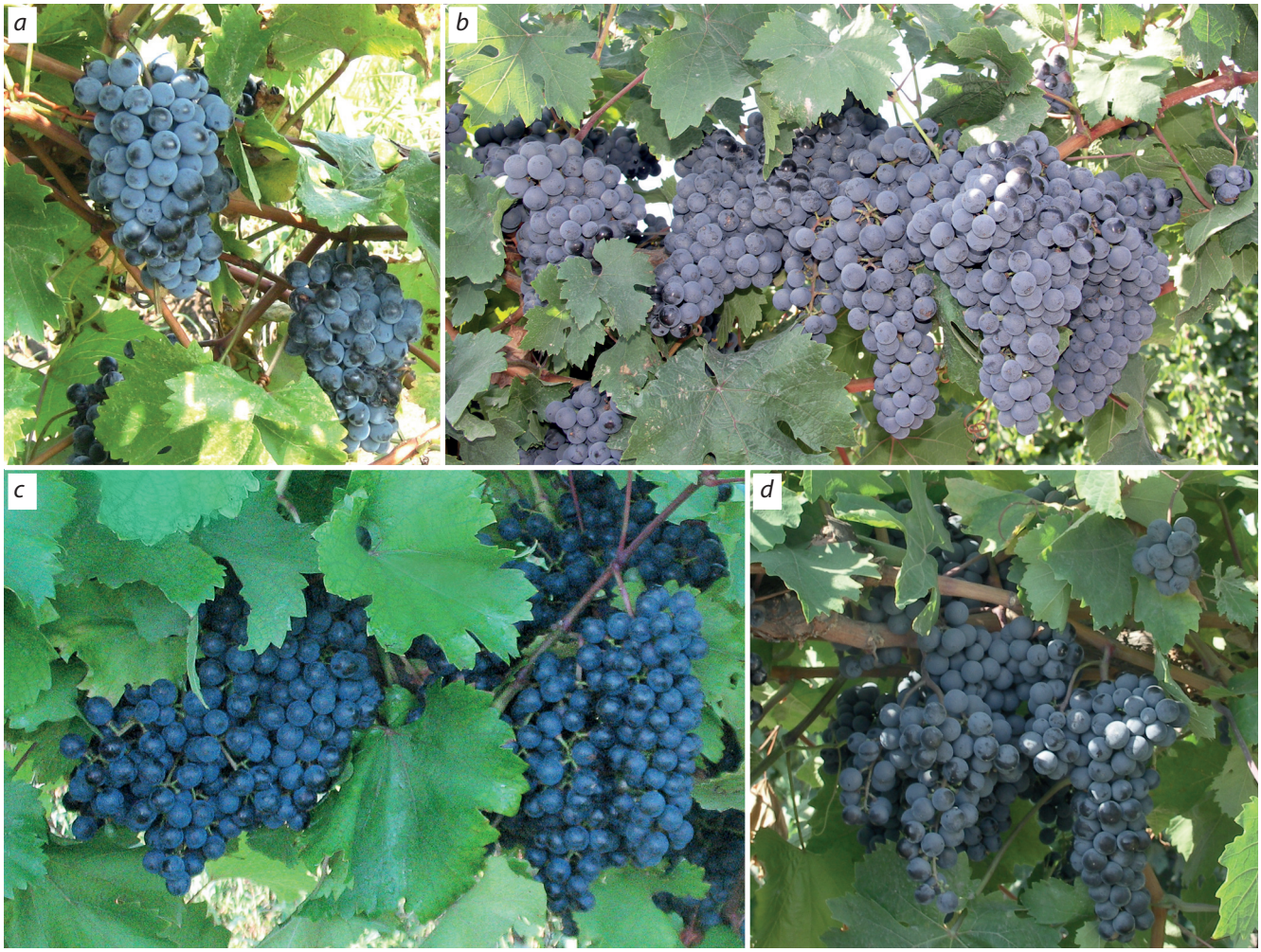


Fig. 4. Highly adaptive grape varieties used in making high quality wine:
a, Kurchanskiy; *b*, Reksavi; *c*, Dmitriy; *d*, Litdar.

За время существования ампелоколлекции для использования в селекции выделены, сохраняются и применяются источники хозяйственно ценных признаков на устойчивость к низким температурам во время зимовки – Рислинг рейнский, Ркацители, Алиготе, Рислинг итальянский, Траминер розовый, Пино черный, Рара нягра, Каберне-Совиньон, Корна нягра, Пино серый, Гаме фрео, Саперави, Мускат оттонель, Мадлен Анжевин, Каберне фран, Хихви, Жемчуг саба, Шардоне, Красностоп Анапский, Достойный, Красностоп АЗОС и др.

На базе коллекции создано 27 сортов и элитных форм, в том числе 12 сортов переданы в Государственное сортоиспытание (Плутон, Мужественный, Гордый, Маран, Варваровский, Гармония, Прогресс, Горный, Сатурн, Дмитрий, Владимир, Курчанский) (рис. 4).

Активизированы молекулярно-генетические исследования накопленного генофонда. Особое внимание уделяется ДНК-маркерной идентификации генотипов винограда, несущих гены устойчивости к милдью, одному из самых распространенных грибных заболеваний винограда. Согласно литературным данным, наиболее значимые идентифицированные к настоящему времени локусы устойчивости к милдью, с большим вкладом в фенотипическое варьирование – это гены *Rpv1*, *Rpv2*, *Rpv3*, *Rpv8*, *Rpv10*, *Rpv12* (Wiedemann-Merdinoglu et al., 2006; Welter et al., 2007; Bellin et al., 2009; Blasi et al., 2011; Schwander et al., 2012; Venuti et al., 2013). Анализ долевого участия видов в родословных межвидовых сортов Анапской ампелографической коллекции показал, что в генотипах сортов, полученных с участием сложных гибридов Зейбеля и Сейв Виллара, можно обнаружить генплазму нескольких североамериканских видов (таких как *V. rupestris*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. lincecumii*), и, следовательно, согласно родословной генотипов и опубликованным данным о донорах генов устойчивости, в таких сортах могут быть обнаружены гены устойчивости к милдью *Rpv3*, *Rpv4*, *Rpv5*, *Rpv6*, *Rpv7*, *Rpv13*, *Rpv14* (Heerden et al., 2004). Сорта, имеющие в своем происхождении дикие формы амурского винограда, могут обладать генами устойчивости к милдью *Rpv8*, *Rpv10*, *Rpv12* (Blasi et al., 2011; Schwander et al., 2012; Venuti et al., 2013). Так, внедрение методов молекулярно-генетического анализа позволяет совершенствовать работу по идентификации доноров ценных признаков.

Изучен полиморфизм микросателлитных локусов в генотипах аборигенных донских и дагестанских сортов

винограда (Ильницкая и др., 2014, 2015; Ильницкая, Токмаков, 2015). Проводится ДНК-паспортизация сортов селекции СКФНЦСВВ микросателлитными маркерами, рекомендуемыми для генотипирования *V. vinifera* (This et al., 2004), что перспективно для определения чистосортности посадочного материала и насаждений винограда, уточнения родительских форм образцов и в спорных вопросах авторства сорта.

Acknowledgments

The study was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations, program for support of bioresource collections, project 007-03-688/3.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Avidzba A.M., Volynkin V.A., Likhovskoy V.V., Polulyakh A.A., Troshin L.P. World ampelographical collection: National Research Institute of Viticulture and Wine-Making Magarach and North-Caucasian Research Institute of Horticulture and Viticulture. Politematicheskiy elektronnyy nauchnyy zhurnal KubGAU = Polythematic onlinescientific journal of Kuban State Agrarian University. 2015;110(06). (in Russian)

Bellin D., Peressotti E., Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Adam-Blondon A.F., Cipriani G., Di Gaspero G. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. Theor. Appl. Genet. 2009;120(1):163-176.

Blasi P., Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Rühl E.H., Mestre P., Merdinoglu D. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. Theor. Appl. Genet. 2011; 123(1):43-53.

Egorov Ye.A., Ilyashenko O.M., Kovalenko A.G., Nosulchak V.A., Nud'ga T.A., Pankin M.I., Petrov V.S., Serpuhovitina K.A., Sundyreva M.A., Talash A.I., Troshin L.P. Anapskaya ampelograficheskaya kollektsiya [Anapa Ampelographic Collection]. Krasnodar, 2009;215. (in Russian)

He F., Wang J., Duan C.-Q. Parental selection on wine grapevine breeding for frost hardiness in China. Interactive Ampelography and Grapevine Breeding: Collected Papers of the Int. Symp., 20–22 Sept. 2011. Krasnodar, 2012;232.

Heerden C.J., Burger P., Vermeulen A., Prins R. Detection of downy and powdery mildew resistance QTL in a 'Regent' × 'RedGlobe' population. Euphytica. 2014;200(2):281-295. DOI 10.1007/s10681-014-1167-4.

Ilnitskaya Ye.T., Tokmakov S.V. Microsatellite loci polymorphism in genotypes of native Don and Dagestan cultivars of grape. "Magarach". Vinogradarstvo i vinodelie = "Magarach". Viticulture and Winemaking. 2015;3:23-24. (in Russian)

Ilnitskaya Ye.T., Tokmakov S.V., Suprun I.I. DNA-based certification of local Don grape cultivars by SSR analysis. Nauka Kubani = Science of Kuban. 2014;4:11-14. (in Russian)

Ilnitskaya Ye.T., Tokmakov S.V, Suprun I.I., Makarkina M.V. Fingerprinting of local Dagestan grape cultivars using microsatellite analysis. Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit growing and viticulture of South Russia. 2015;31(01):22-29. Available at: http://journal.kubansad.ru/pdf/15/01/02.pdf. (in Russian)

Jung A., Fischer C. National inventory of grape genetic resources in Germany. Interactive Ampelography and Grapevine Breeding: Collected Papers of the Int. Symp., 20–22 Sept. 2011. Krasnodar, 2012;233-236.

Naumova L.G., Ganich V.A. Past and present of ampelographical collections OF National Research Institute of Viticulture and Wine-Making. "Magarach". Vinogradarstvo i vinodelie = "Magarach". Viticulture and Winemaking. 2015;3:20-22. (in Russian)

Nosulchak V.A., Smurygin A.S., Troshin L.P. Collection, preservation and analysis of the gene pool of Russian grapes. Politematicheskiy elektronnyy nauchnyy zhurnal KubGAU = Polythematic onlinescientific journal of Kuban State Agrarian University. 2006;19(03). Available at: http://www.ej.kubagro.ru/2006/03/06/. (in Russian)

Polulyakh A.A., Volynkin V.A., Likhovskoy V.V. Problems and prospects of grapevine genetic resources preservation at "Magarach" Institute. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):608-616. DOI 10.18699/VJ17.276. (in Russian)

Pospisilova D. Variety – the building stone of the vinegrowing. Interactive Ampelography and Grapevine Breeding: Collected Papers of the Int. Symp., 20–22 Sept. 2011. Krasnodar, 2012;238-252.

Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. Theor. Appl. Genet. 2012;124(1):163-176.

This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G.S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibáñez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhães R., Meredith C.P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. Theor. Appl. Genet. 2004;109:1448-1458. DOI 10.1007/s00122-004-1760-3.

Venuti S., Copetti D., Foria S., Falginella L., Hoffmann S., Bellin D., Cindrić P., Kozma P., Scalabrin S., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero D. Historical introgression of the downy mildew resistance gene *Rpv12* from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. PLoS ONE. 2013;8(4):1-7.

Welter L.J., Göktürk-Baydar N., Akkurt M., Maul E., Eibach R., Töpfer R., Zyprian E.M. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Mol. Breed. 2007;20(4):359-374.

Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Schneider C., Coste P., Onimus C., Dumas V., Merdinoglu D. Resistance to downy mildew derived from *Muscadinia rotunfifolia*: genetic analysis and use of molecular markers for breeding. Proc. 5th Int. Workshop on Grapevine Downy Mildew and Powdery Mildew,18–23 June. San Michele all´Adige, 2006;18-23.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):60-68
DOI 10.18699/VJ18.332

Оценка сортов груши, выделенных из генофондовой коллекции Никитского ботанического сада по комплексу хозяйственно ценных признаков, с помощью микросателлитных маркеров

Ю.В. Плугатарь[1], Р.Д. Бабина[2] ✉, И.И. Супрун[3], Т.С. Науменко[1], Я.И. Алексеев[4]

[1] Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Республика Крым, Россия
[2] Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, отделение «Крымская опытная станция садоводства», лаборатория селекции и сортоизучения, Симферопольский район, Республика Крым, Россия
[3] Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, лаборатория генетики и микробиологии, Краснодар, Россия
[4] Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

Мобилизация и сохранение генетических ресурсов разнообразия культурных сортов груши и ее диких сородичей являются одним из основных аспектов при создании новых сортов современного интенсивного садоводства. Решающее значение при выведении сорта имеет подбор родительских пар, обладающих комплексом положительных признаков. Целью данной работы было изучение коллекционно-селекционных насаждений генофондовой коллекции груши Никитского ботанического сада по основным хозяйственно-биологическим признакам и отбор наиболее ценных сортообразцов для использования их в селекционных программах в качестве исходного материала, а также выполнение ДНК-фингерпринтинга и оценка генетического полиморфизма выборки перспективных сортов с применением анализа микросателлитных локусов. В результате многолетних исследований по комплексу признаков выделены сорта, представляющие интерес для использования в селекционных исследованиях: Гвардейская Зимняя, Изумрудная, Изюминка Крыма, Кельменчанка, Крымская Ароматная, Крымская Медовая, Лазурная, Мария, Мрия, Надежда Степи, Незабудка, Новосадовская, Ореанда Крыма, Отечественная, Тающая, Якимовская. Образцы представленных сортов были переданы для генотипирования. Для анализа генетического полиморфизма в изучаемой группе сортов использовали семь микросателлитных ДНК-маркеров: EMPc108, EMPc117, EMPc115, CH04e03 и CH01d09, CH01f07a, CH01d08, которые были сгруппированы в два мультиплексных набора. SSR-маркеры значительно различались по уровню полиморфизма: было выявлено от трех (маркер CH04e03) до 11 (EMPc115) аллелей на локус. При этом показатель эффективного числа аллелей варьировал от 1.37 до 4.65. На основании данных оценки полиморфизма SSR-маркеров проведен анализ степени генетического сходства изученных сортов груши, который позволил оценить генетические взаимосвязи в изученной выборке генотипов. Полученные SSR-фингерпринты сортов будут использованы в качестве исходных данных для создания базы данных ДНК-паспортов сортов генофондовой коллекции груши НБС-ННЦ.

Ключевые слова: груша; хозяйственно ценные признаки; генотипирование; SSR-маркирование; генетическое разнообразие.

Microsatellites-based evaluation of the pear cultivars selected from Nikitsky botanical gardens germplasm by their economically valuable characteristics

Y.V. Plugatar[1], R.D. Babina[2] ✉, I.I. Suprun[3], T.S. Naumenko[1], Y.I. Alekseev[4]

[1] Order of the Red Banner of Labour Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS, Yalta, Republic of the Crimea, Russia
[2] Order of the Red Banner of Labour Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS, the Department of "The Crimean Horticultural Experiment Station", Selection and Cultivars Study Laboratory, Simferopol region, Republic of the Crimea, Russia
[3] North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Genetics and Microbiology Laboratory, Krasnodar, Russia
[4] The National Scientific Center of Agricultural Biotechnologies, Moscow, Russia

Mobilization and preservation of genetic sources of diversity of the cultivated pear varieties and their wild relatives is one of the main aspects of new cultivars breeding for modern intensive horticulture. The crucial matter during a new cultivar creation goes to the selection of parental pairs, which obtain a complex of positive features. The aim of this work is to study the Gene Fund collection of pear plantings from Nikitsky Botanical Gardens in accordance with the main economically important traits and to select the most valuable genotypes for using them in breeding programs as a starting material, as well as to conduct a DNA-fingerprinting and the analyses of genetic polymorphism of promising cultivars from the collection of pear with implementing of microsatellite analyses. As a result of long-term studies the following cultivars were selected in accordance with the complex of features promising for the breeding program: Gvardeiskaya Zimnyaya, Izuminka Kryma, Izumrudnaya, Kelmenchanka, Krymskaya Aromatnaya, Krymskaya Medovaya, Lazurnaya, Maria, Mriya, Nadezhda Stepi, Nezabudka, Novosadovskaya, Oreanda Kryma, Otechestvennaya, Tauschaya, Yakimovskaya. The samples of these cultivars were forwarded for genotyping. For the genetic polymorphism analyses of the studied cultivars, seven microsatellite DNA-markers – EMPc108, EMPc117, EMPc115, CH04e03 and CH01d09, CH01f07a, CH01d08 – grouped into 2 multiplex sets were used. The SSR-markers were significantly different according to their

Received 27.11.2017
Accepted for publication 20.01.2018
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: sadovodstvo.koss@mail.ru

level of polymorphism – from 3 (CH04e03 marker) to 11 (EMPc115) alleles per a gene locus were revealed, the effective number of alleles varying from 1.37 to 4.65. Based on SSR-markers polymorphism analysis data, the rate of genetic similarity of the studied pear cultivars was estimated. This evaluation research helped estimate genetic relations inside the studied sample collection of genotypes. The SSR-fingerprints of the cultivars obtained will be used as a starting material for the creation of DNA-passports database of the "NBG – NSC" Gene Fund collection of pear cultivars.

Key words: pear; economically valuable features; genotyping; SSR-markers; genetic diversity.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Плугатарь Ю.В., Бабина Р.Д., Супрун И.И., Науменко Т.С., Алексеев Я.И. Оценка сортов груши, выделенных из генофондовой коллекции Никитского ботанического сада по комплексу хозяйственно ценных признаков, с помощью микросателлитных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):60-68. DOI 10.18699/VJ18.332

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Plugatar Y.V., Babina R.D., Suprun I.I., Naumenko T.S., Alekseev Y.I. Microsatellites-based evaluation of the pear cultivars selected from Nikitsky botanical gardens germplasm by their economically valuable characteristics. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):60-68. DOI 10.18699/VJ18.332 (in Russian)

Природные условия Крыма исключительно благоприятны для промышленного выращивания высококачественных десертных сортов груши, особенно зимних и позднезимних сроков созревания. Груша была одной из главных культур в садах по долинам Южного берега и на чаирах в предгорье. В начале XX столетия удельный вес ее в садах Крыма достигал 26 %, а в Алуштинском районе – 86–87 %. Ежегодно на центральные рынки России вывозилось более 10 тыс. т плодов груши. За свои высокие вкусовые качества она приобрела известность на фруктовых рынках и успешно конкурировала с плодами Франции и Бельгии (Баскакова, 2015; Сотник, Бабина, 2016).

В мировом производстве плодов среди семечковых культур груша занимает второе место после яблони. Ежегодно в мире выращивают более 17 млн т плодов груши при средней урожайности 10.2 т/га. Лидером по производству груши считается Китай (около 8 млн т). Основными производителями в Европе являются Италия, Испания, Германия, Франция.

Ценность этой культуры заключается в больших возможностях потребления ее плодов на протяжении почти целого года как свежими, так и в различных вариантах технической переработки. Плоды десертных сортов груши отличаются маслянистой, сочной консистенцией мякоти, приятным вкусом, тонким ароматом и привлекательным внешним видом. Они содержат 10–15 % сахаров, 0.12–0.40 % кислот, 0.18–0.74 % пектиновых веществ, 11–68 мг % дубильных веществ, 30–49 мг % Р-активных веществ, 5–12 мг % витамина С. Обнаружены также витамины В2, В6, фолиевая кислота (В9), играющая большую роль в процессе кроветворения. В плодах груши в значительных количествах содержится хлорогеновая кислота, относящаяся к группе фенольных соединений. Груша – профилактическое средство при ряде заболеваний, действует как желчегонное, улучшает работу почек. Многие сорта богаты микроэлементами, особенно йодом (до 20 мг %). В листьях груши обыкновенной содержание гликозида арбутина достигает 1.4–5 %. Высокоценные в питательном отношении плоды груши пользуются большим спросом у населения. Однако их среднегодовое производство удовлетворяет потребность лишь на 10–16 %.

В соответствии с Программой развития садоводства в Республике Крым до 2025 г. запланировано увеличение площадей под этой ценной плодовой культурой, преимущественно за счет новых сортов крымской селекции (Плугатарь и др., 2017). Особая заслуга в изучении и распространении сортов груши в Крыму принадлежит известному ученому-садоводу Л.П. Симиренко. Еще в конце XIX века он детально изучил в Никитском саду коллекцию груши, насчитывающую более 500 сортов европейского и местного происхождения (Вольвач, 1996).

Мобилизация и сохранение генетических ресурсов всего разнообразия культурных сортов груши и ее диких сородичей – один из основных аспектов при создании новых сортов, отвечающих требованиям современного интенсивного садоводства для конкретных регионов выращивания данной культуры (Гиричев и др., 2012).

Благодаря использованию в селекции образцов из коллекций ВИР, собранных учеными многих поколений, в настоящее время созданы и внедрены в производство новые высококачественные сорта груши, позволившие значительно повысить урожайность и расширить ареал этой ценной плодовой культуры. Селекционерами ФГБНУ «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» (НБС-ННЦ) и Крымской опытной станции садоводства (с 2015 г. она вошла в состав НБС-ННЦ) создано более 100 сортов груши. По данным 2017 г., в Государственный реестр селекционных достижений включено и допущено к использованию 13 сортов: Васса, Гвардейская Зимняя, Десертная, Золотистая, Изумрудная, Изюминка Крыма, Мария, Мрия, Надежда Степи, Новосадовская, Отечественная, Таврическая, Якимовская.

Однако, несмотря на определенные успехи в области селекции груши, ее сортимент по-прежнему требует постоянного совершенствования и обновления сортами нового поколения. Приоритетным направлением в селекции этой ценной плодовой культуры является создание высокоадаптивных и продуктивных сортов с высоким качеством плодов, пригодных для промышленного выращивания по интенсивным технологиям в условиях Крыма и других южных регионов.

Решающее значение при создании сорта имеет подбор родительских пар, обладающих комплексом положительных признаков. Развитие методов молекулярного ДНК-маркирования и их внедрение в научную практику способствуют повышению эффективности выполнения исследований, направленных на выяснение генетических взаимосвязей образцов на внутри- и межвидовом уровне и изучение генетической структуры коллекций генофондов, создание стержневых (core) коллекций, паспортизацию и регистрацию имеющегося генофонда. Помимо этого, методы ДНК-маркирования могут быть эффективно использованы для поиска доноров генов селекционно-ценных признаков, выявления дублирующих образцов, решения спорных вопросов при включении вновь поступивших образцов. Перспективным может оказаться использование данных об уровне генетического сходства в комплексе с фенотипической характеристикой сортов при формировании родительских пар при гибридизации в селекционных программах.

В работах по изучению генетического разнообразия, идентификации сортов наиболее распространенными и высокоэффективными являются маркерные системы, основанные на вариабельности микросателлитных последовательностей генома. Микросателлиты (simple sequence repeats – SSR) – тандемные повторы простых последовательностей в структуре ДНК, источник полиморфизма которых – сайт-специфическое варьирование длины повтора, что, в свою очередь, обусловлено различием в числе единиц повтора (Schlotterer, Soller, 1997). Микросателлитные последовательности распространены повсеместно в геноме высших растений. Преимущества SSR-маркеров – кодоминантный тип наследования, высокая дифференцирующая способность, воспроизводимость результатов.

Данный тип ДНК-маркеров широко используется в изучении генетического разнообразия груши. При этом спектр исследований варьирует от изучения генетической структуры природных популяций дикорастущих видов до анализа генетической структуры коллекций генетических ресурсов и выяснения путей формирования локальных культурных генофондов, в том числе автохтонной генплазмы. В некоторых работах сочетаются анализ фенотипического варьирования признаков и SSR-генотипирование для всесторонней оценки генофонда. Так, в работе исследователей из Индии была выполнена оценка генетического разнообразия и структуры коллекции из 48 образцов рода *Pyrus* на основе анализа 23 фенотипических характеристик и 20 SSR-маркеров (Rana et al., 2015). Примеры использования SSR-маркеров для выполнения популяционно-генетических исследований известны для различных видов рода *Pyrus*: *P. pyraster* (Wolko et al., 2015; Reim et al., 2017), *P. calleryana* (Liu et al., 2012), *P. caucasica* (Токмаков, Супрун, 2016). Широко применяются SSR-маркеры и для анализа генетической структуры коллекций сортов и их паспортизации (Brini et al., 2008; Tian et al., 2012; Sehic et al., 2012), а также для выяснения вероятных путей формирования автохтонного генофонда (Brini et al., 2008; Супрун и др., 2016).

Очевидно, что на современном этапе развития селекционно-генетических исследований SSR-фингерпринтинг сортов дополняет описание по основным хозяйственно-биологическим признакам и позволяет точно идентифицировать сорта, устанавливать их происхождение, выявлять синонимы и примеси в коллекциях, оценивать уровень генетического полиморфизма в коллекции по результатам анализа аллельного набора SSR-маркеров, использованных для генотипирования.

В связи с этим целью нашей работы было изучение коллекционно-селекционных насаждений груши по основным хозяйственно-биологическим признакам и отбор наиболее ценных сортообразцов для использования их в селекционных программах в качестве исходного материала, а также выполнение ДНК-фингерпринтинга и оценка генетических связей в выборке из 16 перспективных сортов, представляющих Генофондовую коллекцию груши НБС-ННЦ, по результатам анализа микросателлитных локусов.

Материалы и методы

Объектом исследований в период с 2000 по 2017 г. служила генетическая коллекция сортов груши НБС-ННЦ, произрастающая в условиях предгорной и степной части Крыма, на территории участков лаборатории предгорного садоводства (Бельбекская долина), лаборатории селекции и сортоизучения плодовых культур (бывшая Крымская опытная станция садоводства, с. Маленькое) и лаборатории степного садоводства (с. Новый сад).

Коллекция груши насчитывает 1216 сортообразцов, в том числе 270 селекционных форм. Рабочий гибридный фонд составляет около 3 тыс. гибридов. Схема посадки деревьев 4 × 2; 4 × 1.5; 4 × 3 м. Подвой – айва ВА 29 и сеянцы лесной груши. Почва содержится под черным паром, орошение стационарное. Агротехнические мероприятия в саду общепринятые. Климат здесь засушливый, с довольно мягкой, короткой и неустойчивой зимой, характеризующейся сменяющимися оттепелями и похолоданиями, а также возвратными весенними заморозками. В летний период температура в полуденные часы поднимается до 26–28 °С, абсолютный максимум 39 °С. Средняя температура января составляет –1 °С, февраля –0.3 °С, возможно ее понижение до –27…–32 °С. Годовое количество осадков в среднем достигает 480 мм (Антюфеев и др., 2002). Исследования проводили в соответствии с «Программой и методикой селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (1980, 1999). Для анализа погодных условий использовали данные метеопоста отделения «Крымская опытная станция садоводства».

Объектом исследований для ДНК-маркирования послужили 16 районированных и перспективных для Крыма и Южного федерального округа сортов груши отечественной селекции (Гвардейская Зимняя, Изумрудная, Изюминка Крыма, Кельменчанка, Крымская Ароматная, Крымская Медовая, Лазурная, Мария, Мрия, Надежда Степи, Незабудка, Новосадовская, Ореанда Крыма, Отечественная, Тающая, Якимовская).

Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев с использованием метода ЦТАБ (Murray, Thompson, 1980). ПЦР выполняли в общем объеме 25 мкл при следующих концентрациях компонентов реакционной смеси: 1.5 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0.3 мкМ каждого праймера (ООО «Синтол»), 2.5 мкл ПЦР-буфера, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим»), 50 нг ДНК.

Амплификацию проводили по следующей программе: 1 мин при 94 °С; следующие 35 циклов: 10 с при 94 °С, 30 с при 58 °С, 30 с синтез при 72 °С; финальный цикл синтеза – 2 мин при 72 °С.

В работе использовано семь микросателлитных маркеров, сгруппированных в два мультиплексных набора. В каждом наборе SSR-маркеры были сгруппированы с учетом диапазонов размеров амплифицированных фрагментов и несли разные флуоресцентные метки (ROX, TAMRA, R6G или FAM). Набор 1: EMPc108 (R6G), EMPc117 (TAMRA), EMPc115 (ROX), CH04e03 (TAMRA); набор 2: CH01d09 (ROX), CH01f07a (TAMRA), CH01d08 (FAM). Мультиплексные наборы сформированы с учетом результатов ранее выполненных исследований (Супрун и др., 2013).

Фрагментный анализ проводили на генетическом анализаторе ABIprism 3130, данные обрабатывали в программе GeneMapper 4.1. При анализе полиморфизма рассчитывали количество выявленных аллелей (Na) по изученным SSR-локусам, наблюдаемую гетерозиготность (Ho). Ожидаемую гетерозиготность (He) и эффективное число аллелей (Ne) рассчитывали по формулам

$$He = 1 - p_i^2, \quad Ne = 1/\sum p_i^2,$$

где p_i – частота i-го аллеля в локусе.

Кластерный анализ выполнен методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA), анализ методом главных координат (PCoA) – с использованием пакета программ PAST.

Результаты и обсуждение

В настоящее время генофондовая коллекция груши в Крыму сосредоточена в Никитском ботаническом саду и представлена значительным генетическим и эколого-географическим разнообразием. Это сорта из Украины (37.2 %), Европы (20.8 %), России (7.5 %), республик СНГ (10 %), США (3 %) и ряда других стран. Многочисленную группу (18.4 %) составляют сорта и селекционные формы крымской селекции (Никитский ботанический сад и Крымская опытная станция садоводства). Среди изучаемых сортов 15 триплоидных и 3 тетраплоидных.

Сроки цветения. В условиях Крыма массовое цветение груши наблюдается во второй декаде апреля. По многолетним данным о сроках цветения установлено, что из 260 изучаемых сортов 13.2 % относятся к раннецветущим, 60.3 % – к среднецветущим. В наиболее ценную позднецветущую группу входят 26.5 % сортов. Среди них особый интерес для использования в селекционных исследованиях на позднее цветение представляют районированные и перспективные сорта селекции Никитского ботанического сада: Арбоск, Гвардейская Зимняя, Десертная, Джанкойская, Красавица Тавриды, Мария, Незабудка, Отечественная, Салгирская Зимняя, Тающая, Якимовская и др.

Устойчивость цветков груши к весенним заморозкам. Несмотря на то что Крым является весьма благоприятным регионом для выращивания высококачественных сортов груши, здесь довольно часто бывают стрессовые ситуации, которые наносят существенный ущерб плодовым насаждениям этой ценной культуры. Главные из них – низкие температуры и резкие их колебания в зимний период, частые оттепели, а также весенние заморозки в период цветения (Симиренко, 1972; Бабина, 2001).

Анализ метеорологических условий за последние 50 лет показал, что в Крыму заморозки во время цветения груши бывают раз в два-три года. Гибель цветков происходит при температуре –2…–3 °С, а молодые завязи могут выдерживать продолжительные заморозки до –2…–4 °С. Существующие на сегодня доступные меры по защите плодовых насаждений от заморозков не всегда эффективны и достаточно дорогостоящие. Основной путь для снижения вероятности повреждения цветков заморозками – это создание и внедрение в производство новых сортов с поздним цветением и высокой устойчивостью цветков к низким температурам.

По многолетним исследованиям установлено, что в зависимости от сорта степень повреждения цветков заморозками в коллекционных насаждениях варьировала от 0 до 90 %. Полученные данные позволили выделить сорта с высокой устойчивостью (до 30 %) генеративных органов к низким температурам. К ним относятся: позднецветущие – Арбоск, Бере Арданпон, Буковинка, Гвардейская Ранняя, Гурзуфская, Десертная, Жанна д'Арк, Мария, Мервей Рибе, Первомайская, Якимовская; среднецветущие – Золотистая, Золушка, Изумрудная, Изюминка Крыма, Мраморная, Надежда Степи, Ноябрьская Молдавии, Ореанда Крыма, Таврическая.

Выделенные по этому признаку сорта представляют интерес для промышленного выращивания в регионах с повышенной опасностью весенних заморозков в период цветения, а также для использования в селекционных исследованиях.

Скороплодность и урожайность груши. Одним из главных факторов увеличения производства плодов груши является внедрение новых скороплодных и высокоурожайных сортов, в высокой степени адаптированных к природным условиям Крыма. Сорта, вступившие в плодоношение в более ранние сроки, значительно быстрее окупают капитальные затраты на закладку сада и уход за молодыми насаждениями в сравнении с сортами, вступающими в плодоношение в более поздние сроки.

С целью выявления скороплодных сортов проведена оценка по времени вступления в пору плодоношения 220 сортов, привитых на айве ВА 29. В результате исследований установлено, что 180 сортов начали плодоносить в 3–4-летнем возрасте. Среди них районированные и перспективные сорта собственной селекции: Десертная, Дива, Золотистая, Золушка, Изюминка Крыма, Лазурная, Мария, Мрия, Надежда Степи, Новосадовская, Ореанда Крыма, Старокрымская, Таврическая, Якимовская. В более поздние сроки – на 4–5-й год заплодоносили 40 сортов.

По урожайности изучаемые сорта груши объединены в четыре группы:

– высокоурожайные (более 30 т/га). В эту группу вошло 85 сортов, в том числе: Десертная, Дива, Золушка, Изумрудная, Изюминка Крыма, Красавица Тавриды, Киргизская Зимняя, Крымская Медовая, Лазурная, Надежда Степи, Ореанда Крыма, Таврическая, Якимовская;
– урожайные (20.1–30.0 т/га). Всего 101 сорт: Васса, Виктория Крыма, Виола, Деканка Зимняя, Золотистая, Кель-

менчанка, Наталка, Незабудка, Отечественная, Памяти Милешко, София, Старкримсон, Тающая и др.;
– среднеурожайные (15.1–20.0 т/га). Всего 20 сортов: Бере Арданпон, Гранд Чемпион, Ласточка, Любимица Клаппа, Мервей Рибе, Санта Мария и др.;
– малоурожайные (ниже 10 т/га). Эту группу пополнили 14 сортов, в том числе Бере Прекос Мореттини, Вильямс Руж Дельбара, Курортница и др.

Устойчивость к парше. Болезни и вредители плодовых культур существенно снижают урожаи и ухудшают товарные качества плодов. Наибольший вред плодовым культурам, в частности груше, наносит парша. В борьбе с паршой достаточно эффективно использование фунгицидов. Однако их применение сопряжено с повышением себестоимости продукции, а главное, приводит к загрязнению окружающей среды, нарушению взаимосвязей в естественных биоценозах, уничтожению не только возбудителей болезней, но и полезных насекомых и микроорганизмов. В связи с этим основным направлением в защите растений должно быть использование устойчивых сортов.

Из 558 исследуемых сортов с высокой устойчивостью к парше (0–0.5 балла) выделено около 100 образцов. Среди них заслуживают внимания для внедрения в производство и использования в селекционных программах: Виола, Гвардейская Ранняя, Гранд Чемпион, Гурзуфская, Десертная, Золотая Осень, Золушка, Изюминка Крыма, Изумрудная, Крымская Ароматная, Крымская Медовая, Лазурная, Мария, Мрия, Надежда Степи, Отечественная, Степная Красавица, Сокровище, Тающая, Якимовская.

Сроки созревания и качество плодов. В сортименте груши остро ощущается недостаток ультраранних и позднезимних сортов. Известно, что у большинства видов и сортов груши в процессе эволюции сформировалось свойство осеннего срока созревания плодов. Этот признак доминирует, поэтому отбор и создание новых раннеспелых и позднезимних сортов является актуальной задачей. Многолетнее изучение 780 сортов груши различного эколого-географического происхождения позволило по срокам созревания разделить их на раннелетние, летние, осенние, зимние, позднезимние.

К раннелетним отнесены 22 сорта. Среди них – Бере Жиффар, Енисейка, Земистане, Красивая, Магдалина Зеленая, Молдавская Ранняя, Пловдиска, Солнечная, Трапезица, Ультраранняя и др.

Летнюю группу представляют 107 сортов, среди них – Белка, Бере Прекос Морретини, Вильямс, Вильямс Руж Дельбара, Гвардейская Ранняя, Именинница, Любимица Клаппа, Ореанда Крыма, Степная Красавица, Старкримсон.

В наиболее многочисленную осеннюю группу входят 328 сортов, в том числе районированные и перспективные: Виктория, Гранд Чемпион, Десертная, Крымские Зори, Лазурная, Надежда Степи, Новосадовская, Старокрымская, Санта Мария, Таврическая, Якимовская.

Зимнюю и позднезимнюю группу представляют 323 сорта: Бере Арданпон, Васса, Гвардейская Зимняя, Деканка Зимняя, Джанкойская Зимняя, Дива, Золотистая, Изумрудная, Изюминка Крыма, Кельменчанка, Киргизская Зимняя, Крымская Зимняя, Мария, Мрия, Наталка, Незабудка, Оливье де Серр, Отечественная, Пасс Крассан, София, Триумф Пакгама, Тающая и др.

При внедрении в производство новых сортов груши большое внимание уделяется величине и внешнему виду плодов, которые характеризуют их товарность. По определению Л.П. Симиренко, «Груша должна быть, прежде всего, крупной и красивой: если она невзрачна и малого размера, то никакие вкусовые достоинства не сделают ее прибыльным сортом» (Симиренко, 1972). В результате проведенных исследований изучаемые сорта груши по средней массе плодов распределены на четыре группы: исключительно крупные (более 350 г), очень крупные (251–350 г), крупные (201–250 г), выше (151–200 г) и ниже средней величины (менее 150 г).

Исключительно крупные плоды отмечены у 23 сортов, в том числе: Бере Крыма, Выставочная, Львовский Сувенир, Наталка, Реале Туринская Тающая, Фрагранте. Очень крупные плоды определены у 150 сортов, среди них – Амазонка, Бирюзовая, Выставочная, Дюшес Ангулем, Жак Телье, Карл Вюртембергский, Кельменчанка, Ле Брюн, Легенда, Маргарита Марилья, Незабудка, Орбита, Пасс Крассан, Сильва, Старокрымская София, Ракета, Verna и др. Большинство (325) изучаемых сортов имеют плоды массой 200–250 г.

По вкусовым качествам основная масса сортов (83 %) оценена на 4.5–5 баллов. Особую ценность за высокие вкусовые качества и привлекательный внешний вид плодов представляют сорта: Арбоск, Выставочная, Десертная, Доктор Жюль Гюйо, Жанна д'Арк, Изюминка Крыма, Красавица Тавриды, Крымская Ароматная, Крымская Медовая, Мрия, Мария, Меллина, Нектарная, Новосадовская, Отечественная, Осенняя Костыка, Санта Мария, Тающая, Хайланд, Якимовская и др.

Учитывая ценность свежих плодов груши, которые являются важной составной частью рациона сбалансированного питания человека, садоводство должно обеспечить население плодами круглогодично. Поэтому важно не только вырастить и собрать их, но и сохранить с минимальными потерями в течение максимального срока. Изучение коллекционного фонда груши по продолжительности хранения плодов позволило выделить сорта с наиболее длительной лежкоспособностью (180–240 дней): Аббат Фетель, Гвардейская Зимняя, Доктор Тиль, Жанна д'Арк, Изумрудная, Изюминка Крыма, Кельменчанка, Крымская Медовая, Мария, Мрия, Наталка, Ноябрьская Молдавии, Оливье де Серр, Отечественная, Пасс Крассан, София, Салгирская Зимняя, Тающая, Форель Зимняя и др.

В результате многолетних исследований выделены сорта селекции Никитского ботанического сада, представляющие интерес для использования в селекционных программах в качестве источников ценных признаков. Краткая характеристика их основных параметров представлена в табл. 1.

При проведении генотипирования оптимальное объединение SSR-маркеров в мультиплексных наборах, выполненное с учетом диапазонов длин амплифицируемых фрагментов по конкретным локусам, согласно литературным данным, и температурам отжига праймерных пар, позволило эффективно идентифицировать целевые фрагменты при выполнении фрагментного анализа.

Table 1. Main sources of commercially valuable traits of pear cultivars selected for use in breeding and genetic studies

Cultivar	Ripening Term (third of the month.)	First year of fruiting	Frost resistance of flowers, %	Disease resistance, score		Output per hectare, tons	Fruit quality		Storage time, days
				scab	thermal burn of leaves		weight, g	taste, score	
Gvardeiskaya Zimnyaya	1.10	3–4	5–7	0.5	1.0	28–30	250	4.5	240
Izumrudnaya	1–2.10	3–4	5–10	0.5	0.5	35–37	320	4.7	240
Izyuminka Kryma	3.09	3	10–20	0.2	0.5	30–35	290	4.8	220
Kelmenchanka	1.10	3	12–15	0	0	28–30	280	4.5	210
Krymskaya Aromatnaya	1.09	3	15–19	0.5	1.5	28–32	310	4.9	95
Krymskaya Medovaya	3.09	3–4	15–20	0	0	32–35	320	5.0	210
Lazurnaya	1–2.09	3	7–9	0	0.5	32–35	290	5.0	110
Mariya	1–2.10	3	5–8	0	0	38–45	260	4.9	240
Mriya	2–3.09	3–4	10–15	0.5	0.5	32–35	270	5.0	220
Nadezhda Stepi	1.09	3–4	10–18	0.5	1.0	28–30	210	4.7	90
Nezabudka	1.10	3	5–9	1.0	0.5	27–29	280	4.5	190
Novosadovskaya	–	3–4	5–10	0.5	0.5	–	220	4.5	150
Oreanda Kryma	3.08	3	3–5	1.0	0.5	35–38	210	4.8	90
Otechestvennaya	2–3.09	3–4	5–7	0.5	0	23–25	310	5.0	220
Tayushchaya	2–3.09	4	10–12	0	0.5	25–28	380	4.8	210
Yakimovskaya	1.09	3	5–7	0	0	35–40	290	4.9	120

Note. Dash-no data.

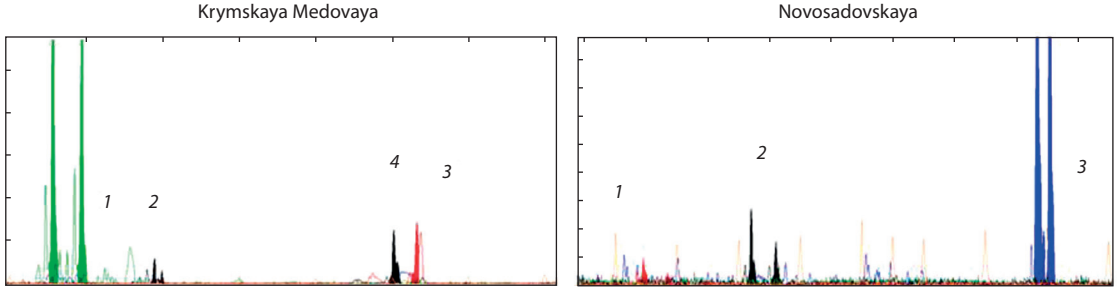


Fig. 1. Allele profiles for the SSR marker set. Krymskaya Medovaya: *1*, EMPc108 (R6G); *2*, EMPc117 (TAMRA); *3*, EMPc115 (ROX); *4*, CH04e03 (TAMRA). Novosadovskaya: *1*, CH01d09 (ROX); *2*, CH01f07a (TAMRA); *3*, CH01d08 (FAM).

На рис. 1 представлены аллельные профили образцов Крымская Медовая и Новосадовская по различным наборам SSR-маркеров. Наличие двух пиков по каждому маркеру говорит о гетерозиготности изучаемого образца по данным локусам.

В результате анализа изученной выборки сортов были получены уникальные (генотип-специфичные) SSR-фингерпринты для всех изученных сортов (табл. 2). Размер амплифицированных фрагментов указан в парах оснований. Как видно из табл. 2, количество выявленных аллелей и гетерозиготность, характеризующаяся одновременным присутствием двух амплифицированных фрагментов разного размера, сильно различаются.

Показатели, характеризующие уровень гетерогенности изученной выборки образцов груши и полиморфизм SSR-маркеров, приведены в табл. 3. Из данных табл. 2 и 3 видно, что уровень аллельного полиморфизма по SSR-маркерам, использованным в работе, значительно варьирует: от трех аллелей по маркеру CH04e03 до 11 – по маркеру EMPc115.

При этом величина показателя Ne (количество эффективных аллелей) не для всех маркеров одинаково пропорционально высока при высоком значении показателя Na (количество выявленных аллелей) (см. табл. 3). В первую очередь это обусловлено неравномерным распределением частот встречаемости аллелей SSR-маркеров. При отборе SSR-маркеров для выполнения дальнейших исследований по изучению генетической структуры коллекции и ДНК-паспортизации сортов необходимо учитывать оба этих показателя. На данный момент можно сказать о низ-

Table 2. Microsatellite DNA-profiles of the studied pear cultivars from the NBG – NSC gene pool collection

Variety	EMPc108		EMPc117		EMPc115		CH04e03		CH01d09		CH01f07a		CH01d08	
Gvardeiskaya Zimnyaya	88	91	101	103	181	200	180		157		183	186	275	
Izumrudnaya	91		120	124	202		180		151	153	183		275	278
Izyuminka Kryma	88		103	105	176	186	180	206	151	157	183	197	281	
Kelmenchanka	82	91	120		186		180		131	157	183	186	275	281
Krymskaya Aromatnaya	91		118	120	183	192	180		153	157	179	186	275	281
Krymskaya Medovaya	91	99	118	120	196		180		153	157	183	186	278	281
Lazurnaya	91	99	118	120	186		180		131		183	186	278	281
Mariya	99		118	120	186	202	180		153	157	183	192	277	281
Mriya	84	88	120	124	182	186	180		135	153	186	193	275	281
Nadezhda Stepi	88	102	105		184	186	197		131	157	179	201	238	278
Nezabudka	91		98	120	186		180		131	151	183	211	278	281
Novosadovskaya	91	112	120		180	182	197		149	157	183	192	277	281
Oreanda Kryma	91	108	114	122	186		180		135	153	179	183	278	281
Otechestvennaya	99		99	105	186		180		153		183	186	281	
Tayushchaya	91		99	120	186		180		153	157	183	186	275	281
Yakimovskaya	108		114	120	182	186	180		143	157	179	183	275	278

Table 3. Polymorphism for SSR loci studied in 16 pear varieties from the NBG – NSC gene pool collection

Index	EMPc108	EMPc117	EMPc115	CH04e03	CH01d09	CH01f07a	CH01d08
Na	8	10	11	3	7	8	5
Ne	3.793	4.655	3.220	1.373	4.231	3.606	3.261
Ho	0.500	0.813	0.500	0.063	0.813	0.938	0.813
He	0.736	0.785	0.689	0.271	0.764	0.723	0.693

Designations: N, number of accessions in the group of genotypes under study; Na, number of detected alleles; Ne, number of effective alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity.

кой перспективности дальнейшего использования SSR-маркера CH04e03. Возможна его замена в мультиплексном наборе 1 на SSR-маркер с близким диапазоном амплифицируемых фрагментов.

При сравнении уровня генетического разнообразия изученной выборки сортов груши и коллекций сортов груши из других регионов мира наиболее наглядным было бы сопоставление с результатами работы (Sehic et al., 2012), в которой использовался набор из десяти SSR-маркеров для анализа выборки, включающей сорта шведской и мировой селекции из разных регионов мира. В этом исследовании были использованы SSR-маркеры EMPc117, CH04e03, CH01d09, CH01f07a и CH01d08, которые рассматривались и в нашей работе. В цитируемой работе при анализе выборки из 50 сортов по маркерам CH04e03 и CH01d08 было выявлено 6 и 7 аллелей соответственно – наименьшие показатели из всех SSR-маркеров. В нашем исследовании эти маркеры тоже проявили наиболее низкий уровень полиморфизма (3 и 5 аллелей). Для маркеров EMPc117, CH01d09 и CH01f07a было выявлено 12, 15 и 14 аллелей на локус. За исключением SSR-маркера CH01d09, это сопоставимые результаты по уровню полиморфизма: маркеры EMPc117 и CH01f07a по результатам нашего исследования также можно отнести к более полиморфным. Различия по уровню полиморфизма SSR-маркера CH01d09 (у шведского коллектива он наиболее полиморфен – 15 аллелей) могут объясняться различиями в уровне полиморфизма участка его геномной локализации в генофонде груши из разных регионов. В целом можно сделать заключение, что изученная выборка крымских сортов обладает высоким уровнем аллельного полиморфизма SSR-маркеров, участвующих в исследовании. Это может быть обусловлено вовлечением в селекцию сортов из разных регионов мира (Бельгия, Франция, Германия, США).

Для анализа генетических взаимосвязей в экспериментальной выборке сортов, на основе данных SSR-генотипирования был выполнен кластерный анализ и анализ методом главных координат (рис. 2 и 3).

Анализ полученной в результате кластеризации дендрограммы позволяет выделить в выборке исследованных сортов две основные группы (кластера). В первый кластер вошли сорта Изюминка Крыма и Гвардейская Зимняя, ко-

торые имеют в качестве материнского компонента формы, полученные из США. Второй кластер включает 12 сортов: Кельменчанка, Тающая, Лазурная, Крымская Медовая, Незабудка, Отечественная, Мария, Изумрудная, Мрия, Крымская Ароматная, Якимовская, Ореанда Крыма. В качестве родительских форм при их создании использовались сорта из Западной Европы (Франция, Бельгия, Германия). Шесть сортов из этой группы, как следует из результатов анализа методом главных координат, генетически более однородны и образуют отдельную группу (см. рис. 3).

Внутри второго кластера в отдельные подкластеры выделились сорта Мрия и Крымская Ароматная, а также Якимовская и Ореанда Крыма. В результате микросателлитного анализа исследуемых пар сортов именно эти пары оказались наиболее сходны друг другу. Генетическое сходство объясняется происхождением (исключительно из Бельгии) форм, участвовавших в скрещиваниях при создании сортов.

Сорта Новосадовская и Надежда Степи выделены в отдельные ветви дендрита, и кроме того, в пространстве главных координат эти образцы также наиболее удалены от остальных (см. рис. 3). Рассматривая происхождение этих двух сортов, можно сделать вывод о соответствии данных об их происхождении и отнесении их в отдельные группы (аутгруппы). Так, сорт Надежда Степи, выделенный в аутгруппу и максимально генетически удаленный от всех сортов из экспериментальной выборки, является сеянцем от свободного опыления сорта Марианна (Бельгия), который не представлен в родословной ни одного из изученных сортов. Сорт Новосадовская, несмотря на то, что имеет в качестве одной из родительских форм сорт Оливье де Серр (Франция), тоже выделен в отдельную ветвь, что может быть обусловлено влиянием аллелей, унаследованных от второй родительской формы – сорта Триумф Виены (Франция), который не представлен в родословной ни одного из сортов выборки.

В целом, оценивая распределение сортов в иерархическом дендрите, полученном по данным UPGMA-анализа, и результаты анализа методом

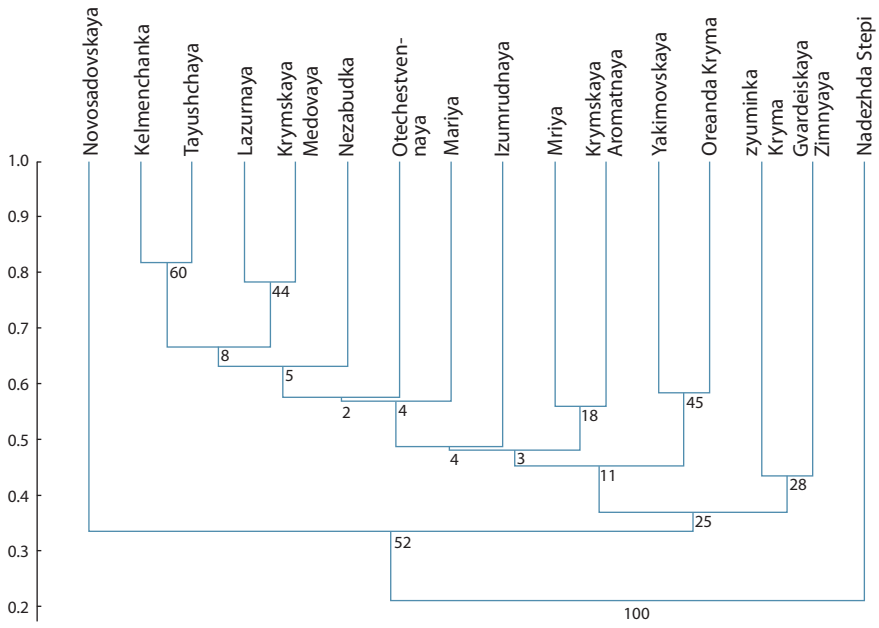


Fig. 2. UPGMA clusterization of pear specimens studied.

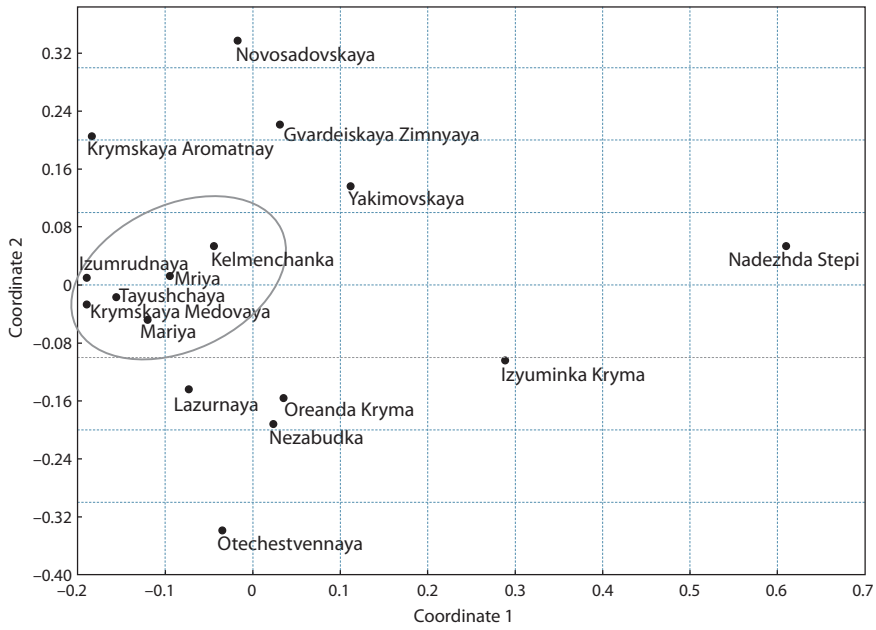


Fig. 3. Distribution of pear specimens studied in the principal coordinate space.

главных координат, можно сказать о наличии группы сортов, отнесенных ко второму кластеру, генетически близких друг другу.

Это может быть следствием использования в качестве родительских форм узкой группы сортов из Бельгии и Франции. Так, сорт Деканка Зимняя (Бельгия) указан как родительская форма у четырех сортов, сорт Бере Боск – у трех, Оливье де Серр – тоже у трех. Поскольку в изучаемую выборку вошли наиболее перспективные сорта селекции НБС-ННЦ, это может свидетельствовать о перспективности использования в селекции сортов из Франции и Бельгии. При этом для повышения уровня гетерогенности перспективно формирование родительских пар с учетом как комплекса фенотипических признаков, так и степени их генетического сходства – для обеспечения наибольшего генетического разнообразия в гибридном фонде.

Заключение

В результате многолетних исследований выделены сорта груши по основным хозяйственно-биологическим признакам, представляющие интерес для использования их в качестве родительских форм и для выращивания в промышленных насаждениях по интенсивным технологиям. Использование в селекционных программах коллекционных сортов различного эколого-географического происхождения позволило создать в НБС-ННЦ более 100 сортов, 13 из которых включены в Государственный реестр селекционных достижений и допущены в производство: Васса, Гвардейская Зимняя, Десертная, Золотистая, Изумрудная, Изюминка Крыма, Мария, Мрия, Надежда Степи, Новосадовская, Отечественная, Таврическая, Якимовская.

Для выделенных образцов был проведен ДНК-фингерпринтинг и изучен генетический полиморфизм ряда сортов из Генофондовой коллекции груши НБС-ННЦ с применением анализа микросателлитных локусов. Использование семи микросателлитных маркеров позволило идентифицировать изученные сорта груши и объективно охарактеризовать степень их генетического родства. Полученные результаты показывают перспективность применения в селекции сортов из Франции и Бельгии. Для обеспечения наибольшего генетического разнообразия в гибридном фонде коллекции груши НБС-ННЦ следует учитывать при формировании родительских пар как комплекс фенотипических признаков, так и степень их генетического сходства.

Acknowledgments

The study was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations, program for development of gene pool collections, project 0829-2017-0002. SSR genotyping was performed at the Genomic and Postgenomic Technologies Shared Access Center, North Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture, Viticulture, and Wine-Making, Krasnodar, Russia.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Antufeev V.V., Vazhov V.I., Ryabov V.A. Spravochnik po klimatu stepnogo otdeleniya Nikitskogo botanicheskogo sada [The guide of climate conditions of the steppe department of the Nikitsky Botanical Gardens]. Yalta, 2002.

Babina R.D. Economical and biological evaluation of pear cultivars in the Crimean environment. Horticulture: Interdisciplinary topical scientific collection. Kiev: Nora-print Publ., 2001;52:37-45 (in Ukrainian)

Baskakova V.L. . Fruit quality estimation in winter pear cultivars in the Crimean steppe. Sbornik nauchnykh trudov GNBS = Bulleten of SNBG. 2015;140:150-157. (in Russian)

Brini W., Marsa M., Hormaza J.I. Genetic diversity in local Tunisian pears (*Pyrus communis* L.) studied with SSR markers. Scientia Horticulturae. 2008;115:337-341.

Girichev V.S., Vysotsky V.A., Marchenko L.A., Alekseenko L.V., Danilova A.A., Artyuhova A.V. Collections of fruit, berry, and ornamental plants as a tool for increasing breeding effectiveness. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2012;5:48-53. (in Russian)

Kimura M., Crow J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics (US). 1964;49:725-738.

Liu J., Zheng X., Potterc D., Hu Ch., Teng Yu. Genetic diversity and population structure of *Pyrus calleryana* (Rosaceae) in Zhejiang province, China. Biochem. Syst. Ecol. 2012;45:69-78. DOI 10.1016/j.bse.2012.06.027.

Lobanov G.A. (Ed.). Programma i metodika selektsii plodovykh, yagodnykh i orekhoplodnykh kultur [Program and Methodology of the Breeding of Orchard Crops]. Michurinsk, 1980. (in Russian)

Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 1980;10:4321-4325.

Plugatar Y.V., Smykov A.V., Opanasenko N.E., Sotnik A.I., Babina R.D., Tankevich V.V., Mitrofanova I.V., Shoferistov E.P., Gorina V.M., Komar-Temnaya L.D., Khokhlov S.Yu., Chernobaj I.G., Lukicheva A.A., Fedorova S.S., Baskakova V.L., Litchenko N.A., Shishkina E.L., Litvinova T.V., Balykina E.B. K sozdaniyu promyshlennykh sadov plodovykh kultur v Krymu [On the creation of industrial orchards in Crimea]. Simferopol, 2017. (in Russian)

Rana J.C., Chahota R.K., Sharma V., Rana M., Verma N., Verma B., Sharma T.R. Genetic diversity and structure of *Pyrus* accessions of Indian Himalayan region based on morphological and SSR markers. Tree Genet. Genomes. 2015;11:821. DOI 10.1007/s11295-014-0821-2.

Reim S., Wolf H., Lochschmidt F., Proft A. Species delimitation, genetic diversity and structure of the European indigenous wild pear (*Pyrus pyraster*) in Saxony, Germany. Genet. Resour. Crop Evol. 2017;64:1075-1085. DOI 10.1007/s10722-016-0426-8.

Schlotterer C., Soller M. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. Genetics. 1997;146:309-320.

Sedov E.N., Ogol'tsova T.P. (Eds.). Programma i metodika selektsii plodovykh, yagodnykh i orekhoplodnykh kultur [Program and Methodology of the Breeding of Orchard Crops]. Orel, 1999. (in Russian)

Sehic J., Garkava-Gustavsson L., Fernandez-Fernandez F., Nybom H. Genetic diversity in a collection of European pear (*Pyrus communis*) cultivars determined with SSR markers chosen by ECPGR. Scientia Horticulturae. 2012;145:39-45. DOI 10.1016/j.scienta.2012.07.023.

Simirenko L.P. Pomologiya. Tom 2. Grusha [Pomology. Volume 2: Pear]. Kiev: Urozhay Publ., 1972;9-36. (in Ukrainian)

Sotnik A.I., Babina R.D. Grusha i persik v Krymu [Pear and Peach in the Crimea]. Simferopol: Antikva Publ., 2016. (in Russian)

Suprun I.I., Tokmakov S.V., Bandurko I.A., Ilnitskaya E.T. SSR-polymorphism of modern cultivars and autochthonous forms of the pear tree from North Caucasus. Genetika = Genetics (Moscow). 2016;52(11):1270-1279. DOI 10.1134/S1022795416100112. (in Russian)

Suprun I., Tokmakov S., Stepanov I., Balapanov I. Development of multiplex sets of SSR markers for use in the study of genetic diversity within the genera *Malus*, *Prunus* and *Pyrus*. Nauchnye trudy GNU SKZNIISiV. Tom 1. Metodologicheskoe obespechenie selektsii sadovykh kul'tur i vinograda na sovremennom etape [Proceedings of North-Caucasian Research Institute of Horticulture and Viticulture. Vol. 1. Methodological support of the breeding of orchard and grape cultivars: state of the art]. Krasnodar, 2013;30-38. (in Russian)

Tian L., Gao Y., Cao Y. Identification of Chinese white pear cultivars using SSR markers. Genet. Resour. Crop. Evol. 2012;59:317-326. DOI 10.1007/s10722-011-9785-3.

Tokmakov S.V., Suprun I.I. The analysis of SSR-polymorphism in the natural Caucasian pear population in the piedmont area of North-Western Caucasus. Mezhdunarodnyy sammit molodykh uchenykh "Sovremennye resheniya v razvitii sel'skokhozyaystvennoy nauki i proizvodstva" [International Summit of Young Scientists "Latest amenities in agricultural sciences development and production"]. 2016;206-212. (in Russian)

Volvach P.V. Introduction to the book of Simirenko L.P. Mestnye starodavnie sorta plodovykh kul'tur Kryma [Traditional Local Fruit Cultivars of Crimea]. Simferopol: Tavria Publ., 1996;3-30. (in Russian)

Wolko Ł., Bocianowski J., Antkowiak W., Slomski R. Genetic diversity and population structure of wild pear (*Pyrus pyraster* (L.) Burgsd.) in Poland. Open Life Sci. 2015;10:19-29. DOI 10.1515/biol-2015-0003.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):69-78
DOI 10.18699/VJ18.333

Резистентность к возбудителю пирикуляриоза и морфобиологические особенности генотипов коллекции *Oryza sativa* L. из разных эколого-географических групп в условиях Кубанской зоны рисосеяния

Т.Л. Коротенко ✉, О.А. Брагина, И.И. Супрун, Ж.М. Мухина, Ю.В. Епифанович, А.А. Петрухненко, Т.А. Хорина

Всероссийский научно-исследовательский институт риса, Краснодар, Россия

Самая распространенная и вредоносная болезнь сельскохозяйственной культуры рис – это «ожог», вызываемый грибом *Magnoporthe grisea* (Hebert) Barr, возбудителем пирикуляриоза риса. Актуальным направлением современной отечественной селекции риса является создание высокоурожайных сортов, устойчивых к этому патогену. Для решения поставленной задачи важен поиск источников и доноров устойчивости к краснодарской популяции гриба среди экотипов различного эколого-географического происхождения. Оценка коллекционного разнообразия риса на устойчивость к пирикуляриозу проведена как на естественном фоне, так и на инфекционно-провокационном. Иммунологическую оценку и фенотипирование проводили в 2015–2017 гг. на 154 сортах вида *Oryza sativa* L. из семи эколого-географических зон возделывания культуры. За годы исследований интенсивность развития болезни по сортам варьировала от 1.1 до 77.8 %. Выявлены различия по устойчивости сортов риса к патогену между экологическими группами и странами. Большинство изученных образцов риса проявляли среднюю устойчивость, выделена 51 резистентная форма. Устойчивые формы чаще встречались среди генплазмы из Китая, Италии, Филиппин и Кореи, а неустойчивые – из африканских стран, Японии, Приморья и Вьетнама. Выделены интродуцированные образцы, резистентные к заболеванию и адаптированные к почвенно-климатическим условиям и технологиям выращивания риса на Кубани, которые включены в селекционную схему создания устойчивых к патогену сортов риса с расширением их генетической основы. Приведены данные вариации морфологических признаков и скорости развития растений сортов международной селекции из 24 стран в условиях юга России. Представлены результаты сравнения генплазмы риса отечественной и зарубежной селекции по степени устойчивости к патогену в условиях естественного заражения в полевом опыте за пять лет. В результате оценки степени устойчивости растений к краснодарской популяции патогена из международного набора сортов-дифференциаторов генов вирулентности гриба определены эффективные гены устойчивости к патогену для селекционных программ юга России и молекулярно-генетического анализа коллекционного разнообразия риса: *Pi-1*, *Pi-z*, *Pi-ta*, *Pi-z5*, *Pi-9*, *Pi-5(t)*, *Pi-t*, *Pi-19*.

Ключевые слова: рис; коллекция; пирикуляриоз; иммунологическая оценка; фенотипирование; гены устойчивости; сорта-дифференциаторы.

Resistance to the blast agent and the morphobiological features of genotypes in the *Oryza sativa* L. collection from various ecological and geographical groups in conditions of Kuban zone of rice growing

T.L. Korotenko ✉, O.A. Bragina, I.I. Suprun, Zh.M. Mukhina, Yu.V. Epifanovich, A.A. Petrukhnenko, T.A. Khorina

All-Russian Rice Research Institute, Krasnodar, Russia

The most common and harmful disease of the agricultural crop rice is a "burn" caused by the fungus *Magnoporthe grisea* (Hebert) Barr, the causative agent of rice blast. The important direction of modern domestic rice breeding is the development of high-yielding varieties resistant to blast. To solve the problem, it is important to search for sources and donors of resistance to the Krasnodar population of the pathogen among ecotypes of different ecological and geographical origin. Evaluation of the rice collection diversity for resistance to blast was carried out both on a natural background and on an infectious-provocative one. Immunological evaluation and phenotyping were carried out in 2015–2017 on 154 varieties of the *Oryza sativa* L. species from 7 ecological and geographical cultivation zones. Over the years of research, the range of variation in the intensity of the disease development in varieties was in the range from 1.1 to 77.8 %. The differences in the resistance of rice varieties to the pathogen between ecological groups and countries have been found. Most of the studied samples have shown medium resistance, there were isolated 51 resistant forms. Most often stable forms were found among the germplasm from China, Italy, the Philippines and Korea, and the unstable ones were from African countries, Japan, Primorye and Vietnam. Introduced samples resistant to the disease were identified and adapted to soil and climatic conditions and rice cultivation technologies of the Kuban, they were included in the breeding scheme for developing pathogen-resistant rice varieties with the extension of their genetic basis. The article presents data on the variation of morphological traits and the rate of development of plants of international

Received 16.11.2017
Accepted for publication 22.12.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: korotenko.tatyan@mail.ru

varieties from 24 countries in the conditions of the south of Russia. The results of the comparison of germplasm of domestic and foreign varieties according to the degree of resistance to the pathogen in conditions of natural infection in the field experiment for five years are presented. As a result of the evaluation of plant resistance to the Krasnodar population of the pathogen, the effective genes for resistance to the pathogen for breeding programs of the south of Russia and the molecular genetic analysis of the rice collection variety were determined: *Pi-1*, *Pi-z*, *Pi-ta*, *Pi-z5*, *Pi-9*, *Pi-5(t)*, *Pi-t*, *Pi-19*.

Key words: rice; collection; blast; immunological evaluation; phenotyping; genes of resistance; differentiator varieties.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Коротенко Т.Л., Брагина О.А., Супрун И.И., Мухина Ж.М., Епифанович Ю.В., Петрухненко А.А., Хорина Т.А. Резистентность к возбудителю пирикуляриоза и морфобиологические особенности генотипов коллекции *Oryza sativa* L. из разных эколого-географических групп в условиях Кубанской зоны рисосеяния. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):69-78. DOI 10.18699/VJ18.333

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Korotenko T.L., Bragina O.A., Suprun I.I., Mukhina Zh.M., Epifanovich Yu.V., Petrukhnenko A.A., Khorina T.A. Resistance to the blast agent and the morphobiological features of genotypes in the *Oryza sativa* L. collection from various ecological and geographical groups in conditions of Kuban zone of rice growing . Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):69-78. DOI 10.18699/VJ18.333 (in Russian)

Сельскохозяйственная культура рис имеет большое значение в мировой экономике и продовольственной безопасности 116 рисопроизводящих стран. Это обусловлено высокой адаптивностью культуры к условиям произрастания и мировыми тенденциями использования. Н.И. Вавилов считал центром происхождения *Oryza sativa* индийский очаг, где рис находится «в культуре в огромном сортовом разнообразии и дико». По происхождению и приспособленности к климату выявлено восемь эколого-географических групп (ЭГГ) *O. sativa* L., в которых растительные формы риса значительно отличаются друг от друга по биологическим, морфологическим и хозяйственно ценным признакам (Вавилов, 1926; Гущин, 1930; Ляховкин, 2005). Поиск родительских форм с ценными признаками, отвечающими требованиям нового сорта, среди генетического разнообразия культуры всегда остается актуальным (Соколова, 1969).

Основной рисопроизводящий регион России (80 % от общего объема производства риса) – Краснодарский край. Сортосмена и использование новых высокоурожайных сортов риса позволили получить за последние семь лет дополнительную прибыль в размере 7 млрд руб. (Гаркуша и др., 2015).

Немаловажную роль в снижении урожайности зерновых культур играют грибные болезни. Поражая надземные части растения, они вызывают отмирание тканей. Во всех рисосеющих странах, в том числе в России, основным патогеном, приводящим к значительным потерям урожая риса, является гриб *Magnoporthe grisea* (Hebert) Barr – возбудитель пирикуляриоза *(Pyricularia oryzae* Br. et Cav.). Пирикуляриоз риса возглавляет десятку наиболее опасных заболеваний и является одной из причин голода в странах Азии и Африки. Ввиду высокой спонтанной изменчивости гриба *M. grisea*, его полевые популяции обычно представлены смесью рас с различной вирулентностью и агрессивностью (Bidaux, 1978; Горбунова и др., 1987; Ковалевская, 1990; Волкова, Мухина, 2004; Касьянов, 2008). Известно более 30 физиологических рас возбудителя, отличающихся своей агрессивностью к отдельным сортам риса. Наиболее многочисленные расы патогена обнаружены в США, Индии и на Филиппинах (Telebanco-Yanoria et al., 2008; Pandey, 2016; https://www.syngenta.kz/news/ris/pirikulyarioz-risa/). В настоящее время у риса выявлено свыше 100 генов и более 350 локусов количественных признаков, детерминирующих устойчивость к *P. oryzae* (Tanweer et al., 2015; http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp).

Характер проявления пирикуляриоза зависит от агроклиматических условий и генотипа. В условиях влажной теплой погоды на восприимчивых сортах риса часто обнаруживаются все формы поражения: узловая, метельчатая и листовая. Специалисты отмечают, что под действием других микроорганизмов патоген в почве обычно погибает, но хорошо перезимовывает на ее поверхности (Романова и др., 2009). Урожайность зерна значительно снижается при раннем заражении восприимчивых сортов, причем в разных странах ежегодные потери урожая риса могут варьировать от 5 до 90 % (Гаркуша и др., 2015; Дубина и др., 2015; Дубина, 2016). По данным иммунологов, цикличность появления эпифитотий пирикуляриоза в Краснодарском крае составляет 10–12 лет. В рисоводческой отрасли региона известна эпифитотия 2013 г., когда пирикуляриозом оказалось поражено более 20 % посевов, а потери урожая зерна превысили 100 тыс. т (Зеленский, 2016). Для защиты растений от патогена во многих странах эффективно используют фунгициды. Одновременно применяют и экологически безопасные способы борьбы с болезнями: сортосмену, расширение генетического разнообразия, внедрение сортов с эффективными генами устойчивости к патогену, вовлечение в селекционный процесс иммунных генотипов (Ковалев и др., 2006; Зеленский, 2013; Дубина и др., 2015).

Практически во всех рисосеющих странах ведется селекция на устойчивость риса к этой болезни. Специалисты

отмечают, что длительная устойчивость к пирикуляриозу не может быть обеспечена присутствием одного гена расоспецифической устойчивости, так как популяции гриба обладают способностью быстро мутировать и поражать формально устойчивые сорта (Witcombe, Hash, 2000; Conaway-Bormans et al., 2003; Коновалова, Соболева, 2010). Продолжительность «полевой жизни» сортов с расоспецифическим типом устойчивости ограничена тремя-пятью годами (Коломиец, Коваленко, 1991; Санин, Назарова, 2010; Зеленский, 2016). С другой стороны, сорта, обладающие только полевой (горизонтальной) устойчивостью (несущие QTL – количественные локусы), могут частично поражаться болезнью на естественном фоне и при искусственном заражении, при этом растение проявляет среднюю устойчивость к патогену. Некоторые ученые пришли к заключению, что горизонтальная (полевая) устойчивость не расоспецифична, наследуется полигенно, действует в равной степени против всех рас и обеспечивает частичную, наиболее длительную защиту риса от пирикуляриоза (Bidaux, 1978; Коломиец, Коваленко, 1991; Зеленский, 2013, 2016).

С 1982 г. на базе грузинского филиала ВНИИ фитопатологии был открыт инфекционный питомник для оценки риса на устойчивость к пирикуляриозу, где сотрудники ряда институтов, в том числе ВНИИ риса, вели целенаправленную работу по созданию иммунных сортов. Итогом многолетних экспериментов стали сорта с расоспецифической устойчивостью к патогену: Паритет, Бластоник, Витязь, Водолей, Талисман и Снежинка (Зеленский, 2011). Отечественной селекцией создан ряд сортов с полевой устойчивостью к пирикуляриозу: Лидер, Атлант, Гамма, Кумир, Южный, Олимп, Виктория, Партнер и др. Специфика селекции устойчивых к грибным болезням сортов риса заключается в выборе реципиентной родительской формы, подборе эффективных генов устойчивости для формирования иммунитета и прогнозе стабильности устойчивости сорта с этой комбинацией генов (Tanweer et al., 2015; Зеленский, 2016). Однако растения риса с наиболее благоприятным сочетанием генов устойчивости встречаются редко, при этом резистентность может отрицательно коррелировать с хозяйственно ценными признаками. В настоящее время по приоритетным проблемам селекции во ВНИИ риса ведется создание «признаковых коллекций», куда включены генотипы, различающиеся географическим и генетическим происхождением и позволяющие преодолеть уязвимость культуры к внешним стрессам (Коротенко и др., 2014, 2017).

Цель работы: в экологических условиях Краснодарского края провести фенотипирование сортов риса из различных рисосеющих регионов мира по устойчивости к местной популяции патогена пирикуляриоза и изучить их разнообразие, выделить источники признака и определить эффективные гены устойчивости для молекулярно-генетического анализа генофонда.

Материалы и методы

Полевые исследования выполняли в 2015–2017 гг. на экспериментальном орошаемом участке института (г. Краснодар) в мелкоделяночном опыте коллекционного питомника УНУ «Коллекция ВНИИ риса». Фитопатологическую оценку образцов риса проводили на провокационном фоне инфекционного питомника лаборатории земледелия. Закладку опыта, учеты и наблюдения, визуальные оценки осуществляли согласно общепринятым методикам: «Методики опытных работ по селекции, семеноводству, семеноведению и контролю за качеством семян риса» (Сметанин и др., 1972); «Методические указания по изучению мировой коллекции риса и классификатор рода *Oryza* L.» (1982). Оценку устойчивости к возбудителю пирикуляриоза *P. oryzae* – по методике ВНИИ фитопатологии (Москва) (Методические указания…, 1988).

Для обработки экспериментальных данных применяли методы математической статистики: параметры описательной статистики (среднее арифметическое для каждой группы, стандартное отклонение, ошибку средней, размах варьирования), наименьшую существенную разность ($НСР_{05}$) рассчитывали однофакторным дисперсионным анализом; коэффициенты корреляции Пирсона между признаками – корреляционным анализом, построение диаграмм и гистограмм выполняли графическим методом с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. Предварительно в течение пяти лет в коллекционном питомнике при равных условиях выращивания в условиях естественного заражения был проведен скрининг по типу реакции более 1500 интродуцированных сортов риса. Для оценки растений на искусственном инфекционном фоне были выбраны зарубежные формы семи эколого-географических групп (ЭГГ). При подборе сортов и дифференциации рисосеющих стран по ЭГГ происхождения риса использовали информационный ресурс института «Банк данных образцов коллекции риса посевного *Oryza s.* L.».

Материалом для исследования послужили 154 сортообразца риса коллекции ВНИИ риса из 24 стран, 2 сорта-стандарта (восприимчивый Победа 65 и устойчивый Авангард), а также 6 сортов из международного набора сортов-дифференциаторов (Китай, Япония, Индия, Филиппины) и 26 моногенных линий риса (Япония и Филиппины) с известными генами устойчивости для идентификации рас возбудителя пирикуляриоза: *Pi-1*, *Pi-3*, *Pi-9*, *Pi-19*, *Pi-20*, *Pi-33*, *Pi-40*, *Pi-a*, *Pi-b*, *Pi-i*, *Pi-k*, *Pi-kh*, *Pi-kp*, *Pi-ks*, *Pi-km*, *Pi-sh*, *Pi-t*, *Pi-ta*, *Pi-ta2*, *Pi-z*, *Pi-z5*, *Pi-zt*, *Pi-5(t)*, *Pi-7(t)*, *Pi-11(t)*, *Pi-12(t)*.

Ежегодный сбор инфицированного пирикуляриозом материала на полях рисосеющих хозяйств восьми районов Краснодарского края обеспечил высокое качество синтетической популяции патогена. Иммунологическая оценка сортов на резистентность к данному заболеванию базировалась на создании жесткого искусственного инфекционного фона. Для заражения использован природный изолят гриба *M. grisea*, который выделяли из образцов растений с хорошо выраженными симптомами заболевания. Чашки с образцами экспонировали в термостате при температуре 27 ± 1 °С. Наблюдение за ростом гриба начинали через 48 ч под бинокулярной лупой при 20–50-кратном увеличении. После появления спороношения под микроскопом при увеличении ×120 визуально определяли идентичность конидий гриба виду *M. grisea*. При достижении колониями гриба диаметра от 0.5 до 0.75 от размера чашки Петри их рассеивали. Сухой споровый

материал получали из чистой 14-дневной культуры гриба со споруляцией не ниже 20 млн конидий на чашку Петри. Растения инокулировали суспензией спор в наиболее уязвимые фазы развития риса: кущение (5–7 листьев), выметывание–цветение. Норма расхода сухого спорового материала – 5 мг/м^2 при 100 % всхожести спор, на делянку – 2.5 мг. Заражение проводили в вечерние часы, в период выпадения росы и при отсутствии ветра.

Устойчивость сортообразцов риса определяли по поражению листьев, узлов, стеблей и метелки и оценивали индекс развития болезни (ИРБ, %). Поражаемость растений листовой формой пирикуляриоза определяли через 10 и 20 дней после инокуляции, а узлов и метелки растений риса – в фазу молочно-восковой и полной спелости зерна. Учитывали два показателя: тип реакции (в баллах) и интенсивность поражаемости растений (в %). Использовали балльную шкалу Международного института риса (IRRI) по степени поражения растений, где 0 – поражение отсутствует (тип устойчивости: высокоустойчивые); 1–3 балла – единичные коричневые точки (устойчивые формы); 5–6 баллов – типичные пятна пирикуляриоза, поражено от 10 до 25 % площади листа (среднеустойчивые); 7–9 баллов – поражено от 50 до 100 % площади листа (восприимчивые и неустойчивые формы). По индексу ИРБ сорта классифицируют на категории: устойчивые – 0–25 %, среднеустойчивые – 25.1–50 %, неустойчивые – более 50 %.

Результаты

Основные этапы данной работы – изучение и выявление источников устойчивости риса к пирикуляриозу среди видового разнообразия коллекции *Oryza s.* L. На рис. 1 представлены формы проявления болезни: листовая и метельчатая. Считают, что устойчивость сорта к грибным болезням на всех этапах патологического процесса определяется генетическими, морфологическими, анатомическими и физиологическими факторами. По морфобиологическим и селекционным параметрам значительный объем изучаемых экотипов коллекции отличается от возделываемых в регионе сортов риса.

В период с 1956 г. по настоящее время собран генофонд коллекции ВНИИ риса, который включает 6.9 тыс. образцов подвидов *indica* и *japonica Oryza s.* L. 82 разновидностей из восьми эколого-географических рисосеющих зон, адаптированных к агроклиматическим условиям юга России. В рабочую коллекцию включены стародавние и современные отечественные образцы (92 %), остальные – представители из стран ближнего зарубежья. Интродукционный фонд коллекции включает генотипы из 40 стран мира. Более половины (51 %) – это сорта европейской ЭГГ, наиболее многочисленная группа (34 %) – филиппинские сорта, а доля остальных не превышает 10 % (рис. 2). Согласно А.Г. Ляховкину (2005), к подвиду *japonica* (*sativa*) относятся сорта восточной, европейской, среднеазиатской и иранской групп, а к подвиду *indica* – южноазиатской, филиппинской, африканской и латиноамериканской (южная зона мирового рисосеяния). Однако анализ паспортных данных сортов коллекции ВНИИ риса по таксономической принадлежности свидетельствует, что сорта обоих подвидов имеются среди всех ЭГГ, что является результатом тенденции современной селекции этой культуры в рисосеющих странах.

Полевая оценка в коллекционном питомнике сортов риса из рабочей коллекции, национальной коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова и интродукционного фонда в условиях естественного заражения показала, что большинство зарубежных сортов (в пределах 47.8–49.4 %) характеризовалось высокой и средней устойчивостью к пирикуляриозу. Неустойчивых образцов (9 баллов) за годы исследований выявлено не было (табл. 1). Между тем среди генетического разнообразия из отдаленных рисосеющих регионов форм, восприимчивых к краснодарской популяции пирикуляриоза, наблюдалось больше (в среднем 4.3 %), чем среди образцов местной селекции (в среднем 1.6 %).

Примечательно, что большинство образцов зарубежной селекции в климатических условиях 2014–2015 гг. оценены как среднеустойчивые и восприимчивые к патогену пирикуляриоза, а условия выращивания 2016–2017 гг. отмечены как благоприятные для культуры – более 80 % образцов показали резистентность к возбудителю *P. oryzae* на естественном фоне.

Дальнейшие исследования были направлены на выявление иммунных форм на инфекционном фоне и фенотипирование сортов риса из 24 стран (табл. 2). Среди исследуемых на провокационном фоне 154 сортов были представители семи ЭГГ: из восточной группы – 19 сортов, южноазиатской – 20, филиппинской – 32, среднеазиатской – 10, европейской – 63, африканской – 5, латиноамериканской – 5 сортов. Изучаемая группа сортов была представлена 26 ботаническими разновидностями; 11.6 % образцов относились к подвиду *indica*, 88.4 % – к подвиду *japonica*. Выявлены географические закономерности в проявлении устойчивости растений к возбудителю пирикуляриоза: сорта латиноамериканского, филиппинского и среднеазиатского происхождения обладали большей резистентностью. Относительно высокие средние значения развития болезни отмечены в южноазиатской и африканской группах. Источники устойчивости к патогену местной популяции гриба выделены практически из всех ЭГГ рисосеяния, кроме африканской (Египет, Нигерия, Мадагаскар).

В каждой ЭГГ имелись как резистентные, так и неустойчивые формы, причем среднеустойчивых форм оказалось больше. Корреляционным анализом взаимосвязи между устойчивостью к патогену пирикуляриоза и таксономической принадлежностью сорта не выявлено ($r = 0.14$, $p < 0.05$). Изучение выборки генотипов риса из различных регионов мира показало их значительную вариабельность по морфобиологическим признакам и резистентности к патогену местной популяции пирикуляриоза (см. табл. 2, рис. 3). На фоне искусственного заражения между сортами наблюдался высокий полиморфизм по интенсивности развития болезни, ИРБ варьировал от 1.1 до 77.8 %. С использованием фитопатологического теста из коллекции выделено 38 неустойчивых форм. Значительная вариабельность степени поражения грибом *M. grisea* в период вегетации риса отмечена у генотипов из Украины, Румынии, России, Казахстана, Филиппин, Приморья (см. рис. 3). По нашим данным, в рассматриваемой выборке

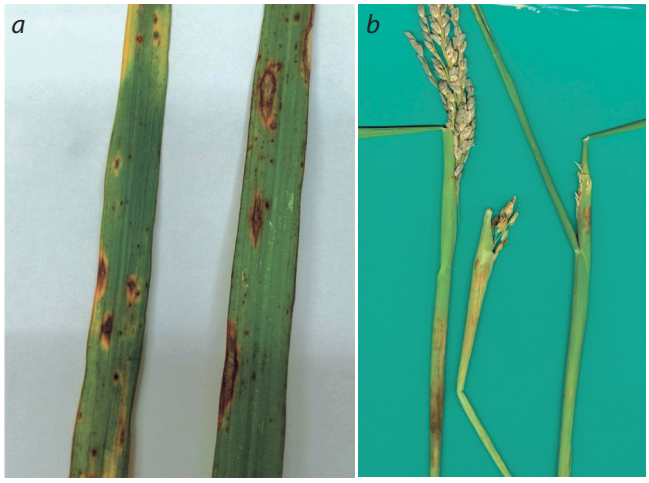


Fig. 1. Infection of rice by *Pyricularia oryzae* conidia: (*a*) leaf damage, (*b*) panicle damage.

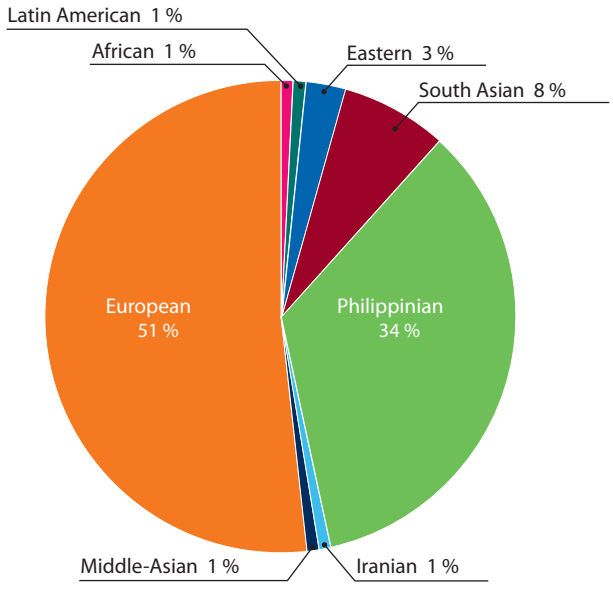


Fig. 2. Origins of rice accessions in the collection of the All-Russia Rice Research Institute as of 2017.

Table 1. Percentages of rice accessions (Russia-bred, from the national VIR collection, and introduced) belonging to different grades of rice blight resistance in the field conditions of the Kuban region

Year	Susceptible (7 points)	Medium-resistant (5–6 points)	Resistant (1–3 points)
Experimental collection			
2012	0.7	66.7	32.6
2013	1.3	64.3	34.4
2014	1.8	65.6	32.6
2015	3.7	21.4	74.9
2016	1.3	15.6	83.1
2017	0.8	17.1	82.1
Mean	1.6	41.8	56.6
National VIR collection			
2012	1.8	53.5	44.7
2013	0.6	61.2	38.2
2014	1.7	81.6	16.7
2015	3.7	62.6	33.7
2016	2.2	16.1	81.7
2017	2.3	16.3	81.4
Mean	2.1	48.5	49.4
Introduction			
2012	4.2	55.5	40.3
2013	9.3	34.0	56.7
2014	2.1	77.7	20.2
2015	9.2	77.3	13.5
2016	0.7	13.8	85.5
2017	0.4	28.5	71.1
Mean	4.3	47.8	47.9

доля устойчивых сортов с относительно низкими показателями степени поражения выше из стран: Япония, Корея, Китай, Италия, США и Бразилия, где интенсивно ведется селекция на иммунитет к грибным болезням.

Распространение генов устойчивости риса к пирикуляриозу в районах мирового рисосеяния определяется разнообразием возделываемых сортов. Г.Л. Зеленский (Зеленский, Шаталова, 2013; Зеленский, 2016) отмечает, что в Индии, Китае, США и некоторых африканских странах, где выращивают множество сортов и сложились благоприятные для развития патогена климатические условия, обнаруживается наибольшее число генов устойчивости и максимальное разнообразие генов вирулентности *P. oryzae*, подавляющих устойчивость сортов риса.

Кроме того, сообщается, что иммунологические изменения сортов могут происходить и в связи с изменением условий их выращивания (Зеленский, Шаталова, 2013). На фоне сильного поражения восприимчивого сорта-стандарта Победа 65 (ИРБ = 68.9 %) был выделен 51 устойчивый генотип, что составило 33 % от числа изученных. У устойчивого стандартного сорта Авангард величина ИРБ составляла 8.7 %, тогда как у других резистентных форм она варьировала от 1.1 до 24.4 %. Проведенные исследования позволили оценить генотипические особенности образцов и отобрать наиболее перспективные для отечественной селекции. Представленная выборка сортов (табл. 3) – это резистентные к местной популяции патогена формы риса, адаптированные к экологическим условиям региона, различающиеся происхождением, габитусом и морфобиологическими особенностями растений.

Успех селекции риса на иммунитет зависит не только от генетического потенциала родительских форм, но и от надежности генов устойчивости к природной популяции гриба *M. grisea* в региональном аспекте и научно обосно-

Table 2. Variation of traits in rice accessions studied in the Kuban region with regard to origin (countries and ecogeographical groups). Data are averaged over 2015–2017

Ecogeographical group	Country of origin	Disease grade	Vegetation duration, min–max	Plant height, cm, min–max	Resistance score	
					to the agent in the field	to lodging*
1. Eastern	Russia, Primorskiy Kray	51.1	90–105	77–90	1–3	1–5
	Korea	22.8	108–135	84–95	1–3	1–3
	Japan	38.3	95–100	47–82	1–3	3–5
	Group mean	37.4 ± 4.2	101.1 ± 3.1	81.9 ± 6.3		
2. South-Asian	Azerbaijan	55.1	110–118	106–110	1	3–5
	India	41.4	118–130	90–95	1	1–3
	Vietnam	62.7	120–125	95–118	1	1–3
	China	27.6	95–135	69–107	1–3	1–3
	Turkey	38.7	110–125	85–112	1–3	1
	Thailand	29.8	118–122	84–92	1	1
	Group mean	43.6 ± 1.7	114.2 ± 2.7	91.3 ± 5.4		
3. Philippines	Philippines (IRRI varieties)	34.8	105–150	65–115	1–3	1
	Group mean	34.8 ± 5.2	124.6 ± 5.2	91.0 ± 5.2		
4. Middle-Asian	Kazakhstan	35.7	95–110	54–130	1–5	1–3
	Uzbekistan	10.5	115–118	86–98	1–3	3–5
	Group mean	22.2 ± 1.3	105.7 ± 1.7	88.9 ± 9.5		
5. European	Russia, Krasnodar	35.8	95–123	67–120	1–5	1–5
	Russia, Rostov	45.0	105–120	82–120	1–3	1–3
	Hungary	55.6	110–112	96–100	1	1–7
	Italy	32.9	112–122	74–92	1	1
	France	33.8	108–110	91–95	1	1–3
	Romania	33.9	106–118	67–110	1–3	1–3
	Greece	26.7	115–120	87–94	1	1
	Bulgaria	46.7	100–108	91–96	1	1–5
	Ukraine	37.9	98–116	82–102	1–3	1–5
	Group mean	38.7 ± 3.1	110.0 ± 2.5	88.1 ± 7.2		
6. African	Egypt	39.3	125–132	83–89	1	1
	Madagascar	63.4	108–130	96–110	1–3	1–3
	Nigeria	63.3	115–150	86–90	1	1–3
	Group mean	54.8 ± 1.4	121.0 ± 4.2	94.4 ± 3.7		
7. Latin American	United States	30.6	120–132	68–96	1–3	1
	Brazil	17.8	125–130	78–93	1	1
	Group mean	24.2 ± 1.7	126.4 ± 2.0	82.0 ± 3.1		

* Lodging resistance scoring: 1, highly resistant; 3, resistant; 5-medium-resistant; 7, prone.

ванного их использования (Tanweer et al., 2015; Зеленский, 2016). Генофонд источников иммунитета с известными генами (международный набор сортов-дифференциаторов) поступил в коллекцию ВНИИ риса из IRRI и широко используется для молекулярно-генетических и селекционных работ. Результаты трехлетнего испытания сортов зарубежной селекции, индикаторов генов устойчивости (носителей генов), представлены в табл. 4.

Характер изменчивости типа реакции некоторых сортов-дифференциаторов, обладающих различными генами устойчивости, на заражение в разные годы исследований указывает на недостаточную эффективность этих генов

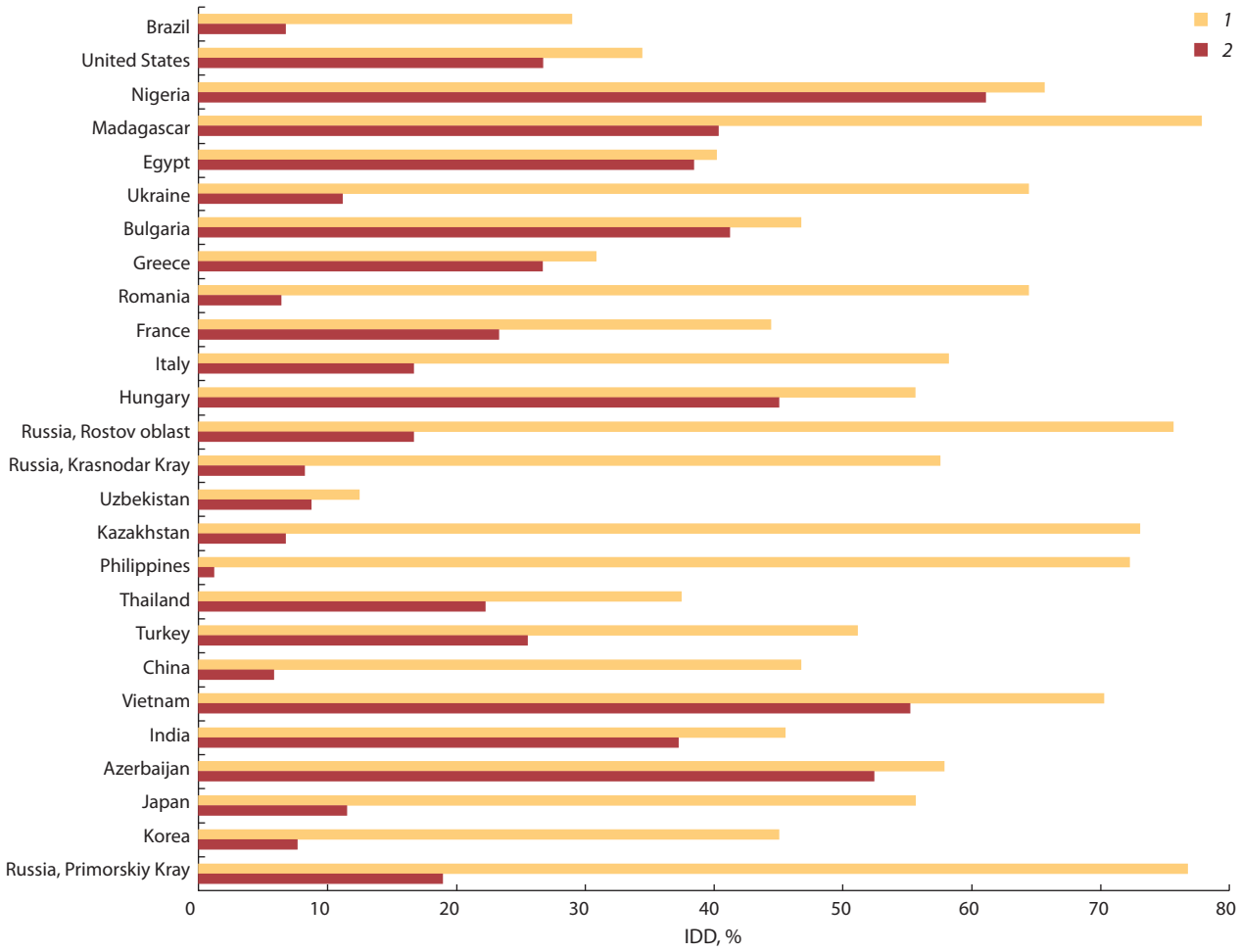


Fig. 3. Variation in disease gradation in rice varieties from 24 countries infected by the Krasnodar population of the rice blight agent.
1 – the maximum value; *2* – min.

к патогену краснодарской популяции. Согласно данным мониторинга в период 2015–2017 гг., в экологических условиях Краснодарского края симптомы заражения патогеном *P. oryzae* отсутствовали во всех случаях у сортов-дифференциаторов с генами: *Pi-1*, *Pi-z*, *Pi-ta*, *Pi-z5*, *Pi-9*, *Pi-5(t)*, *Pi-t*, *Pi-19*.

Обсуждение

В отличие от азиатских стран, где рис произрастает и выращивается издревле, в России селекционные исследования этой культуры были начаты в 1926 г. на Дальнем Востоке, в Приморском крае. На Кубани Н.И. Вавиловым селекционный центр по рису был организован в 1931 г. (Краткий отчет…, 1971; Ляховкин, 2005; Ковалев, 2016). Анализ состава родословных отечественных сортов риса показал, что стародавние сорта по сравнению с современными создавались на основе более разнообразной генплазмы мировой коллекции ВИР. Ввиду «гонки за высокой урожайностью» наблюдалась «генетическая эрозия», увеличились нормы внесения минеральных удобрений под рис, что благоприятно для развития заболеваний данной культуры (Зеленский, Шаталова, 2013). Полагают, что поражаемость сортов болезнями связана с длительностью их возделывания, у большинства иммунные свойства ослабевают (Ковалевская, 1990; Санин, Назарова, 2010; Зеленский, 2016). В наших исследованиях получены противоречивые данные: стародавние сорта Краснодарский 86, Кулон, Краснодарский 424, Снежинка, неоднократно пересеваемые, сохраняют высокую устойчивость к нынешним расам пирикуляриоза в регионе. В их родословной сорта: Балилла гр. гр. (Португалия), Каталао, Кендзо (Китай), Водяной рис (Маньчжурия). Учитывая, что современные сорта Новатор, Шарм, Флагман, Рапан, Диамант, возделываемые в Краснодарском крае, не обладают достаточной устойчивостью к пирикуляриозу, существует необходимость поиска доноров устойчивости среди широкого генетического разнообразия. Вероятно, ввиду генетической неоднородности коллекционного материала, эпифитотийная ситуация 2013 г. на полях Краснодарского края не нанесла существенного урона продуктивности растений в коллекционном питомнике. Отмечено лишь увеличение доли восприимчивых сортов среди интродукции до 9.3 % (см. табл. 1).

По результатам иммунологической оценки выявлена очень низкая устойчивость к краснодарской популяции патогена сортов из Приморья (Россия). Восприимчивыми

Table 3. Blight-resistant rice forms in the Kuban rice-growing region

Accession	Origin	ИРБ, %	Plant height, cm	Flowering–complete maturity interval, days	Botanical variety	Flag leaf area, cm^2	Flag leaf angle, deg	Pubescence, score*
Avangard-st.	Uzbekistan	8.7	98.0	78–118	*vulgaris*	37.5	45	7
Kulon	Russia	8.3	80.2	75–112	*italica*	33.4	80	5
Snezhinka	»	15.5	105.0	80–120	*gilanica*	20.7	120	3
Ми 07-980	Primorskiy Kray	18.9	81.0	57–95	*italica*	20.6	70	5
Long Ting 12	Japan	11.5	66.5	62–98	*italica*	16.3	45	5
Ishikari	»	24.4	77.4	58–95	*italica*	14.5	70	5
Pyongyang 21	Korea	16.7	89.3	92–130	*italica*	22.4	30	5
Pyongyang 3	»	7.6	92.0	95–135	*s. vulgar*	19.0	20	5
Zhongyov 340	China	13.3	98.3	88–128	*gilanica*	28.0	10	1
Long ting 15	»	5.8	69.3	60–95	*italica*	20.5	30	5
Deshan B	»	6.2	79.5	71–105	*italica*	30.7	35	3
Pak-li	Kazakhstan	14.8	95.1	63–95	*mutica*	33.4	90	5
KazNIIr 7	»	6.7	75.1	74–112	*n. apicul.*	34.8	40	5
Oceano	Italy	16.7	75.0	78–118	*gilanica*	29.5	80	1
Cristal	Romania	22.2	89.0	71–106	*italica*	31.9	80	3
Chirnogi 16	»	6.4	67.4	76–115	*italica*	20.6	80	5
84059-TR 787	France	22.3	91.2	73–108	*italica*	24.6	45	5
N15	Philippines	10.4	107.0	74–115	*sundens*	25.5	50	5
03485/02 363	»	3.3	84.3	101–140	*italica*	29.5	20	3
AA 3227/07	»	1.1	83.6	80–120	*italica*	22.6	20	3
AA 40418 Duar	»	3.4	110.0	75–110	*ochracea*	31.4	30	3
IR 73694-41	Thailand	22.2	84.3	78–118	*italica*	23.4	30	5
Onda	United States	18.9	94.0	72–110	*gilanica*	31.6	95	3
Blucbelle	Brazil	6.7	78.2	91–130	*isabelica*	18.0	30	3
$НСР_{05}$		3.27	5.46					

* Flower glume pubescence scoring: 1, smooth; 3, slightly uneven; 5, uneven, 7, slightly pubescent.

к возбудителю пирикуляриоза среди изученных сортов оказались: Ханкайский 52, Ханкайский 429, Приморский 29, Дальневосточный (Приморье), Дон 4283 (Ростов), Lieto (Италия), Серпневий, Онтарио (Украина), Казер 6, Ectraglum, Ару (Казахстан), Dumarea (Румыния), WJ 8 (Вьетнам), N 50, ПВ-1 IRBLZ-FV, IRBLII-ZH, IRBL 20-IR 24, IRBLta2-IR64 (Филиппины), Ita-150 (Нигерия), 9658101 Пак-1 (Мадагаскар), Yachiminori, Fuku-Juki, Kitokogane, Hashiri moshi (Япония), AA 30146/2011 (Африка).

Изучаемый набор сортов включал формы всех групп спелости. Размах изменчивости по скорости развития растений риса между сортами составил 45 дней (см. табл. 2). Скороспелость в условиях Кубани характерна сортам из Японии и Казахстана. Позднеспелые генотипы из Индии, Филиппин, Египта, Нигерии, США и Бразилии с периодом вегетации до 150 дней отнесены к фоточувствительным. Растения сортов риса из Азербайджана, Приморья, Узбекистана, Венгрии и Украины отличались низкой устойчивостью к полеганию. Среди низкорослых генотипов из Японии и Филиппин выявлены холодоустойчивые формы. Примечательно, что исследуемые сорта риса ввиду широкого охвата территорий их происхождения, различающихся агроклиматическими условиями, были представлены разными морфотипами с высоким полиморфизмом признаков. При этом в каждой ЭГГ выявлены формы риса отечественного среднерослого морфотипа с компактной формой куста и вертикальной компактной метелкой. Вероятно, это результат селекции на урожайность в рисосеющих странах. Среди представителей вида морфотипы с эректоидным положением флагового листа – преимущественно из Китая, Филиппин и Кореи, а с наибольшей площадью листовой поверхности – из Турции, Вьетнама, Индии и США.

Высокий полиморфизм по размерам листовой поверхности наблюдался в филиппинской, южноазиатской и европейской группах, наименьший – в восточной ЭГГ. Большее число восприимчивых к патогену форм риса выявлено среди сортов с высокими темпами развития рас-

Table 4. Phytopathological testing of a set of differentiation varieties of the races of Magnoporthe grisea to a local, synthetic pathogen population, 2015-2017

Gene of resistance to blast	Category of resistance to blast, based on the type of rice plant reaction		
	2015	2016	2017
Pi-a	Medium resistant	Resistant	Resistant
Pi-k	»	»	»
Pi-ks	»	»	Medium resistant
Pi-kp	»	»	Resistant
Pi-1	Resistant	»	»
Pi-z	»	»	»
Pi-sh	Medium resistant	»	»
Pi-ta	Resistant	»	»
Pi-zt	»	Medium resistant	Medium resistant
Pi-b	Medium resistant	»	Resistant
Pi-z5	Resistantв	Resistant	»
Pi-sh	Medium resistant	»	Medium resistant
Pi-9	Resistant	»	Resistant
Pi-ta2	Medium resistant	»	Medium resistant
Pi-7(t)	Resistant	Medium resistant	Resistant
Pi-5(t)	»	Resistant	»
Pi-3	Medium resistant	»	»
Pi-t	Resistant	»	»
Pi-19	»	»	»
Pi-20	»	Medium resistant	»
Pi-40	Medium resistant	Resistant	»
No *R* gene	»	»	Medium resistant

Note. Category resistant - IDD < 25 %, medium resistant - IDD = 25,1-50 %.

тений, высокорослых морфотипов с длинным и широким флаговым листом, а также с неопушенными колосковыми чешуями и листовой пластиной. Однако корреляционный анализ признаков исследуемой выборки сортов не выявил существенной взаимосвязи между степенью поражения болезнью и высотой растений (r = 0.24), длительностью периода вегетации (r = –0.18), опушенностью зерна (r = 0.12). В числе резистентных форм – генотипы риса с антоциановыми маркерными признаками растения с генами: *Pg-1*,*2*,*3*; *Pin-1*, *Pj-a*,*b*,*c*,*d*; *Pl*, *Pla*, *Plg*, *Plm*, *Pmr*, *Pr*, *Px*. Полагают, что система генов биосинтеза антоцианов обусловливает антиоксидантные свойства данных соединений, способствующих устойчивости растений к воздействию широкого спектра возбудителей болезни (Дзюба, 2004; Рысбекова и др., 2015).

С 2004 г. в ФГБНУ «ВНИИ риса» ведется масштабная программа создания селекционного материала риса нового поколения с длительной устойчивостью к пирикуляриозу методом маркерной селекции (MAS) на основе введения эффективных генов устойчивости в высокоурожайные сорта, обладающие полевой устойчивостью. Ряд авторов отмечают, что гены *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-40* формируют высокую устойчивость к краснодарской популяции патогена, а ген *Pi-9*, обладающий широким спектром действия, обеспечивает высокую полевую устойчивость (Волкова, Мухина, 2004; Ковалев и др., 2006; Супрун, Ковалев, 2015; Дубина, 2016). По экспериментальным данным известно, что частота встречаемости генов устойчивости в подвидах *indica* и *japonica* неодинакова (Tanweer et al., 2015). Так, генотипирование 66 сортообразцов коллекции риса на наличие гена *Pi-ta* выявило его присутствие только в сортах IR 36 (IRRI) и K1 (Франция) (Ковалев и др., 2006; Супрун, Ковалев, 2015). В наших исследованиях сорт Снежинка (с генами *Pi-b*, *Pi-ta*, *Pi-z*) стабильно показывал устойчивость к пирикуляриозу в годы исследований. Из сортов ростовской селекции Боярин (с генами *Pi-2*, *Pi-33*) оценивался как среднеустойчивый, Вираж (с генами *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-1*) – как устойчивый, а устойчивость сорта Магнат (с генами *Pi-1*, *Pi-2*) варьировала от устойчивого к среднеустойчивому.

На основе полученных нами данных по эффективности генов устойчивости к краснодарской популяции патогена построена и реализуется селекционная схема создания устойчивых к пирикуляриозу исходных форм. В качестве реципиентной родительской формы выступают высокоурожайные сорта селекции ВНИИ риса: Диамант, Кураж, Анаит, Фаворит, а в качестве доноров – линии иностранной селекции с эффективными генами устойчи-

вости: *Pi-1*, *Pi-z*, *Pi-ta*, *Pi-z5*, *Pi-9*, *Pi-5(t)*, *Pi-t*, *Pi-19*. По результатам проведенных исследований в условиях юга России для практической селекции риса на иммунитет рекомендованы источники устойчивости из эколого-географически отдаленных регионов, выделены образцы для изучения генетического контроля устойчивости к пирикуляриозу молекулярно-генетическими методами и получены данные об эффективности генов для ДНК-маркерной селекции.

Acknowledgments

The study was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations, program for development of gene pool collections, project 0685-2017-00022.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bidaux J.M. Screening for horizontal resistance to rice blast (*Pyricularia oryzae*) in Africa. In: Buddenhagen I.W., Persley G.J. (Eds.). Rice in Africa. London: Acad. Press, 1978;159-174.

Conaway-Bormans C.A., Marchetti M.A., Johnson C.W., Mc Clung A.M., Park W.D. Molecular markers linked to the blast resistance gene *Pi-z*, in rice for use in marker-assisted selection. Theor. Appl. Genet. 2003; 107:1014-1020.

Dzyba V.A. Genetika risa [Rice Genetics]. Krasnodar: Sovetskaya Kuban' Publ., 2004. (in Russian)

Dubina E.V. The introgression of genes of resistance to blast as a stabilizing factor in the resistance of rice plants to disease. Vestnik zashchity rasteniy = Plant Protection News. 2016;4(90):19-24. (in Russian)

Dubina E.V., Mukhina Zh.M., Kharitonov E.M., Shilovskiy V.N., Kharchenko E.S., Esaulova L.V., Korkina N.N., Maksimenko E.P., Nikitina I.B. Development of blast resistant rice varieties using DNA-marker technologies. Genetika = Genetics (Moscow). 2015;51(8):881-886. DOI 10.7868/S0016675815060053. (in Russian)

Garkusha S.V., Esaulova L.V., Gospadinova V.I. Problems of rice industry in Russian Federation and ways to solve them. Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC. 2015; 29(12):10-12. (in Russian)

Gorbunova Yu.V. et al. (Eds). Svodka po rasprostraneniyu ras i chastote vstrechaemosti genov virulentnosti pirikulyarioza risa na territorii osnovnykh risoseyushchikh rayonov SSSR v 1986 godu [Summary of the distribution of races and frequency of occurrence of genes for rice blast virulence in the main rice-growing regions of USSR in 1986]. Golitsino, 1987. (in Russian)

Guschin G.G. Ris [Rice]. Moscow; Leningrad: Sel'khozgiz Publ., 1930. (in Russian)

Kasiyanov A.I. Vrediteli risa: spravochnik [Rice Pests: Manual]. Krasnodar: ARRRI Publ., 2008. (in Russian)

Kolomiets T.M., Kovalenko E.D. Study of blast resistance inheritance in varieties. Immunitet selskohozyaystvennyih kultur k vozbuditelyam gribnyih bolezney [Immunity of crops to fungal pathogens]. Moscow, 1991;167-171. (in Russian)

Konovalova G.S., Soboleva O.N. Sources of resistance to the scald agent (*Rhynchosporium secalis*) among accessions from Southeastern Asia. Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 2010; 44(3):248-254. (in Russian)

Korotenko T.L., Chukhir I.N., Khorina T.A., Petrukhnenko A.A. Genetic diversity of the rice collection and aspects of its use in soil and climatic conditions of Kuban zone of rice growing. Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Works of Kuban State Agrarian University. 2017;66:131-137. (in Russian)

Korotenko T.L., Skazhennik M.A., Kharchenko E.S. Rice genetic sources of resistance to biotic and abiotic environmental factors. Risovodstvo = Rice Growing. 2014;2 (25):13-19. (in Russian)

Kovalev V.S. Results of work on rice breeding in Russia. Risovodstvo = Rice Growing. 2016;3-4(32-33):6-8. (in Russian)

Kovalev V.S., Mukhina Zh.M., Ilnitskaya E.T., Suprun I.I., Volkova S.A. Complex approach to rice breeding for resistance to blast with use of molecular markers. Doklady Rossijskoj Akademii Sel'skohozyajstvennyh Nauk = Reports of Russian Academy of Agricultural Science. 2006;4: 10-12. (in Russian)

Kovalevskaya V.A. Rice blast in Primorskiy region. Sbornik trudov SO VASKhNIL [Collection of works of the Siberian Branch of the Russian Academy of Agricultural Sciences]. Novosibirsk: PrimNIISH Publ., 1990;69-72. (in Russian)

Kratkiy otchet o nauchno-issledovatel'skoy rabote VNII risa za 1967–1970 gg. [Report on ARRRI Scientific Work for 1967-1970]. Krasnodar, 1971. (in Russian)

Lyakhovkin A.G. Ecogeographical groups of *O. sativa* L. and the global varietal diversity. Ris. Mirovoe proizvodstvo i genofond [Rice. Global Production and Gene Pool]. St. Peterburg: Profi-Inform Publ., 2005. (in Russian)

Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu mirovoy kollektsii risa i klassifikator roda *Oryza* L. [Guidelines on Studying the Global Rice Collection and Classifier of *Oryza* L.]. Leningrad: VIR Publ., 1982. (in Russian)

Metodicheskie ukazaniya po diagnostike, uchetu i otsenke vredonosnosti pirikulyarioza risa [Methodical Guidelines for the Diagnosis, Accounting, and Severity Evaluation of Rice Blast]. Moscow: All-Union Research Institute of Phytopathology Publ., 1988. (in Russian)

Pandey S. Screening of rice cultivars for quantification of apparent infection rate of leaf blast. Middle East J. Agric. Res. 2016;5(4):430-434. Available at: https://www.researchgate.net/publication/312136188.

Romanova T.S., Averiyanov A.A., Pasechnik T.D., Lapikova V.P., Beiker K.J. Rice resistance to blast caused by superficial moistening of leaves before infection. Fiziologiya rasteniy = Plant Physiology (Moscow). 2009;56(3):431-436. (in Russian)

Rysbekova A.V., Kazkeev D.T., Usenbekov B.N., Zhanbyrbaev E.A., Moshan B.I., Sartbaeva I.A. Development of starting material in breeding exclusive rice variteies in Kazakhstan. Molodoy uchenyy = Young Scientist. 2015;9.2:59-60. (in Russian)

Sanin S.S., Nazarova L.N. Phytosanitary situation in wheat crops in the Russian Federation (1991–2008). Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2010;2. (in Russian)

Smetanin A.P., Dzyuba V.A., Aprod A.I. Metodiki opytnykh rabot po selektsii, semenovodstvu, semenovedeniyu i kontrolyu za kachestvom semyan risa [Experimental Methods in Breeding, Seed Production, Seed Studies, and Rice Seed Quality Control]. Krasnodar, 1972. (in Russian)

Sokolova I.I. On the systematics of *Oryza* L. Trudy po prikladnoj botanike, genetike i selekcii (kukuruza i krupyanye kultury) = Works on applied botany, genetics and breeding (maize and cereals). 1969; XLI(2):117-147. (in Russian)

Suprun I.I., Kovalev V.S. Methodical diagram of multiplex DNA-marker identification of genes for rice blast resistance *Pi-40*, *Pi-b* and *Pi-ta*. Vestnik rossiyskoy selskokhozyaystvennoy nauki = Vestnik of the Russian Agricultural Science. 2015;3:16-18. (in Russian)

Tanweer F.A., Rafii M.Y., Sijam K., Rahim H.A., Ahmed F., Latif M.A. Current advance methods for the identification of blast resistance genes in rice. Biologies. 2015;338(5):321-340. DOI 10.1016/j.crvi2015.03.001.

Telebanco-Yanoria M.J.T., Ohsawa R., Senoo S., Kobayashi N., Fukuta Y. Diversity analysis for resistance of rice (*Oryza sativa* L.) to blast disease [*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.] using differential isolates from the Philippines. Plant Breeding. 2008;127:355-363.

Vavilov N.I. Centers of origin of cultural plants. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. Leningrad, 1926;1-2:248. (in Russian)

Volkova S.A., Mukhina Zh.M. Study of biodiversity of the rice blast agent by phytopathological and molecular methods. Risowodstvo = Rice Growing. 2004;4:101-104. (in Russian)

Witcombe J.R., Hash C.T. Resistance gene deployment strategies in cereal hybrids using marker-assisted selection: gene pyramiding, three-way hybrids, and synthetic parent populations. Euphytica. 2000;112:175-186.

Zelenskiy G.L. History of rice breeding in Russia. Part 1. Risowodstvo = Rice Growing. 2011;18:84-89. (in Russian)

Zelenskiy G.L. Control of Rice Blast by Developing Resistant Varieties. Krasnodar: KubGAU Publ., 2013. (in Russian)

Zelenskiy G.L. Rice: Biological Bases of Breeding and Agricultural Techniques. Krasnodar: KubGAU Publ., 2016. (in Russian)

Zelenskiy G.L., Shatalova M.V. New starting material for breeding for increasing performance. Politematicheskij setevoj ehlektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University, 2013;89(05):1025-1041. (in Russian)

Молекулярное маркирование признаков, определяющих качество зерна у российских сортов риса

Ю.К. Гончарова ✉, Е.М. Харитонов, Е.А. Малюченко, Н.Ю. Бушман

Всероссийский научно-исследовательский институт риса, Краснодар, Россия

В России ранее выращивали только низкоамилозные короткозерные сорта риса, но в последнее время в связи с ростом культуры потребления этого злака назрела необходимость создания отечественных сортов с различными характеристиками качества зерна. Несмотря на значительное число зарубежных работ по локализации генов, определяющих качество зерна риса, до сих пор нет аналогичных российских работ, что сдерживает темпы селекции данного направления. Целью нашего исследования стало выявление участков хромосом, несущих гены, определяющие признаки качества у отечественных сортов риса, и оценка пригодности использования маркерных локусов, идентифицированных в исследованиях зарубежных образцов, при работе с отечественным генофондом. В работе участвовали как нейтральные, так и связанные с признаками качества маркеры. С использованием 57 SSR-маркеров изучен полиморфизм отечественных сортов риса, контрастных по признакам «масса 1000 зерен», «стекловидность», «пленчатость» и «содержание целого ядра в крупе». Показано, что 12 изученных маркеров достоверно разделяли группы с различной формой зерновки, три маркера – с различным выходом целого ядра, и по одному маркеру – группы с различной стекловидностью и пленчатостью. Маркеры, достоверно разделяющие группы сортов с различной массой 1000 зерен, выходом крупы, содержанием белка, амилозы, не выявлены. Для семи хромосомных регионов, на которых расположены маркеры RM3276, RM5707, RM5508, RM7110, RM509, RM600, RM136, ассоциация с какими-либо признаками качества выявлена впервые. Возможно, в них расположены гены, определяющие качество зерна риса, которые специфичны для отечественных сортов.

Ключевые слова: рис; качество зерна; молекулярное маркирование; амилоза; содержание белка; форма зерновки; выход целого ядра; стекловидность.

Genetics of the traits defining the quality of Russian rice varieties

J.K. Goncharova ✉, E.M. Haritonov, E.A. Maljuchenko, N.J. Bushman

All-Russian Rice Research Institute, Krasnodar, Russia

In Russia, only low amylose short grain varieties were previously grown, but recently, because of the growth of consumption of this cereal, domestic varieties with various quality have become necessary. Absence of information on the genetics of this trait constrains selection in the given direction. Despite a considerable number of foreign works on localisation of genes defining quality of rice grain, there are no similar Russian works yet. Definition of the possibility of using loci identified from studying foreign samples, for marker assisted selection of domestic germplasm became the purpose of our research and possible localisation before the unknown loci defining the quality of rice grain. We used both neutral markers and those associated with quality. Polymorphism of the allocated groups of varieties with the contrasting quality trait was studied using 57 markers. Polymorphism of domestic varieties of rice with contrasting quality traits such as "weight of 1000 grains", "translucency", "husk content", "the maintenance of the whole kernel in a croup" was studied with use of the SSR markers to reveal chromosomal regions associated with the division of Russian rice varieties into groups based on the traits being studied. It was shown that 12 markers authentically divided groups with the various grain form, 3, with a various exit of the whole kernel, and 1 marker group, with various translucency and husk content. The markers authentically dividing groups of varieties with various weight of 1000 grains, groats exit, the protein and amylose content were not revealed. Data about the association of markers RM3276, RM5707, RM5508, RM7110, RM509, RM600, RM136 with the quality trait in references were not revealed. Probably, the genes defining the quality of rice grain, specific for domestic gemplasm, are located around the given markers.

Key words: rice; quality of grain; molecular marking; amylose; protein content, form of grain; exit of whole kernel; translucency.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М., Малюченко Е.А., Бушман Н.Ю. Молекулярное маркирование признаков, определяющих качество зерна у российских сортов риса. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):79-87. DOI 10.18699/VJ18.334

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Goncharova J.K., Haritonov E.M., Maljuchenko E.A., Bushman N.J. Genetics of the traits defining the quality of Russian rice varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018; 22(1):79-87. DOI 10.18699/VJ18.334 (in Russian)

Received 26.03.2017
Accepted for publication 30.10.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: serggontchar@mail.ru

Развитие международного рынка экспорта риса (*Oryza sativa* L.) диктует необходимость создания сортов с заданными свойствами качества (Улитин и др., 2012; Костылев и др., 2013). В России ранее выращивались только низкоамилозные короткозерные сорта подвида *japonica*. В последнее время, в связи с ростом культуры потребления этого злака, назрела необходимость создания отечественных сортов различного качества, пригодных как для приготовления суши и плова, так и для детского и диетического питания. Сорта первого направления, имеющие высокое содержание амилозы, в основном относятся к подвиду *indica*, но могут принадлежать разным видам (Гончарова, Харитонов, 2012). Глютинозные сорта второго направления тоже могут относиться к различным видам и подвидам риса (Ляховкин, 1992; Костылев и др., 2017). Для диетического питания создают сорта риса с окрашенным перикарпом и высоким содержанием микроэлементов (в 5–8 раз выше, чем у белозерных) и антиоксидантов (более чем в 20 раз выше, чем у сортов с неокрашенным перикарпом); они также принадлежат разным видам и подвидам риса (Zhang et al., 2010; Guo, 2011; Kushwaha, 2016).

У производителя и массового потребителя отношение к ассортименту продукции из риса различно и не всегда совпадает. Для производителя важно получить максимальный объем рисопродукта из сырья, что определяется размерами зерновки, ее формой и технологическими свойствами: трещиноватостью, стекловидностью, пленчатостью, выходом целого ядра (Коротенко и др., 2004; Туманьян и др., 2013, 2014). Потребителю необходим рисопродукт с привлекательным внешним видом (масса 1000 зерен, форма зерновки), высокими пищевыми достоинствами, для определенного вида кулинарных изделий (Туманьян и др., 2015). Только сорта, сочетающие в себе все вышеперечисленные критерии качества, получат широкое распространение в производстве. Поэтому селекционеры особое внимание уделяют поиску источников, позволяющих сократить сроки создания новых сортов с высокими показателями по признакам качества. Выявление молекулярных маркеров, связанных с признаками качества, определяет возможность использования маркерной селекции для ускорения работ (Xing et al., 2002).

Большинство отечественных сортов создано при гибридизации сортов подвидов *indica* (выращиваются на юге Китая, в Индии, Таиланде, Вьетнаме и т. д.) и *japonica* (Япония, Корея, север Китая, Италия). Ценными источниками для улучшения признаков качества подвида *japonica*, выращиваемого в России, могут служить межвидовые и межподвидовые гибриды риса (Ляховкин, 1992; Харитонов, Гончарова, 2013). Так, африканский вид риса *Oryza glaberrima* является ценным донором генов, улучшающих как технологические, так и потребительские свойства новых сортов риса (Blight et al., 1999). Ценные аллели могут быть получены при гибридизации с такими дикими видами риса, как, например, *O. rufipogon* или *O. longistaminata*. Многие современные сорта созданы при интрогрессии генов различных дикорастущих видов риса в высокопродуктивные образцы (Костылев, 2011).

Гены, определяющие признаки качества у различных видов риса, часто расположены в одних и тех же хромосомных регионах. Маркирование популяции, полученной при гибридизации *O. sativa* × *O. glaberrima*, позволило установить 27 локусов количественных признаков (QTL), связанных с девятью признаками качества (Aluko et al., 2004). Особенно ценно, что гены, связанные с содержанием амилозы и белка, были идентифицированы на тех же хромосомах, что и при маркировании внутривидовых и межподвидовых гибридов (Cai et al., 2015). QTL для признаков «выход целого ядра», «выход крупы» были иными (Wan et al., 2006). Пять локусов определяли пленчатость образцов, семь – улучшали такие признаки, как «выход крупы», «содержание белка», «отношение длины к ширине зерновки».

Длина зерновки играет важную роль в проявлении таких признаков качества, как «выход крупы», «выход целого ядра», определяет кулинарные и потребительские свойства. Значение признака контролируется шестью основными локусами и двенадцатью с эпистатическими эффектами (Xing et al., 2002). Наиболее стабильным из них в различных условиях среды был ген *qGL-3a*, локализованный на хромосоме 3 между маркерами RMw357 и RMw353 с расстоянием 87.5 kb. Длинная зерновка определяется рецессивным аллелем этого гена (Xing et al., 2002). Условия среды (температура, минеральное питание, засоление) значительно влияют на признаки качества (содержание амилозы, белка и т. д.), что необходимо учитывать при фенотипировании образцов риса (Гончарова и др., 2003). К сожалению, несмотря на значительное число зарубежных исследований по локализации генов, связанных с формированием качества зерна риса, до сих пор нет аналогичных российских работ. Отсутствие информации о генетике признаков качества сдерживает темпы селекции данного направления.

Целью нашего исследования стало выявление хромосомных регионов, на которых расположены гены, определяющие признаки качества у отечественных сортов риса, и оценка пригодности использования маркерных локусов, идентифицированных в исследованиях зарубежных образцов, при работе с отечественным генофондом.

Материалы и методы

В лаборатории качества ФГБНУ «ВНИИ риса» при передаче сорта на Госсортоиспытание в течение трех лет по стандартным методикам изучают ряд признаков, характеризующих качество зерна (Сметанин и др., 1972; Казаков, 1987; Туманьян и др., 2013, 2014). Полученные данные заносят в каталоги и базы данных, в которых собирается вся информация о коллекционных образцах (Каталог…, 2016).

Анализ баз данных отечественных образцов позволил нам разделить их на группы по признакам качества: форма зерновки (короткозерные, среднезерные, длиннозерные); пленчатость, выход целого ядра, стекловидность, масса 1 000 зерен, содержание амилозы, содержание белка. Оценку признаков качества образцов проводили по общепринятым методам (Аниканова, Тарасова, 1988; Кешаниди, Казаков, 1985). В качестве материала для исследований были использованы районированные и перспективные сорта российской селекции из коллекции ФГБНУ «ВНИИ риса», которые в соответствии с признаками качества

Table 1. Grain quality grouping of varieties bred in Russia

Group	Group name	Trait range	Variety
		Grain shape (length : width)	
1	Short-grain	1.7–2.1	Liman, Rapan, Khazar, Viola, Sadko, Druzhnyy, Atlant, Garant, Flagman, Boyarin, Zhemchug, Kasun, Yupiter
2	Medium-grain	2.2–2.5	Khankayskiy 429, Novator, Regul, Yantar, Lider, Ametist, Sprint, Fontan, Kurchanka, Anait, Pavlovskiy, Dal'nevostochnyy
3	Long-grain	2.6–4.2	Serpantin, Snezhinka, Sharm, Izumrud, Nartsiss, Fakel
		Grain vitreousness, %	
1	Low	0–62.9	Viola, Sprint
2	Medium	63.0–92.9	Atlant, Boyarin, Liman, Ametist, Druzhnyy, Pavlovskiy, Nartsiss, Yupiter, Fakel, Sadko, Rapan, Lider
3	High	93.0 – 100.0	Khankayskiy 429, Garant, Novator, Serpantin, Regul, Yantar', Khazar, Snezhinka, Sharm, Flagman, Izumrud, Zhemchug, Kasun, Fontan, Dal'nevostochnyy, Kurchanka
		Dry weight of 1000 grains, g	
1	Small grain	22.0–26.9	Khazar, Druzhnyy, Snezhinka, Izumrud, Sharm, Zhemchug
2	Medium grain	27.0–29.9	Flagman, Khankayskiy 429, Liman, Garant, Novator, Serpantin, Regul, Yantar', Rapan, Lider, Ametist, Viola, Fontan, Kurchanka, Boyarin, Nartsiss, Sprint, Sadko, Kasun, Yupiter, Dal'nevostochnyy, Atlantнка, Боярин, Нарцисс, Спринт, Садко, Касун, Юпитер, Дальневосточный, Атлант
3	Large grain	30.0–44.0	Fakel, Pavlovskiy, Anait
		Whole grain content in milled rice, %	
1	Low	45.0–76.9	Serpantin, Druzhnyy, Anait, Izumrud, Zhemchug, Viola, Atlant
2	Medium	77.0–90.9	Khankayskiy 429, Liman, Novator, Yantar', Fontan, Regul, Khazar, Druzhnyy, Snezhinka, Atlant, Sharm, Sadko, Rapan, Pavlovskiy, Boyarin, Nartsiss, Kasun, Yupiter, Fakel, Dal'nevostochnyy
3	High	91.0–97.0	Flagman, Ametist, Kurchanka, Garant, Sprint, Lider
		Hull percentage	
1	Low	15.9–16.9	Khankayskiy 429, Yantar', Druzhnyy, Pavlovskiy, Viola, Yupiterp
2	Medium	17.0–18.5	Garant, Serpantin, Boyarin, Regul, Lider, Sprint, Fontan, Atlant, Novator, Kurchanka, Snezhinka, Izumrud, Flagman, Kasun, Fakel, Dal'nevostochnyy, Sharm, Ametist
3	High	18.6–19.0	Rapan, Novator, Khazar, Anait, Zhemchug, Nartsiss

были разделены на три группы: с максимальным, минимальным и промежуточным значением признака (табл. 1).

Был изучен полиморфизм выделенных групп сортов, контрастных по признакам качества, с использованием 57 SSR-маркеров, распределенных по 12 хромосомам риса. В работе использовали как нейтральные, так и связанные с признаками качества маркеры (Akagi et al., 1996). Для анализа выбирали маркеры со значительной разницей в размерах продуктов амплификации у контрастных по признаку образцов. Информация о маркерах, использованных в работе, получена на сайте www.gramene.org, где имеются данные об ориентировочном размере ПЦР-продуктов, рекомендуемой температуре плавления, ассоциации маркеров с признаками. Количество маркеров на хромосому варьировало от двух (на 3-й, 10-й, 11-й и 12-й хромосомах) до девяти (на 4-й и 5-й). На 1-й, 7-й и 9-й хромосомах расположено по четыре маркера; на 6-й и 8-й – по шесть (табл. 2).

При молекулярном маркировании использовали 32 российских сорта: Ханкайский, Садко, Приморский, Лиман, Гарант, Павловский, Рапан, Новатор, Серпантин, Боярин, Регул, Янтарь, Жемчуг, Лидер, Хазар, Аметист, Нарцисс, Дружный, Спринт, Виола, Дальневосточный, Фонтан, Касун, Юпитер, Атлант, Курчанка, Факел, Снежинка, Шарм, Анаит, Флагман, Изумруд.

ДНК риса выделяли из этиолированных проростков и листьев с помощью STAB-метода в различных модификациях. Постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) и визуализацию продуктов амплификации проводили по методике Международного института риса (Murray, Thompson, 1980). Параметры ПЦР, использованные в данном эксперименте: 5 мин при 94 °С – начальная денатурация; следующие 35 циклов: 1 мин – денатурация при 94 °С, 1 мин – отжиг праймеров при 55 °С, 2 мин – синтез при 72 °С; последний его цикл – 7 мин при 72 °С. ПЦР-смесь включала: 40 нг ДНК (2 мкл), 1 мкл (1 мМ) дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 3.7 мкл H_2O, 1 мкл буферного раствора, по 0.5 мкл (5 мкМ) каждого праймера, 1 мкл (1.5 ед.) Taq-полимеразы, в общем объеме 10 мкл. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 8 % полиакриламидном геле при напряжении 100 В. Для однофакторного дисперсионного анализа

Table 2. Distribution of markers employed in the study over rice chromosomes

Chromosome	Number of markers	Markers
1	4	RM104, RM259, RM600, RM5638
2	7	RM53, RM154, RM240, RM318, RM322, RM2770, RM5707
3	2	RM227, RM347
4	9	RM24, RM127, RM140, RM255, RM261, RM335, RM3276, RM6314, RM7187
5	9	RM13, RM30, RM289, RM405, RM440, RM509, RM574, RM5361, RM6024
6	6	RM141, RM162, RM276, RM588, RM5371, RM6811
7	4	RM82, RM542, RM5508, RM7110
8	6	RM25, RM126, RM256, RM284, RM3155, RM8243
9	4	RM242, RM245, RM444, RM7048
10	2	RM258, RM590
11	2	RM286, RM3428
12	2	RM463, RM6410

использовали относительный размер продукта амплификации при работе с соответствующим маркером. За единицу принимали размер продукта амплификации у образца с минимальным его значением, остальные аллели обозначали в соответствии с увеличением размера продукта амплификации. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0.

Результаты

При изучении российских сортов по 57 SSR-маркерам, распределенным по геному риса, выявлен полиморфизм по многим из них. Дисперсионный анализ по достоверности разделения групп, контрастных по признакам качества, с использованием SSR-маркеров показал, что 12 из изученных маркеров достоверно разделяли группы сортов с различной формой зерновки, три маркера – группы с различным выходом целого ядра, и по одному маркеру достоверно разделяли группы с различной стекловидностью и пленчатостью (табл. 3).

Маркеры, позволяющие достоверно разделить группы сортов с различной массой 1000 зерен, разным выходом крупы, содержанием белка, амилозы, не выявлены. Выделены маркеры, с использованием которых изучаемые группы сортов достоверно разделяли по признаку «форма зерновки»: RM574, RM347, RM53, RM162, RM240, RM509, RM25, RM3276, RM5707, RM5508. По признаку «выход целого ядра» позволяли достоверно разделить группы сортов маркеры RM162, RM286 и RM600. По признакам «стекловидность эндосперма» и «пленчатость» зерновки риса для разделения групп можно использовать только маркеры RM289 и RM7110 соответственно.

Нами проведено сравнение локализации выявленных маркеров, с использованием которых изучаемые группы российских сортов достоверно разделялись по признакам, с локализацией ранее описанных генов и QTL (табл. 4). Установлено, что в районах локализации большинства выделенных нами маркеров ранее уже были выявлены локусы, контролирующие признаки качества риса (Bao et al., 2002a, b; Aluko et al., 2004; Wan et al., 2006). Несмотря на продемонстрированную с помощью дисперсионного анализа связь маркеров с признаками качества, эффективность их применения для разделения групп различна, так как большинство выделенных маркеров разделяет не все изучаемые группы сортов.

По форме зерновки (среднезерные, длиннозерные, короткозерные) группы отечественных сортов достоверно можно разделять с помощью 12 маркеров, однако только некоторые из них позволяли достоверно различать все выделенные по форме зерновки группы сортов. Связь маркера RM574 с таким признаком качества, как вязкость геля, была отмечена и ранее (Bao et al., 2002a). Вязкость геля зависит от содержания амилозы в образце, высокоамилозные образцы для приготовления плова – это, как правило, длиннозерные сорта подвида *indica*. Маркер расположен на хромосоме 5, и его использование позволяет достоверно разделить все три группы сортов: группа среднезерных сортов по размеру продуктов амплификации занимает промежуточное положение между короткозерной и длиннозерной группами (рис. 1).

Маркер RM347, расположенный на хромосоме 3 и связанный с признаком «растворение в щелочи» (Cai et al., 2015), не позволяет достоверно разделить среднезерные и длиннозерные сорта риса. Маркер RM25, локализованный на хромосоме 8, позволяет достоверно разделить коротко- и среднезерные образцы. Он сцеплен с генами, отвечающими за признаки «масса 1000 зерен», «выход целого ядра», «объем корня», «количество выполненных зерен» (Cui et al., 2002a). Маркер RM53, связанный с признаками «растворение в щелочи», «масса 1000 зерен», «продолжительность приготовления крупы» (Bao et al., 2002b), расположен на хромосоме 2 и достоверно разделяет коротко- и среднезерные группы отечественных сортов, длиннозерная группа сортов достоверно по размеру продуктов амплификации от них не отличается.

Маркер RM162 локализован на хромосоме 6. Ранее была выявлена его связь с генами, определяющими вязкость геля, выход целого ядра, содержание амилозы, растворение в щелочи, содержание протеина, длину зерновки, отношение длины зерна к ширине (Bao et al., 2002a; Cui et al., 2002a, b). Он позволяет достоверно выделить две груп-

Table 3. Analysis of variance proving the correctness of the grouping of varieties with SSR markers according to quality traits

Marker	SS1	df1	MS1	SS2	df2	MS2	F	*p*
Grain shape								
RM574	2.61	6.00	0.43	2.17	15.00	0.14	3.01	0.04
RM347	0.98	6.00	0.16	0.83	15.00	0.06	2.95	0.04
RM240	15.15	6.00	2.53	8.67	15.00	0.58	4.37	0.01
RM136	3.75	6.00	0.62	1.71	15.00	0.11	5.48	0.00
RM162	61.22	6.00	10.20	35.38	15.00	2.36	4.33	0.01
RM140	1.73	6.00	0.29	1.54	15.00	0.10	2.81	0.05
RM53	5.49	6.00	0.91	4.88	15.00	0.33	2.81	0.05
RM25	1.32	6.00	0.22	0.50	15.00	0.03	6.59	0.00
RM509	1.92	6.00	0.32	0.67	15.00	0.04	7.22	0.00
RM3276	4.95	6.00	0.83	4.00	15.00	0.27	3.10	0.04
RM5508	61.73	6.00	10.29	35.54	15.00	2.37	4.34	0.01
RM5707	20.95	6.00	3.49	14.00	15.00	0.93	3.74	0.02
Grain vitreousness								
RM289	1.52	2.00	0.76	2.77	18.00	0.15	4.93	0.02
Whole grain content in milled rice								
RM162	30.49	2.00	15.25	66.10	19.00	3.48	4.38	0.03
RM286	17.58	2.00	8.79	25.01	19.00	1.32	6.68	0.01
RM600	24.39	2.00	12.20	23.61	9.00	2.62	4.65	0.04
Hull percentage								
RM7110	10.19	2.00	5.09	24.58	19.00	1.29	3.94	0.04

Designations: SS1, intergroup square sum; df, number of degrees of freedom; MS1, intergroup variance; SS2, intragroup square sum; MS2, intragroup variance; F, Fisher's criterion; *p*, statistical significance.

пы российских сортов по форме зерновки и выходу целого ядра (рис. 2).

RM509 и RM240, расположенные на хромосомах 5 и 2, не позволяют достоверно разделить среднезерные и короткозерные группы сортов. Возможно, влияние локусов, ассоциированных с этими маркерами, маскируется другими локусами.

С использованием маркеров RM3276 и RM5707, расположенных на хромосомах 4 и 7 соответственно, недостоверно разделяются короткозерные и длиннозерные в случае первого маркера и среднезерные и короткозерные группы сортов – в случае второго. Эти маркеры позволяют достоверно идентифицировать только одну группу сортов с наиболее интенсивным проявлением признака. Маркер RM5508, локализованный на хромосоме 7, позволяет достоверно разделить все выделенные группы сортов по изучаемому признаку. Данных об ассоциации трех вышеперечисленных маркеров с какими-либо признаками качества нет ни на сайте www.gramene.org, ни в других источниках. Возможно, в районе этих маркеров расположены гены, определяющие размеры зерновки, специфичные для отечественного генофонда.

Достоверно разделить группы сортов по признаку «стекловидность эндосперма» зерновки риса (средняя, низкая и высокая) позволял только маркер RM289, расположенный на хромосоме 5. Ранее в районе этого маркера были локализованы гены, определяющие массу 1 000 зерен, консистенцию геля, ширину зерновки, форму зерновки, соотношение длины зерновки к ширине, процентное содержание белого брюшка зерновки, белых ядер зерновки, выход крупы, цвет муки (Temnykh et al., 2001; Jiang et al., 2004).

Три группы сортов российской селекции по признаку «выход (содержание) целого ядра» (средний, низкий и высокий выход) можно было достоверно разделить с помощью трех маркеров: RM162, RM286, RM600. Описание маркера RM162 приведено ранее, при изучении маркеров, связанных с локусами, определяющими форму зерновки.

Маркер RM286 расположен на хромосоме 11 и связан с признаками «доля окрашенных зерен», «масса 1 000 зерен». Он позволяет выявить российские образцы с высоким выходом целого ядра. С использованием маркера RM600 (хромосома 1) достоверно разделяли все изучаемые группы сортов по выходу целого ядра. Ранее в этом регионе не было выявлено локусов, определяющих качество зерна.

По признаку «пленчатость зерна» (средняя, низкая и высокая) группы российских сортов достоверно разделяли

Table 4. Properties of markers reliably distinguishing groups of rice varieties according to quality traits

Marker	Melting temperature, °C	Amplicon length, bp	Repetitive motif	Chromosome (number of allelels)	Associated traits
			Different grain shapes		
RM5508	50	177	$(TC)_{29}$	7 (8)	–
RM5707	50	139	$(AAT)_{21}$	2 (5)	–
RM509	55	141	$(TC)_{11}$	5 (3)	–
RM136	55	101	$(AGG)_7$	6 (2)	Number of grains, root length, grain weight per panicle, leaf senescence (Temnykh et al., 2001)
RM140	55	261	$(CT)_{12}$	6 (2)	Whole grain yield, grain length : width (Aluko et al., 2004)
RM25	55	146	$(GA)_{18}$	8 (2)	1000 grain weight, whole grain yield (Cui et al., 2002a)
RM53	55	182	$(GA)_{14}$	2 (3)	Whole grain yield, grain shape, alkali digestion time (Bao et al., 2002a, b; Aluko et al., 2004)
RM240	55	132	$(CT)_{21}$	2 (5)	1000 grain weight, whole grain yield, number of cracked grains (Xing et al., 2002; Jiang et al., 2004)
RM347	55	207	$(GG)_5(AT)_7$	3 (2)	Alkali digestion time (Cui et al., 2002b; Bao et al., 2002b; Cai et al., 2015)
RM162	61	229	$(AC)_{20}$	6(8)	Whole grain yield, grain length, grain length : width (Bao et al., 2002a; Cui et al., 2002a, b; Wan et al., 2006)
RM3276	50	163	$(CT)_{13}$	4 (4)	–
RM574	55	155	$(GA)_{11}$	5 (3)	Gel viscosity (Blight et al., 1999; Bao et al., 2002a; Wan et al., 2006)
			Different levels of vitreousness		
RM289	108	55	$G_{11}(GA)_{16}$	5 (2)	1000 grain weight, grain width, grain shape, grain length : width, yield of milled rice (Temnykh et al., 2001; Jiang et al., 2004)
			Different whole grain yields		
RM162	*See above				
RM286	55	110	$(GA)_{16}$	11 (6)	1000 grain weight, grain color (Temnykh et al., 2001; Xing et al., 2002; Jiang et al., 2004)
RM600	55	220	$(TTA)_{19}$	1 (7)	Number of roots, root weight : shoot weight (Temnykh et al., 2001)
			Different hull percentages		
RM7110	55	176	$(AGAT)_9$	7 (6)	–

только с использованием SSR-маркера RM7110. Данный маркер расположен на хромосоме 7 и связан с признаками «количество корней», «соотношение массы корней и побегов». Информации о связи маркера с локусами, определяющими качество, в литературных источниках не выявлено.

Обсуждение

Изученный полиморфизм групп сортов, контрастных по признакам качества зерновки, позволил выявить хромосомные регионы, связанные с их формированием у отечественных сортов риса. До сих пор такого рода исследований для отечественных образцов риса не проводилось. Не было данных о локализации генов, определяющих признаки качества, не выявлены даже группы сцепления. В зарубежной литературе подобные исследования проводились на различном материале, в результате чего для большинства хромосом риса выявлены районы, определяющие признаки качества. Однако нет данных, какие районы возможно использовать для разделения на контрастные по признакам качества группы сортов российской селекции. Кроме того, важно было выявить локусы, специфич-

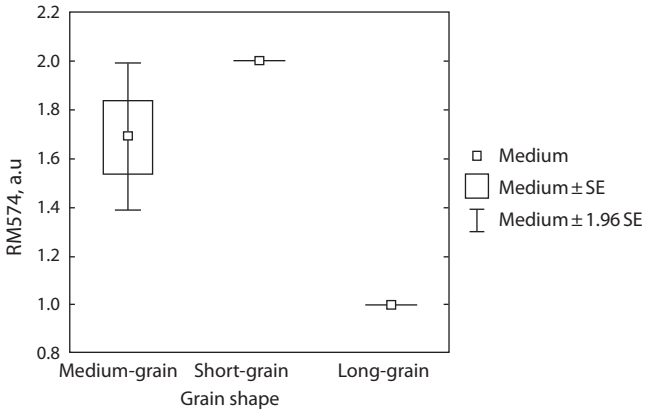


Fig. 1. Grouping of Russian varieties with different grain shapes according to the amplification product length with SSR marker RM574.

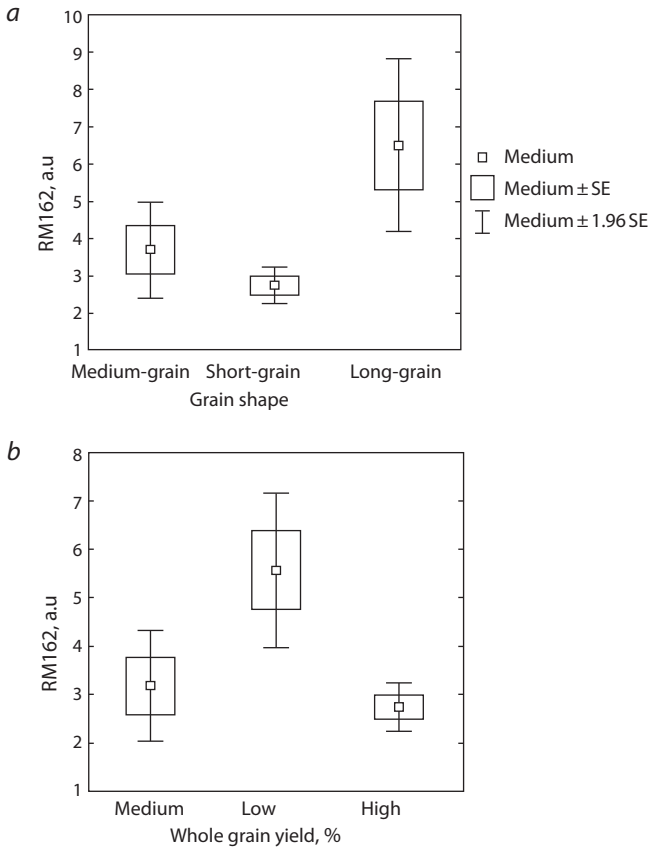


Fig. 2. Grouping of Russian varieties with (*a*) different grain shapes and (*b*) different whole grain yields according to the amplification product length with SSR markerRM162.

ные для отечественного генофонда, с целью дальнейшего точного картирования этих хромосомных регионов.

Маркеры, достоверно разделяющие группы сортов с различной массой 1000 зерен, выходом крупы, содержанием белка, амилозы, в данном исследовании не выявлены. Это можно считать закономерным результатом, так как на вышеперечисленные признаки оказывают влияние десятки генов, расположенных на всех хромосомах. Формирование одних признаков зависит от небольшого числа локусов с относительно значительными эффектами, их мы в работе выявить можем. Другие признаки формируются под влиянием значительного числа локусов с очень слабыми эффектами, которые не доступны для выявления используемыми в работе методами. Большинство сортов несет несколько генов, проявление влияния которых на признаки качества растений перекрывается (за счет разнонаправленности эффектов), что маскирует их действие. В нашем исследовании, в связи с небольшим размером выборки и количеством маркеров, могут быть установлены только локусы с максимальным фенотипическим эффектом. Сведения о локализации генов риса, собранные на сайте www.gramene.org, позволяют не только использовать в работе известные маркеры, но и дополнительно подтвердить полученные данные. Связь выявленных хромосомных регионов с изучаемыми признаками, ранее установленная другими учеными, косвенно подтверждает полученные нами результаты.

Ценность настоящей работы состоит не только в том, что впервые для российского генофонда выявлены хромосомные регионы, определяющие признаки качества. Нами показана возможность сокращения материальных затрат и трудоемкости методик выявления хромосомных регионов, определяющих вариабельность признаков при изучении неизвестных образцов. Как правило, при локализации генов используют популяции: F_2, рекомбинантные инбредные линии (RIL) или рекомбинантные дигаплоидные линии (DH), причем число изучаемых растений в них обычно больше 100. Для анализа полиморфизма в них используется не менее 100 равномерно распределенных по геному маркеров, расстояние между которыми не превышает 20 сМ. При точной локализации (с целью выявления генов-кандидатов) дополнительно привлекают несколько сотен маркеров из того хромосомного района, для которого связь с признаком установлена (Aluko et al., 2004; Collard et al., 2005; Xu, Crouch, 2008). На данном этапе, когда уже локализованы тысячи генов, определяющих формирование признаков риса, для выявления маркеров с максимальным фенотипическим эффектом можно использовать групповую селекцию (bulk breeding) (Collard, Mackill, 2008; Xu, 2010; Ye, Smith, 2010). Этот подход позволяет экономить время и средства, избегая создания и анализа больших популяций. Полученные данные можно сопоставить с накопленными сведениями о ранее маркированных локусах, которые суммированы в ресурсе www.gramene.org, и выделить маркеры, пригодные для анализа изучаемого генофонда, в том числе для маркер-контролируемого отбора селекционного материала. Такая предварительная проверка известных диагностических маркеров на собственном генофонде необходима, поскольку не всегда гены, дифференцирующие сорта по признаку в одном районе мира, эффективны для другого региона, где признак может определяться совершенно другими локусами.

В нашем исследовании установлено, что двенадцать из изученных маркеров позволяют достоверно разделить группы с разной формой зерновки, три – с различным выходом целого ядра, и по одному маркеру – группы с раз-

личной стекловидностью и пленчатостью. Максимальная эффективность при разделении групп сортов с разной формой зерновки характерна для маркеров RM574, RM162, RM5508, расположенных на хромосомах 5, 6 и 7 соответственно, – их использование позволяет достоверно разделить образцы на коротко-, средне- и длиннозерные. Маркеры RM240, RM5707 позволяют достоверно выделять только длиннозерные сорта, не разделяя группы средне- и короткозерных образцов. Так, длиннозерные сорта отечественной селекции (Серпантин, Снежинка, Шарм, Изумруд, Нарцисс, Факел) по размеру продукта амплификации при использовании маркера RM240 достоверно отличаются от средне- и короткозерной групп (см. табл. 1). В случае маркера RM574 у всех трех групп сортов продукты амплификации имеют разный размер.

Маркеры, связанные с признаками «стекловидность зерновки» (RM289) и «пленчатость» (RM7110), позволяют достоверно разделить все группы и расположены на хромосомах 5 и 7 соответственно. С признаком «содержание целого ядра» связаны маркеры RM162 (хромосома 6), RM286 (хромосома 11) и RM600 (хромосома 1). Большая часть маркеров, для которых установлена связь с формированием признаков качества отечественных образцов, локализована в регионах, где уже выявлено наличие генов, определяющих качество, но на образцах иностранного происхождения. Наличие связи хромосомного региона расположения маркера RM162 с формированием двух изучаемых признаков вполне объяснимо, так как признаки «форма зерновки» и «выход целого ядра» взаимосвязаны. Как правило, короткозерные образцы имеют более высокий выход целого ядра. Однако эта связь может и не проявиться в случае, если короткозерный образец обладает низкой стекловидностью, трещиноватостью или высоким содержанием белка.

Данных об ассоциации маркеров RM3276, RM5707, RM5508, RM136, RM509, расположенных на хромосомах 2, 4, 5, 6, 7 и связанных, согласно нашему исследованию, с разделением отечественных сортов по группам с различной формой зерновки, с какими-либо признаками качества в литературных источниках не обнаружено. Возможно, в районе этих маркеров расположены гены, которые определяют размеры зерновки, специфичные для отечественного генофонда. Это же относится к маркерам RM7110 и RM600, по нашим сведениям, солокализованным с генами, определяющими пленчатость зерновки и выход целого ядра.

В качестве диагностических по признакам качества для сортов отечественной селекции мы рекомендуем использовать следующие маркеры: при разделении групп сортов с различной формой зерновки – RM574, RM162, RM5508; по признаку «стекловидность зерновки» – RM289, «пленчатость» – RM7110, «содержание целого ядра» – RM162, RM600.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-44-230207, and the Krasnodar Krai administration.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Akagi H., Yokozeki Y., Inagaki A. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 1996;93:1071-1077. DOI 10.1007/BF00230127.

Aluko G., Martinez C., Tohme J. QTL mapping of grain quality traits from the interspecific cross *Oryza sativa* × *O. glaberrima*. Theor. Appl. Genet. 2004;109:630-639.

Anikanova Z.F., Tarasova L.E. Ris: sort, urozhay, kachestvo [Rice: Variety, Yield, Quality]. Moscow: Agropromizdat Publ., 1988. (in Russian)

Bao J.S., Corke H., Sun M. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 2002a;105:898-905.

Bao J.S., Wu Y.R., Hu B. QTL for rice grain quality based on a DH population derived from parents with similar apparent amylose content. Euphytica. 2002b;128:317-324.

Blight H.F., Blackhall N.W., Edwards K.J., Me Clung A.M. Using amplified fragment length polymorphisms and simple sequence length polymorphisms to identify cultivars of brown and white milled rice. Crop Sci. 1999;39:1715-1721.

Cai H., Xu D., Zhou L., Cheng J., Zhang Z., Wu J., You A. Development of PCR-based SNP marker of rice Waxy gene with confronting two-pair primers. Acta Genetica Sinica. 2015;51(7):787-791.

Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica. 2005;142(1-2):169-196. DOI 10.1007/s10681-005-1681-5.

Collard B.C.Y., Mackill D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Phil. Trans. R. Soc. 2008;363:557-572. DOI 10.1007/s10681-005-1681-5.

Cui K., Peng S.B., Xing Y.Z., Yu S.B., Xu C.G. Molecular dissection of relationship between seedling characteristics and seed size in rice. Acta Botanica Sinica. 2002a;44(6):702-707.

Cui K.H., Peng S.B., Xing Y.Z., Yu S.B., Xu C.G. Genetic analysis of the panicle traits related to yield sink size of rice. Acta Genetica Sinica. 2002b;29(2):144-152.

Goncharova Yu.K., Kharitonov E.M. Performance improvement in intersubspecific hybrids of rice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(4):926-935. (in Russian)

Goncharova Yu.K., Kharitonov E.M., Bushman N.Yu., Vereshchagina S.A. The influence of stress factors on the amylose content in Russia-bred rice varieties. Vestnik RASKhN = Herald of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2003;5:45-48. (in Russian)

Guo Y.M. Evaluation and correlation analysis on mineral concentrations and pigment content in pericarp of color rice. Biochem. Pharmacol. 2011;75:1393-1401.

Jiang G.H., Xu C.G., Li X.H., He Y.Q. Characterization of the genetic basis for yield and its component traits of rice revealed by doubled haploid population. Acta Genetica Sinica. 2004;31(1):63-72.

Katalog sortov risa i ovoshchebakhchevykh kul'tur kubanskoy selektsii [Catalog of varieties of rice, vegetables, and melon crops bred in the Kuban region]. Krasnodar: EDVI Publ., 2016. (in Russian)

Kazakov E.D. Metodika otsenki kachestva zerna [The Technique of an Estimation of Quality of Grain]. Moscow: Agropromizdat Publ., 1987. (in Russian)

Keshanidi Kh.L., Kazakov E.D. Tekhnologicheskaya otsenka risa – zerna [Technological Evaluation of Rice]. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)

Kharitonov E.M., Goncharova Yu.K. Sterility of intersubspecific hybridization of rice *Oryza sativa* L. in the context of search for genes for broad compatibility and assignment of specimens to subspecies

indica or *japonica*. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2013;5:61-68. (in Russian)

Korotenko T.L., Gospadinova V.I., Zelenskiy G.L. Comparative evaluation of grain quality and performance of rice genotypes differing in grain size and shape. Risovodstvo = Rise Growing. 2004;5:48-53. (in Russian)

Kostylev P.I. Dikie vidy risa [Wild Species of Rice]. Moscow: Sputnik Publ., 2011. (in Russian)

Kostylev P.I., Franceva N.V., Kostyleva L.M. Analysis of qualities of grain and head rice in pedigree rice accessions. Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2013;5:31-37. (in Russian)

Kostylev P.I., Krasnova E.F., Kostyleva L.M. Study of rice hybrids from crossing of Turkish and Russian varieties in Rostov region. Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2017;4:35-40. (in Russian)

Kushwaha U.K.S. Black Rice: Research, History and Development. Springer Int. Publ. Switzerland, 2016. DOI 10.1007/978-3-319-30153-2.

Lyahovkin A.G. Mirovoe proizvodstvo i genofond risa [Global Production and the Gene Pool of Rice]. St. Petersburg: Profi-inform Publ., 1992. (in Russian)

Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 1980;8:4321-4325.

Smetanin A.P., Dzyuba V.A., Aprod A.I. Metodiki opytnykh rabot po selektsii, semenovodstvu, semenovedeniyu i kontrolyu za kachestvom semyan risa [Methods of Experimental Work on Breeding, Seed Production, Seed and Monitoring Seed Quality of Rice]. Krasnodar, 1972. (in Russian)

Temnykh S., Clerck D.G., Lukashova A. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Res. 2001;11:1441-1452.

Tumanyan N.G., Kumejko T.B., Olhovaya K.K., Kharitonov E.M. Qualitative characteristics of rice grains and amylose content in Russian (ARRRI) and Italian (SA.PI.SE Breeding Station, Vercelli) rice varieties. Risovodstvo = Rice Growing. 2014;1:33-40. (in Russian)

Tumanyan N.G., Kumejko T.B., Ostapenko N.V., Olhovaya K.K., Kharitonov E.M. New rice varieties bred in ARRRI. Traits of grain quality. Risovodstvo = Rice Growing. 2015;1-2:16-23. (in Russian)

Tumanyan N.G., Zelenskij G.L., Olhovaya K.K., Ostapenko N.V. Grain quality parameters in accessions of rice subspecies indica and japonica bred in Russia and abroad. Nauchnyy zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU. 2013;94(10). (in Russian)

Ulitin V.O., Kharitonov E.M., Goncharova Yu.K. On quality traits and their genetic control in rice *Oriza* L. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2012;3:12-18. (in Russian)

Wan X.Y., Wan J.M., Jiang L. QTL analysis for rice grain length and fine mapping of an identified QTL with stable and major effects. Theor. Appl. Genet. 2006;112(7):1258-1270.

Xing Z., Tan F., Hua G. Characterization of the main effects, epistatic effects and their environmental interactions of QTLs on the genetic basis of yield traits in rice. Theor. Appl. Genet. 2002;105:248-257.

Xu Y. Molecular Plant Breeding. CAB International, 2010.

Xu Y., Crouch J.H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. Crop Sci. 2008;48:391-407.

Ye G., Smith K.F. Marker-assisted gene pyramiding for cultivar development. Plant Breed. Rev. 2010;33:234.

Zhang M.W., Zhang R.F., Zhang F.X., Liu R.H. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. J. Agric. Food Chem. 2010;58:7580-7587.Zhang M.W., Zhang R.F., Zhang F.X., Liu R.H. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. J. Agric. Food Chem. 2010;58:7580-7587.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):88-96
DOI 10.18699/VJ18.335

Минеральный состав зерна диких сородичей и интрогрессивных форм в селекции пшеницы

Т.В. Савин[1], А.И. Абугалиева[1, 2] ✉, И. Чакмак[3], К. Кожахметов[1]

[1] Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, Алмалыбак, Казахстан
[2] Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан
[3] Университет Сабанчи, Стамбул, Турция

Изучен минеральный состав зерна интрогрессивных форм мягкой пшеницы в сравнении с дикими сородичами и сортами. Высокий уровень содержания макро- и микроэлементов (N, P, K, Mg, S, Ca, Mn, Fe, Zn, Cd, Cu) выявлен у диких видов *Aegilops ovata* и *Ae. triuncialis*, общий повышенный фон – у сородичей относительно современных сортов *Triticum aestivum* (стандарты). По содержанию макро- и микроэлементов интрогрессивные формы пшеницы занимали промежуточное положение между дикими сородичами и современными сортами. Выявлены переходные формы (Жетысу × *T. militinae*; Жетысу × *T. kiharae*; Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) с уровнем минерального состава, характерным для диких форм. Все изученные генотипы дифференцированы на три кластера. Первый состоит преимущественно из интрогрессивных форм, *Ae. triaristata* и сорта Комсомольская 1, в происхождении которого участвовали дикие формы. Второй кластер включает в основном сорта (родительские формы), *T. timopheevii* и интрогрессивную форму Стекловидная 24 × *T. militinae*. В третий кластер входят виды *T. militinae*, *T. kiharae*, *Ae. cylindrica* и интрогрессивные формы с их участием: Жетысу × *T. militinae* и Безостая 1 × *Ae. cylindrica*. Такое деление позволяет классифицировать генотипы по уровню метаболизма: дикие сородичи (третий кластер), сорта (второй кластер) и промежуточный – интрогрессивные формы (первый кластер). В целом включение культурных форм (беккроссирование с районированными сортами) в скрещивания с интрогрессивными формами, как правило, сопровождается снижением общего метаболического уровня, но специфично относительно сортов и диких видов, характеризующихся полиморфизмом. Выявлены источники высокого содержания макро- и микроэлементов – дикие сородичи и интрогрессивные формы, часть из которых использовалась в качестве доноров при скрещивании с сортами. По результатам топкроссных скрещиваний со стандартами – коммерческими и наиболее распространенными сортами Стекловидная 24, Алмалы, Жетысу – для двух константных линий (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae* и Жетысу × *T. kiharae* выявлена передача содержания K, P, Mg, S, Fe, Mn, Zn и P, Mg, N потомству этих генотипов в F_2–F_3 поколениях.

Ключевые слова: зерно; макро- и микроэлементы; пшеница; дикие сородичи; интрогрессивные формы; источники; доноры; топкроссы.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Савин Т.В., Абугалиева А.И., Чакмак И., Кожахметов К. Минеральный состав зерна диких сородичей и интрогрессивных форм в селекции пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):88-96. DOI 10.18699/VJ18.335

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Savin T.V., Abugaliyeva A.I., Cakmak I., Kozhakhmetov K. Mineral composition of wild relatives and introgressive forms in wheat selection. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):88-96. DOI 10.18699/VJ18.335 (in Russian)

Received 17.05.2017
Accepted for publication 27.10.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: kiz_abugalieva@mail.ru

Mineral composition of wild relatives and introgressive forms in wheat selection

T.V. Savin[1], A.I. Abugaliyeva[1, 2] ✉, I. Cakmak[3], K. Kozhakhmetov[1]

[1] Kazakh Research Institute of Agriculture and Plants, Almalybak, Kazakhstan
[2] Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan
[3] Sabanci University, Istanbul, Turkey

The study of seed mineral composition of wheat and its wild relatives revealed higher content of all elements in *Aegilops ovata* and *Ae. triuncialis*, as well as an overall increased background in relatives compared to modern varieties of *Triticum aestivum* (standards). By content of macro- and microelements, synthetic forms of wheat occupy an intermediate position between wild relatives and modern varieties. Transitional forms with the level of mineral composition typical of wild forms (Zhetysu × *T. militinae*; Zhetysu × *T. kiharae*; Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*) have been identified. All genotypes have been differentiated into 3 clusters. The first consists predominantly of introgressive forms, *Ae. triaristata* and the Komsomolskaya 1 variety, which has wild forms in its origin. The second cluster includes mainly varieties (parental forms), *T. timopheevii* and the introgressive form (Steklovidnaya 24 × *T. militinae*). The third cluster consists largely of *T. militinae*, *T. kiharae*, *Ae. cylindrica* species and introgressive forms originated from them: Zhetysu × *T. militinae* and Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*. Such division allows us to classify genotypes according to the level of metabolism: wild relatives (3rd cluster), varieties (2nd cluster) and an intermediate group – introgressive forms (1st cluster). In general, inclusion of cultural forms (backcrossing with varieties) to crosses with introgressive forms is usually accompanied by a decrease in the total metabolic level, but it varies in cultivars and wild species characterized by polymorphism. Sources of high content of elements have been revealed: wild relatives and introgressive forms, some of which are donors. According to the results of topcross breeding with testers – commercial common wheat varieties Steklovidnaya 24, Almali, Zhetysu – inheritance of this trait by progenies in F_2–F_3 generations has been revealed in two constant lines: (Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae* and Zhetysu × *T. kiharae*.

Key words: grain; macro and microelements; wheat; wild relatives; introgressive forms; resources; donors; topcrosses.

В настоящее время, с внедрением новых технологий актуальным становится вопрос целенаправленного поиска и переноса аллелей генов конкретных признаков. Предварительно необходимо выявить источники и доноры, в том числе среди диких сородичей и созданных промежуточных пшенично-чужеродных гибридов (ПЧГ). Эти ценные формы могут использоваться как самостоятельный объект экологически устойчивых агросистем, так и в качестве эффективного селекционного (переходного) мостика для передачи полезных генов в геном пшеницы (Размахнин и др., 2012).

Запас генофонда мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. по лимитирующим признакам довольно ограничен и не всегда позволяет решать многие актуальные задачи современной селекции. Поэтому наряду с классическими методами селекции, отбора и гибридизации, внутривидового скрещивания пшеницы применяют также методы отдаленной гибридизации с использованием представителей близких родов и видов пшеницы: *Aegilops*, *Agropyron*, *Secale*, *T. timopheevii*, *T. dicoccum*, *T. kiharae* и других носителей признаков и свойств. Наиболее оптимальный материал для оценки и последующего переноса уникальных для пшеницы аллелей генов от ее дикорастущих сородичей – это ПЧГ. Поддерживать и сохранять выявленный аллель гена пшенично-чужеродных гибридов намного проще, чем отслеживать его в популяциях диких сородичей. При удачном решении проблем продуктивности и устойчивости к стрессам вопрос качества зерна является решающим в селекции на конечный тип его использования.

В предварительных изучениях дикие и примитивные пшеницы, такие как *T. monococcum*, *T. dicoccum* и *T. dicoccoides*, проявили себя как более перспективные генетические источники содержания микроэлементов в сравнении с современными сортами пшеницы и селекционными линиями (Graham et al., 2001; Welch et al., 2005). Известно, что образцы *T. dicoccoides* характеризуются большей вариабельностью и более высокими концентрациями Zn и Fe в зерне. Этот вид является источником генетического разнообразия для агрономических свойств, аминокислотного состава и содержания протеина (Cakmak et al., 1999, 2004; Nevo, 2006; Gomez-Becerra et al., 2010). Аналогичные исследования развиваются по фосфору (Mousavi, 2011) и азоту, в том числе в сравнительном изучении усвоения питательных элементов (N, P, K) ди-, тетра- и гексаплоидными пшеницами (Huang et al., 2007). Увеличение плоидности пшеницы сопровождается увеличением эффективности использования N на прирост биомассы и урожая зерна. Влияние N и P на биомассу максимально эффективно у *T. boeoticum*, минимально – у *Ae. speltoides*. Влияние N, P и K на урожайность наиболее эффективно у *Ae. speltoides* и наименее – у *T. aestivum*. Эффективность может зависеть от генов генома *D*. Водный стресс повышал эффективность N по данным накопления биомассы, избыточное удобрение – снижало (Huang et al., 2007).

По содержанию минеральных элементов в зерне, в частности Fe и Zn, наиболее изучены образцы *T. dicoccoides*, предшественника *T. durum*, отличающегося повышенным содержанием Fe в зерне. Другие виды пшеницы не характеризовались детально по минеральному составу зерна (Cakmak et al., 2004), как и образцы эгилопсов (Tiwari et al., 2010). Ряд работ посвящен поиску источников не просто высокого содержания микроэлементов, но и их биологической усвояемости (Lopez et al., 2003). Показано, что виды *Aegilops* могут быть использованы в качестве важного источника Zn, в частности *Ae. speltoides* var. *ligustica* (*CC*) и *Ae. triuncialis* (*UUCC*).

При идентификации локусов (QTL), определяющих содержание цинка и фосфора в зерне пшеницы, установлено, что количество Zn и P контролируется полигенами; определено до семи QTL для содержания Zn в зерне и до шести QTL – для P. Два QTL, влияющих на содержание Zn, локализованы на хромосомах 4A и 4D и колокализованы с таковыми по содержанию P. Четыре QTL, определяющих количество Zn, локализованы на хромосомах 2D, 3A и 4A и совпадают с расположением QTL для P (Rajani et al., 2011).

В наших исследованиях использован материал, созданный на протяжении многих лет путем успешной гибридизации пшеницы *T. aestivum* и видов *T. timopheevii*, *T. militinae*, *T. kiharae*, *T. dicoccoides*, *Ae. cylindrica*, *Ae. triaristata* и получением переходных гибридных форм и продвинутых константных гибридов (Ержебаева, Нурпеисов, 2009; Савин и др., 2009). Ранее нами был изучен минеральный состав зерна видов пшениц (*T. timopheevii*, *T. dicoccoides*, *T. kiharae*, *T. militinae*, *Ae. cylindrica*, *Ae. triaristata*) в зависимости от условий выращивания и показано, что дикорастущие виды могут быть донорами таких полезных признаков, как высокое содержание Fe и Zn и низкое – Cd (Abugalieva et al., 2013).

Большое значение для селекции пшеницы имеет расширение генетических ресурсов за счет интрогрессивных форм, с характеристикой уровня их метаболизма в конкретных регионах по минеральному составу зерна. Целью настоящей работы было изучение особенностей минерального состава зерна интрогрессивных форм в сравнении с дикими сородичами и сортами и выделение источников и доноров высокого содержания макро- и микроэлементов.

Материал и методы исследований

В работе использовались различные виды пшениц и эгилопсов (табл. 1), а именно: диплоидные виды (*T. monococcum*), тетраплоидные (*T. turgidum*, *T. dicoccum*, *T. polonicum*, *T. persicum*, *T. militinae*, *T. timopheevii*, *T. dicoccoides*, *T. aephiopicum*), гексаплоидные (*T. petropavlovskyi*, *T. kiharae*, *T. compactum*, *Ae. triuncialis*, *Ae. triaristata*, *Ae. ovata*); константные переходные формы из межродовых и межвидовых скрещиваний F_6–F_8 (Савин и др., 2009); образцы топкроссных скрещиваний между переходными формами и зарегистрированными сортами (Ержебаева, Нурпеисов, 2009). Общая схема получения интрогрессивных форм приведена на рис. 1.

Материал выращен в 2006–2009 и 2014–2016 гг. в условиях стационара зернофуражных культур КазНИИ земледелия и растениеводства, 42° с. ш., 77° в. д., 740 м над ур. моря. Образцы посеяны на делянках площадью 5 м^2 в двух полевых повторениях в соответствии с принятой агротехникой.

Содержание макро- и микроэлементов в зерне определяли методом индуктивно-плазменно-атомной эмиссион-

Table 1. Research material

Triticum	*Aegilops*	Standard *T. aestivum*	Introgression lines
T. monococcum	*Ae. triuncialis UUCC*	Bezostaya 1	(Bezostaya 1 × *Ae. triaristata*) × Karlygash
T. turgidum	*Ae. triaristata* C^uC^uMM	Almaly	Erythrospermum 350 × *T. militinae*
T. dicoccum	*Ae. cylindrica CCDD*	Steklovidnaya 24	Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*
T. polonicum	*Ae. ovata*	Erythrospermum 350	(Bezostaya 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-6
T. persicum	*Ae. squarrosa DD*	Zhetysu	(Bezostaya 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-9
T. militinae		Komsomolskaya 1	(Bezostaya 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-4
T. aephiopicum		Karahan	Steklovidnaya 24 × *T. timopheevii*
T. timopheevii			Zhetysu × *T. timopheevii*
T. dicoccoides			Steklovidnaya 24 × *Ae. cylindrica*
T. spelta			Erythrospermum 350 × *T. kiharae*
T. petropavlovskyi			Zhetysu × *T. kiharae*
T. kiharae			Zhetysu × *T. militinae*

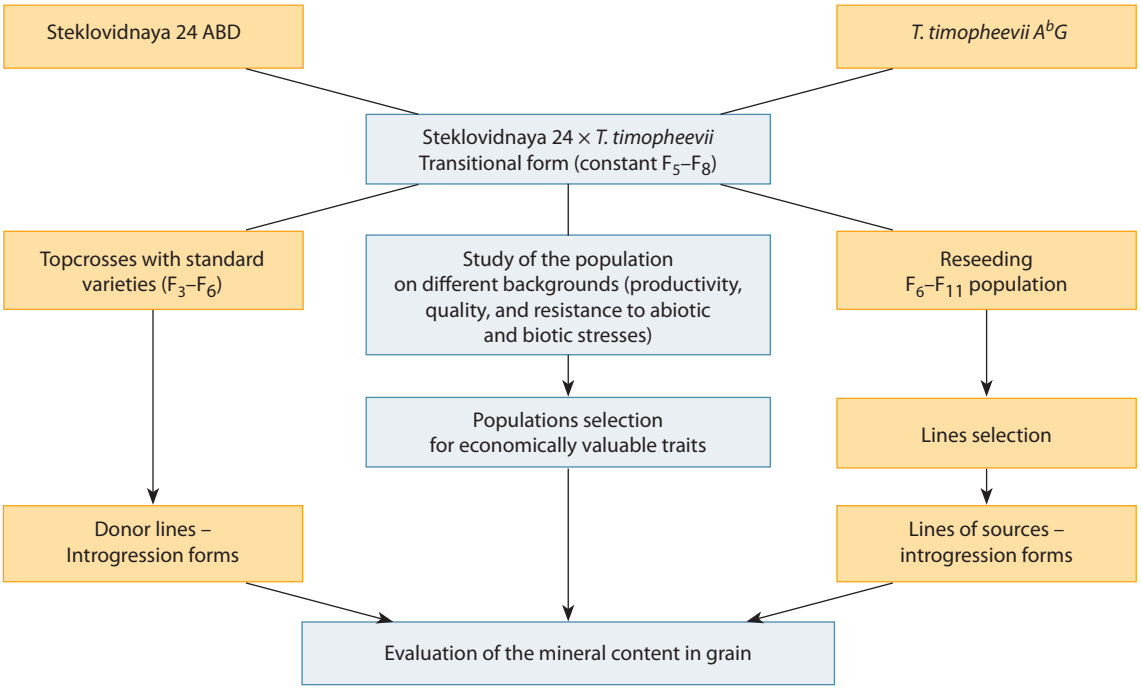


Fig. 1. Schematic presentation of the raise and study of transitional (introgression) forms.

ной спектрометрии (ICP-AES) (Cakmak et al., 2004). Содержание N определено методом Кьельдаля, с использованием $k = 5.7$ для пшеницы при расчете протеина. Кластерный анализ проведен по алгоритму С.П. Мартынова с использованием минимума произведения $D\,(1–R)^2$ между евклидовыми расстояниями (D) и коэффициентом корреляции (R), описанному ранее (Савин и др., 1998).

Результаты

Характеристика константных (переходных) пшенично-эгилопсных (ПЭГ) и пшенично-межвидовых гибридов по потенциалу метаболизма (содержание макро- и микроэлементов) осуществлена в двух репродукциях. Переходные формы озимой пшеницы проанализированы по содержанию макро- и микроэлементов в зерне, и прежде всего по содержанию азота (табл. 2). Максимальное содержание протеина отмечено для форм с участием *T. kiharae*, *T. militinae* и *T. timopheevii* при общем повышенном фоне для интрогрессивных форм относительно современных коммерческих сортов (13.4–16.6 %). Как в засушливый (2015), так и в увлажненный (2016) год стабильным содержанием протеина характеризовались генотипы Эритроспермум 350 × *T. kiharae* и Жетысу × *T. militinae*.

Таким образом, для переходных интрогрессивных форм пшеницы характерно промежуточное содержание азота между дикими и культурными формами, которое сохраняется стабильно по нескольким репродукциям, в том числе на высоком уровне урожайности (более 80 ц/га).

Table 2. Year-to year variation in protein percentages in winter wheat introgression forms

Transitional forms	Min	Max	Seven-year mean (2006–2009, 2014–2016)	2014	2015	2016
(Bezostaya 1 × *Ae. triaristata*) × Karlygash	13.2	18.4	15.9 ± 0.2	14.5	18.5	15.6
Erythrospermum 350 × *T. militinae*	14.1	19.4	16.7 ± 0.3	14.7	18.5	15.7
(Bezostaya 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-6	12.5	18.6	15.8 ± 0.2	14.2	17.3	15.3
(Bezostaya 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-9	14.0	19.2	16.7 ± 0.3	16.3	18.2	15.9
(Bezostaya 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-4	13.3	18.8	15.7 ± 0.2	15.4	17.0	16.3
Zhetysu × *T. militinae*	15.0	17.8	16.8 ± 0.3	18.2	–	16.7
(Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae*	13.7	20.2	18.2 ± 0.3	21.3	No sample	
Zhetysu × *T. kiharae*	17.0	18.2	17.7 ± 0.3	19.2	16.6	–
Erythrospermum 350 × *T. kiharae*	15.1	18.1	16.9 ± 0.2	18.4	16.4	16.3
Steklovidnaya 24 × *T. timopheevii*	15.3	17.2	16.5 ± 0.1	16.3	17.3	15.4
Zhetysu × *T. timopheevii*	14.0	18.0	16.2 ± 0.1	17.6	18.7	15.8
Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*	14.3	18.6	16.5 ± 0.2	17.6	16.5	15.9
Steklovidnaya 24 × *Ae. cylindrica*	14.3	18.4	16.6 ± 0.2	17.4	–	15.7
Variety Karahan	14.9	14.9	14.9 ± 0.1	17.1	–	–
Variety Almaly	12.3	15.0	13.7 ± 0.2	13.7	–	16.3
T. timopheevii	15.5	17.3	16.4 ± 0.3	16.0	17.8	20.9
T. militinae	21.8	22.2	22.0 ± 0.3	23.6	22.6	23.4
T. kiharae	21.3	23.3	22.3 ± 0.1	21.9	21.5	22.6
Ae. triaristata	21.5	22.1	21.8 ± 0.2	27.1	24.2	22.8
Ae. cylindrica	21.9	23.8	22.9 ± 0.3	23.9	21.0	21.6

Содержание азота в зерне диких сородичей (родительских форм) варьировало от 16.0 % у *T. timopheevii* до 23.9 % у *Ae. cylindrica*.

По содержанию калия стабильно максимальным средним значением выделяются образцы Жетысу × *T. kiharae*, Жетысу × *T. timopheevii*, Безостая 1 × *Ae. cylindrica*, (Безостая 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-9 (5089, 5162, 5025 и 4355 мг/кг соответственно). При этом современные сорта характеризовались максимальным значением 4308 мг/кг для сорта Комсомольская 1 и 4192 мг/кг для сорта Алмалы. Интрогрессивные формы по содержанию K в зерне превышали родительские как современных сортов, так и диких сородичей (3512–4515 мг/кг), за исключением *Ae. cylindrica* (5014–5274 мг/кг) и *Ae. triaristata* (4282–5237 мг/кг).

Содержание фосфора в зерне интрогрессивных форм меняется в пределах содержаний для культурных и диких форм (максимальное значение 4789 мг/кг для ПЭГ Безостая 1 × *Ae. cylindrica*), не достигая уровня диких сородичей – 5640 мг/кг (*Ae. ovata*) и 5411 мг/кг (*Ae. cylindrica*). В переходных формах этот показатель варьировал от 2929 мг/кг для (Безостая 1 × *Ae. triaristata*) × Карлыгаш до 5236 мг/кг в зависимости от репродукции. В целом выделились по максимальному содержанию фосфора и во второй репродукции генотипы Жетысу × *T. militinae*, (Безостая 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-9 и Стекловидная 24 × *Ae. cylindrica*. Уровень фосфора в зерне для диких форм, особенно эгилопсов, был выше в 1.5–1.7 раза по многолетним данным и в двух последних репродукциях.

По содержанию Mg в зерне интрогрессивные формы также занимают промежуточное положение между эгилопсами и *T. aestivum*, с максимумом для генотипа Жетысу × *T. militinae* (1689 мг/кг). Выделяются те же интрогрессивные формы, что и по содержанию калия: Жетысу × *T. militinae*, Жетысу × *T. kiharae* и (Безостая 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-9.

Максимальной степенью выраженности по комплексу элементов отличаются образцы Жетысу × *T. kiharae* (K, P, Ca, Fe, Mn, Zn) и (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae* (N, S, Fe).

Содержание Fe в зерне переходных форм варьировало от 39 до 66 мг/кг (Жетысу × *T. militinae*) в современных репродукциях, содержание Zn находилось на уровне 48–52 мг/кг. Максимальные значения содержания Fe в зерне, сохранившиеся в обеих репродукциях, отмечены для генотипов с участием *T. kiharae*: (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae*, Жетысу × *T. kiharae*, Эритроспермум 350 × *T. kiharae*. В сравнении с культурными формами-сортами превышение составляет порядка 25–35 % для интрогрессивных форм при большей приближенности к диким сородичам пшеницы – *T. kiharae*. Эгилопсы, как и в случае макроэлементов, отличаются значительным преобладанием уровня железа в зерне.

Известно, что питательный режим пшеницы серой (S) оказывает большое влияние на хлебопекарные свойства муки (Randall, Wrigley, 1986), что выражается через существенную роль дисульфидных связей в обеспечении функциональности клейковины. Значение S–S связей со-

Table 3. Sulfur contents, ppm, in transitional introgression forms of winter wheat

Winter wheat introgressive forms	F_5	F_6	F_7	F_8	Percentage of genotypes, %		
					S > 2000	N:S > 17:1	N:S > 19:1
(Bezostaya 1 × *Ae. triaristata*) × Karlygash	1674	1590	1840	1857	–	–	–
Erythrospermum 350 × *T. militinae*	1889	1652	1696	1920	–	25	–
(Bezostaya 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-6	1798	1628	1630	1865	–	25	–
(Bezostaya 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-9	1738	1647	1712	1888	–	25	50
(Bezostaya 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-4	1769	1608	1604	1769	–	50	–
Steklovidnaya 24 × *T. militinae*	1730	1737	1606	1706	–	75	–
Zhetysu × *T. militinae*	2285	2017	1773	1899	50	50	–
(Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae*	1992	1999	1757	1768	–	50	–
Zhetysu × *T. kiharae*	1795	1838	1830	1786	–	50	–
Erythrospermum 350 × *T. kiharae*	1825	1646	1623	1820	–	50	–
Steklovidnaya 24 × *T. timopheevii*	1760	1761	1605	1749	–	33	–
Zhetysu × *T. timopheevii*	1694	1615	1801	1925	–	–	–
Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*	1942	1643	1820	1863	–	–	–
Steklovidnaya 24 × *Ae. cylindrica*	1866	1607	1500	1602	–	33	–
Bezostaya 1	1693	1836	1836	1693	–	25	–
Karlygash	1507	1610	1610	1597	–	25	–
Steklovidnaya 24	1452	1527	1527	1494	–	–	–
Zhetysu	1570	1477	1477	1501	–	–	–
Almaly	1590	1503	1503	1598	–	–	–
Sapaly	1500	1607	1607	1590	–	–	–
Erythrospermum 350	1820	1725	1725	1745	–	–	–
T. kiharae	2204	2142	2142	2190	100	100	–
T. militinae	2194	2330	2330	2275	100	75	–
T. timopheevii	1901	1849	1849	1841	–	–	–
Ae. triaristata	2596	2431	2596	2565	100	50	–
Ae. squarossa	2272	2404	2404	1548	75	–	–
Ae. cylindrica	2170	2099	2102	2164	100	–	–

пряжено со свойствами упругости/эластичности и соотношением формирования S-бедных белков (ω-глиадины, ВМС-глютенины) и S-богатых (α, γ-глиадины и НМС-глютенины).

В зерне переходных форм пшеницы содержание серы в основном не превышает уровня для сортов (табл. 3), характеризуясь максимальным значением, как и по содержанию Ca, Fe, Zn и Mn, для интрогрессивной формы Жетысу × *T. militinae*, что гораздо ниже, чем для *T. militinae* (2330 мг/кг), но выше, чем в сорте Жетысу (1477–1570 мг/кг). Для остальных интрогрессивных форм содержание S в зерне находится на уровне современных сортов.

Потребность пшеницы в сере не так велика: ~20 кг/га для среднего урожая 8 т/га (Zhao et al., 1999). В ряде работ показана роль S (содержание S и соотношение N:S) как важного фактора, влияющего на хлебопекарные качества муки. Некоторые исследователи (Wooding et al., 2000) считают, что для хлебопекарных свойств соотношение N:S = 12.5:1 является оптимумом, а при соотношении более 13:1 требуются дополнительные затраты на перемешивание теста. Структурно одна часть S требует 15 частей N. Если S в дефиците вследствие применения азотных удобрений, то аккумуляция непротеиновых компонентов, таких как амиды, приводит к превышению соотношения 15:1. Сравнение суммарного N и S позволяет получить полезную информацию о питательном балансе между N и S в растениях и использовать в диагностике статуса S. Отмечена тенденция уменьшения со временем содержания S (1981–1982 гг. – 1.72 мг/г, 1992–1993 – 1.35 мг/г) и возрастания отношения N:S с 12:1 до 16:1. Содержание S в дефиците на втором месте после N (например, на севере Германии). Критически дефицитным считается содержание серы 1.2 мг/г и соотношение N:S, равное 17:1. Дефицит серы, в том числе по соотношению N:S, подтверждается в ранние репродукции почти для всех интрогрессивных форм, постепенно снижаясь в поколениях до 14.8–16.2, за исключением генотипов Эритроспермум 350 × *T. militinae* и Жетысу × *T. militinae* (см. табл. 3).

Классификация диких, культурных и интрогрессивных форм озимой пшеницы по содержанию макро- и микроэлементов проведена методом многомерного кластерного анализа (рис. 2). Все генотипы дифференцированы на три кластера. Первый состоит преимущественно из синтетических форм, *Ae. triaristata* и сорта Комсомольская 1, имеющего в родословной дикие формы. Второй кластер включает в основном сорта (родительские формы), *T. timopheevii* и интрогрессивную форму Стекловидная 24 × *T. militinae*. В третий кластер входят виды *T. militinae*, *T. kiharae*, *Ae. cylindrica* и формы с их участием: Жетысу × *T. militinae* и Безостая 1 × *Ae. cylindrica*. Такое деление позволяет классифицировать генотипы по уровню метаболизма: дикие сородичи (третий кластер), сорта (второй кластер) и промежуточный – интрогрессивные формы (первый кластер).

По содержанию макро- и микроэлементов интрогрессивные формы пшеницы занимали промежуточное положение между дикими сородичами и современными сортами (рис. 3). Выявлены переходные формы с минеральным составом, характерным для диких форм (Жетысу × *T. militinae*; Жетысу × *T. kiharae*; Безостая 1 × *Ae. cylindrica*).

Таким образом, выделены источники по отдельным элементам (макро- и микро-) и их комплексу, что позволяет говорить о генотипах с повышенным уровнем минерального состава среди интрогрессивных форм, наиболее приближенных к диким сородичам пшеницы. Среди выделенных форм генотипы с участием *T. kiharae* и *T. militinae*, которые характеризовались как источники максимального содержания N, Mg, Mn, Fe, Zn и N, P, S соответственно. Насколько эти источники эффективны и перспективны как доноры, можно выяснить по степени передачи признака потомству в специальных (топкроссных) скрещиваниях.

Наследование высокого содержания макро- и микроэлементов в зерне изучено по результатам топкроссных скрещиваний (см. рис. 1), проведенных в (Ержебаева, Нурпеисов, 2009). Выявлен ряд константных интрогрессивных линий с селективно значимым содержанием Fe в зерне: (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × Эритроспермум 350 – до 43–56 мг/кг; ПЭГ 304 × *T. timopheevii* – до 50–52 мг/кг; (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae* – до 50–59 мг/кг; Эритроспермум 350 × *T. kiharae* – до 47–53 мг/кг; Жетысу × *T. militinae* – до 51–66 мг/кг; Жетысу × *T. kiharae* – до 51–55 мг/кг, которые могут служить источниками зерна с высоким содержанием Fe. По результатам топкроссных скрещиваний (Ержебаева, Нурпеисов, 2009) с тестерами – коммерческими и наиболее распространенными сортами Стекловидная 24, Алмалы, Жетысу – выявлена передача данного признака потомству в F_2–F_3 поколениях для двух константных линий (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae* и Жетысу × *T. kiharae*.

По комплексу элементов с максимальной степенью выраженности выделены формы: 64 % по всем элементам – генотип Жетысу × *T. kiharae*; 59 % – Жетысу × *T. militinae*; 41 % – генотип (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae*, 23 % – генотип Эритроспермум 350 × *T. kiharae*. Однако в системе топкроссных скрещиваний установлено, что не все формы передают потомству повышенный уровень метаболизма (содержания макро- и микроэлементов). Так, генотип Жетысу × *T. militinae* ни по одному элементу не

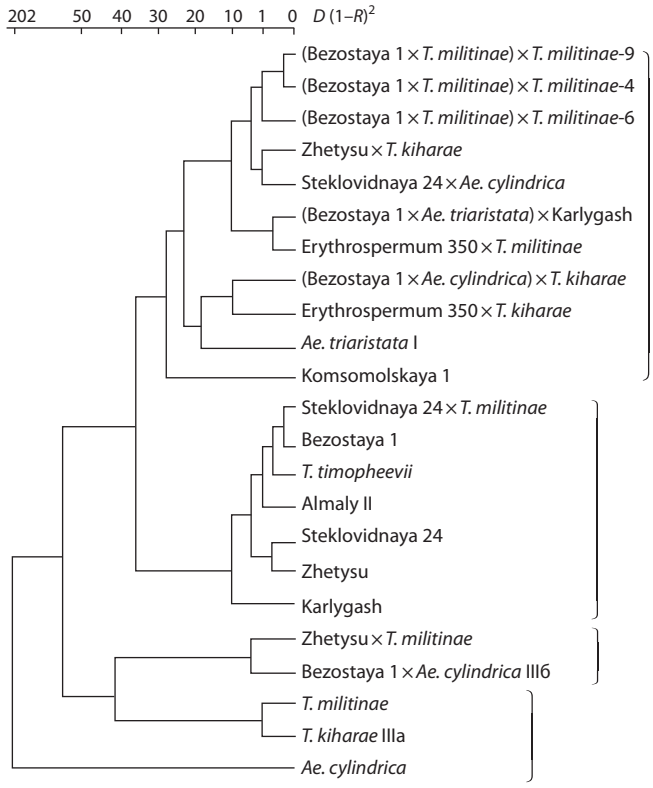


Fig. 2. Clustering of wild, cultrivated, and synthetic winter wheat forms with regard to grain mineral composition for ten elements: N, P, K, Mg, Ca, S, Mn, Fe, Zn и Cd.

D, Euclidean distance, *R*, correlation coefficient; *D* (1–R^2).

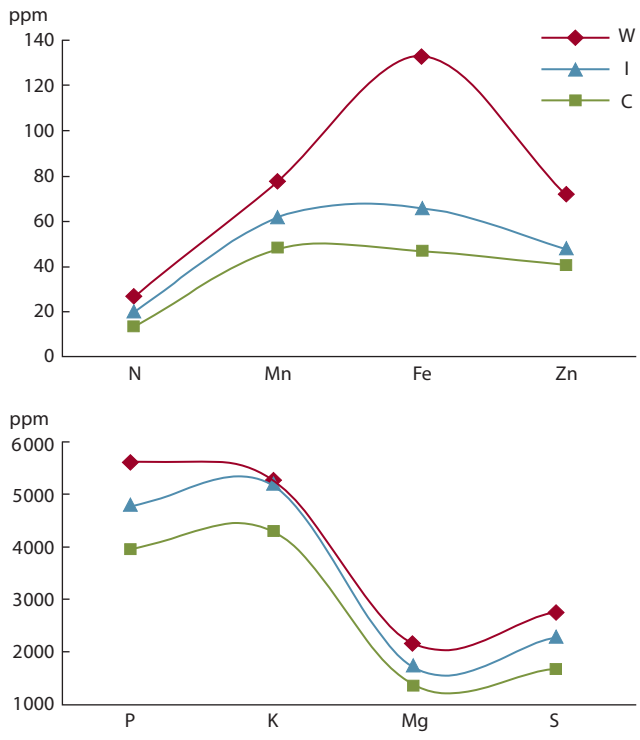


Fig. 3. Variability ranges of the contents of macro- and microelements (ppm) in (W) wild relatives, (C) modern varieties, and (I) synthetic forms.

Table 4. Contents of macro- and microelements (ppm) in topcrosses (F_3)

Topcrosses	K	P	Mg	S	Ca	Fe	Mn	Zn
Zhetysu × *T. kiharae*	4584	3894	1322	1838	550	55	61	44
(Zhetysu × *T. kiharae*) × Steklovidnaya 24	3961	4133	1430	1788	504	49	62	41
(Zhetysu × *T. kiharae*) × Almaly	3836	3727	1249	1706	516	42	56	37
Zhetysu × *T. militinae*	4858	3860	1351	2017	665	51	59	38
(Zhetysu × *T. militinae*) × Almaly	3753	3014	1104	1587	508	37	45	32
(Zhetysu × *T. militinae*) × Zhetysu	3594	3013	1094	1606	527	39	46	36
(Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae*	3918	3755	1323	1999	473	59	63	48
((Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae*) × Steklovidnaya 24	3896	4869	1654	2341	433	78	79	76
((Bezostaya 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae*) × Almaly	3632	4255	1481	2052	637	69	70	53

передавал потомству повышенного фона его содержания в синтетической форме. Генотип (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae* характеризуется донорными свойствами по всем элементам, кроме калия, а генотип Жетысу × *T. kiharae* проявлял донорные свойства только по содержанию фосфора, магния и марганца (табл. 4).

В целом включение культурных форм (беккроссирование с сортами) в скрещивания с интрогрессивными, как правило, сопровождается снижением общего метаболического уровня, но специфично относительно сортов и видов, характеризующихся полиморфизмом (см. табл. 4).

Выявлены источники высокого содержания элементов – дикие сородичи и интрогрессивные формы, часть из которых можно привлекать в качестве доноров при селекции на высокое содержание микро- и макроэлементов.

Обсуждение

Классификация диких видов пшеницы по содержанию макро- и микроэлементов (N, P, K, S, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn, Al, Cd, Cu) позволила определить диапазон изменчивости и выделить виды с максимальным значением. Все эгилопсы, изученные ранее (Савин и др., 2009; Abugalieva et al., 2013) и в настоящей работе, характеризуются повышенным содержанием железа и цинка, за исключением *Ae. triaristata*. Высокому уровню железа и цинка в зерне эгилопсов соответствовало и максимальное содержание других элементов (мг/кг): калия – до 5484, фосфора – до 5749, магния – до 2102, серы – до 2775, кальция – до 1009, марганца – до 78. Содержание кадмия в зерне разных видов пшениц и диких сородичей выявлено: от <20 до 21 мг/кг для зерна *T. persicum*; до 22 мг/кг для *T. petropavlovskyi*; 23 мг/кг – *T. polonicum*; 24 мг/кг – *T. spelta*; 25 мг/кг – *T. kiharae*; 26 мг/кг – *T. militinae*; 35 мг/кг – *T. dicoccum*; а для *Ae. cylindrica* и *Ae. squarrosa* – 30 и 54 мг/кг соответственно.

Сравнение различных видов пшеницы, выполненное ранее по результатам кластерного анализа по содержанию макро- и микроэлементов (Abugalieva et al., 2013), показывает, что эгилопсы (*Ae. ovata* и *Ae. triuncialis*) по минеральному составу группируются в отдельные кластеры. Тетраплоидные виды пшениц с геномом BA^u объединились в основном в один кластер. Виды пшениц с геномом GA^u (*T. timopheevii* и *T. militinae)* близки по минеральному составу к гексаплоидам. В целом подтверждается высокий потенциал диких сородичей не только по микро-, но и по макроэлементам.

В питательном аспекте важно не просто содержание макро- и микроэлементов, но и их баланс, например Ca:P, Ca:Mg, N:S. Оптимальное соотношение кальция и фосфора в пище взрослого человека составляет 1:(1.5–2.0) при суточной потребности в кальции 800 мг и фосфоре 1200–1600 мг. Согласно некоторым сообщениям, при избыточном поступлении фосфора в организм может развиваться остеопороз и кальциноз отдельных тканей, особенно аорты у людей с пониженным содержанием кобальта. В изученных пшеницах Казахстана соотношение Ca:P меняется от 1:6.89 до 1:6.97, т. е. ниже показателей 1:8.1 и 1:7.5, представленных в работе (Дарканбаев, Жарков, 1976).

В наших исследованиях показано, что наиболее благоприятное соотношение кальция к фосфору характерно для видов *Ae. triuncialis* (1:5.7), *Ae. cylindrica* (1:6.0), *T. turgidum* (1:6.0), *T. persicum* (1:5.7), при максимуме 1:19 (*T. compactum*) и 1:16 (*T. spelta*). По соотношению кальция к магнию наиболее сбалансированы эгилопсы: *Ae. squarrosa* (1:0.8), *Ae. triuncialis* и *Ae. cylindryca* (1:2.1), среди тетраплоидов – *T. turgidum* и *T. persicum* (1:2.1), среди гексаплоидов – *T. petropavlovskyi* (1:2.7) и *T. sphaerococcum* (1:2.8).

Изучение минерального состава зерна пшеницы и ее диких сородичей выявило более высокий уровень содержания всех элементов для *Ae. ovata* и *Ae. triuncialis*. Отмечен высокий относительно сортов-стандартов (*T. aestivum*) уровень минерального состава зерна и у других видов пшеницы (рис. 4).

Таким образом, источниками высокого содержания исследованных элементов являются эгилопсы в следующем порядке: *Ae. triuncialis* > *Ae. ovata* (K, P, Mg, Fe, Zn) > *Ae. cylindrica* (Fe, Mn) > *Ae. triaristata* (S) > *Ae. squarrosa* (Ca).

В качестве источников высокого содержания N, Mg, Mn и Fe, Zn может быть рассмотрена *T. kiharae*; N, P, S – *T. militinae*; Mn, Fe, Zn – *T. petropavloskyi*; как источник K и Zn перспективна *T. compactum* (см. рис. 2).

Содержание Cd в зерне в первой репродукции для диких сородичей (16 видов *Triticum*) и пяти эгилопсов варьировало от <20 до 25 мг/кг (*T. persicum* и *T. kiharae*),

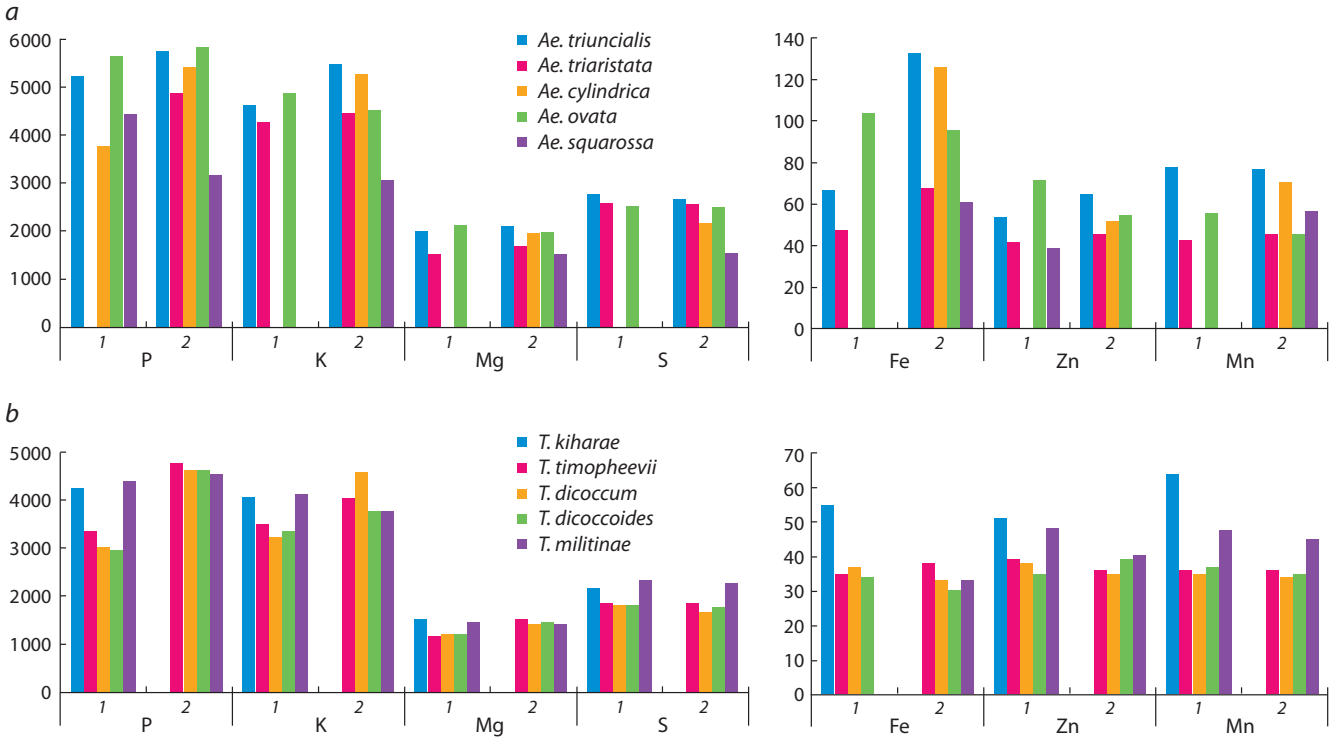


Fig. 4. Macro- and microelements content in the grain: (*a*) Aegilops and (*b*) wheat species, depending on reproduction (Abugalieva et al., 2013).

во второй репродукции – от <20 до 24–26 мг/кг (*T. spelta*, *T. polonicum*, *T. militinae*), с максимальным значением среди *Triticum* (до 35 мг/кг) для *T. dicoccum*. Среди пяти образцов рода *Aegilops* высокими значениями этого показателя отличались только *Ae. cylindrica* и *Ae. squarrosa*. Требования по ограничению содержания Cd в зерне (не более 20 мг/кг) обусловлены высокой токсичностью этого элемента. Поэтому необходимо обратить внимание на наследование этого признака в гибридах с участием видов, в зерне которых обнаружено высокое содержание Cd.

Содержание азота (N × 5.7) в зерне диких сородичей пшеницы варьировало от 13.9 % (*T. spelta*) до 27.2 % (*Ae. trinncialis* и *Ae. triaristata*). Эгилопсы в целом отличались повышенным уровнем азота в зерне – 25.9–27.2 %. Наиболее высокое содержание азота для изученных представителей рода *Triticum* отмечено у *T. militinae* (23.6 %), *T. kiharae* (21.9 %) и *T. persicum* (20.0 %). Стабильными источниками высокого содержания азота являются *T. militinae* (21.8–23.6 %), *Ae. cylindrica* (21.9–23.9 %) и *T. kiharae* (21.9–22.0 %). Относительно низкое стабильное содержание (в сравнении с другими видами пшеницы) характерно для *T. timopheevii* – 15.5–17.3 %.

Изучение минерального состава зерна пшеницы и ее диких сородичей выявило более высокий уровень содержания всех элементов для *Ae. ovata* и *Ae. triuncialis* и общий повышенный фон для сородичей относительно современных сортов *T. aestivum* (стандарты). По содержанию макро- и микроэлементов интрогрессивные формы пшеницы занимают промежуточное положение между дикими сородичами и современными сортами.

Выделение источников высокого содержания отдельных элементов, как и само их значение, зависит от условий выращивания. Практически все озимые переходные формы пшеницы характеризовались высоким содержанием азота (см. табл. 1). Выявлены образцы с минимальными значениями азота: (Безостая 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-6 и (Безостая 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-9.

По содержанию фосфора стабильно максимальным значением отличается генотип Жетысу × *T. militinae* (в шести из восьми репродукций), так же как и по содержанию калия. Среди генотипов со стабильно высоким NPK также формы Жетысу × *T. kiharae* и (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae*.

Генотипы Жетысу × *T. militinae*, (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae* и Жетысу × *T. timopheevii* отличались максимальным накоплением содержания Ca. По содержанию Fe максимальные значения характерны для генотипов Жетысу × *T. militinae*, Безостая 1 × *Ae. cylindrica* (49–66 мг/кг) в трех из шести репродукций и Жетысу × *T. kiharae* (56–66 мг/кг). Аналогичная картина по содержанию марганца: максимум 45–63 мг/кг стабильно наблюдается у генотипов Жетысу × *T. militinae* и Жетысу × *T. kiharae* в половине репродукций. По содержанию Mg выделяется генотип Жетысу × *T. militinae* в пяти из семи репродукций и Жетысу × *T. kiharae*. Особый интерес представляют формы, перспективные по технологическим соотношениям, например N : S, и по питательным (медицинским) соотношениям, например Ca : P.

Таким образом, выявлены источники высокого содержания элементов – дикие сородичи и синтетические формы. Для N, Mg, Mn это *T.kiharae* → Жетысу × *T. kiharae*; для Fe, Zn – *T. kiharae* → Жетысу × *T. kiharae*, (Безостая 1 × *Ae. cylindrica*) × *T. kiharae*; для P – *T. militinae* → Жетысу × *T. militinae*, (Безостая 1 × *T. militinae*) × *T. militinae*-9;

для N и S – *T. militinae* → Жетысу × *T. militinae*, Эритроспермум 350 × *T. militinae*; для Mg – *T. timopheevii* → Стекловидная 24 × *T. timopheevii*.

Полученные результаты указывают на то, что в селекции на высокий уровень метаболизма перспективно использование переходных пшенично-чужеродных форм.

Acknowledgments

This study was supported in part by the Russian Federation Ministry of Education and Science, project GF4/2766 «Synthetic forms as a base for the conservation and use of the gene pool of wild wheat relatives with regard to grain nutritive and technological quality».

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Abugalieva A.I., Savin T.V., Kozhahmetov K.K., Cakmak I. Variation in iron concentrations among wild wheat relatives and their hybrids with commercial winter varieties. XVII Int. Plant Nutrition Colloquium & Boron Satellite Meeting. Turkey, 2013;1028-1029.

Cakmak I., Tolay I., Ozdemir A., Ozkan H., Kling C.I. Differences in zinc efficiency among and within diploid, tetraploid and hexaploid wheats. Ann. Bot. 1999;84:163-171.

Cakmak I., Torun A., Millet E., Feldman M., Fahima T., Korol A., Nevo E., Braun H.J., Özkan H. *Triticum dicoccoides*: An important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. Soil. Sci. Plant Nutr. 2004;50(7):1047-1054.

Darkanbaev T.B., Zharkov V.P. Mineral'nyy sostav pshenits Kazakhstana [Mineral composition of Kazakhstan wheats]. Alma-Ata, 1976;244. (in Russian)

Erzhebaeva R.S. Nurpeisov I.A. Inheritance of characters in P_1 and P_2 hybrids obtained by crossing wheat to remote constant forms. Vestnik Kazakhskogo Natsionalnogo Universiteta im. Al'-Farabi. Seriya biologicheskaya = Herald of Al Farabi Kazakh National University, biol. ser. 2009;41(2):72-75. (in Russian)

Gomez-Becerra H.F., Yazici A., Ozturk L., Budak H., Peleg Z., Morgounov A., Fahima T., Saranga Y., Cakmak I. Genetic variation and environmental stability of grain mineral nutrient concentrations in *Triticum dicoccoides* under five environments. Euphytica. 2010; 171(1):39-52. DOI 10.1007/s10681-009-9987-3.

Graham R.D., Welch R.M., Bouis H.E. Addressing micronutrient malnutrition through enhancing the nutritional quality of staple foods: principles, perspectives and knowledge gaps. Adv. Agron. 2001;70: 77-142.

Huang M.L., Deng X.P., Zhou S.L., Zhao Y.Z., Shinobu I. Nutrient uptake and use efficiency of diploid, teraploid, and hexaploid wheats under different water and nutrition conditions. Acta Agron. Sin. 2007;33(5):708-716.

Lopez H.W., Krespine V., Lemaire A., Coundray C., Feillet-Coudray C., Messager A., Demigné C., Rémésy C. Wheat variety has a major influence on mineral bioavalability; Studies in rats. J. Cereal Sci. 2003;37:257-266.

Mousavi S.R. Zinc in crop production and interaction with phosphorus. Aust. J. Basic Appl. Sci. 2011;5(9):1503-1509.

Nevo E. Genome evolution of wild cereal diversity and prospects for crop improvement. Plant Genet. Resour. 2006;4(1):36-46.

Rajani S., Kumari N., Nidhi R., Vijay T.V., Singh H.D., Partha R. Bioavailability of iron from wheat *Aegilops* derivatives selected for high grain iron and protein contents. J. Agric. Food Chem. 2011;59(13): 7465-7473.

Randall P.J., Wrigley C.W. Effects of sulfur supply on the yield, composition, and quality of grain from cereals, oilseeds, and legumes. In: Pomeranz Y. (Ed.). Advances in Cereal Science and Technology. St. Paul, Min.: Am. Assoc. of Cereal Chemists, 1986;8:171-206.

Razmakhnin E.P., Razmakhnina T.M., Kozlov V.E., Goncharov N.P., Veprev S.G. Methods of application of biotechnology and remote hybridization for improving wheat. Doklady i soobshcheniya XI Mezhdunarodnoy genetiko-selektsionnoy shkoly-seminara "Sovremennoe sostoyanie i prioritetnye napravleniya razvitiya genetiki, epigenetiki, selektsii i semenovodstva sel'skokhozyaystvennykh kul'tur" [Proceedings of the 11th International Workshop "Current state and topical development trends in genetics, epigenetics, breeding, and seed farming of agricultural crops"]. Novosibirsk, 2012;213-220. (in Russian)

Savin V.N., Abugaliev I.A., Abugalieva A.I. Analytical research in plant farming. Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 1998;2:13-15. (in Russian)

Savin V.N., Abugalieva A.I., Kozhakhmetov K.K. Study of the contents of Fe and Zn in wild wheat relatives in comparison to cultivated forms and their hybrids. Materialy Mezhdunarodnoy konferentsii «Rol' Vavilovskoy kollektsii geneticheskikh resursov rasteniy v menyayushchemsya mire» [Proceedings of the International Conference "Role of the Vavilov collection of plant genetic resources in the fast-paced world"]. Sankt-Petersburg: VIR Publ., 2009;220-224.

Tiwari V.K., Rawat N., Neelam K., Kumar S., Randhawa G.S., Dhaliwal H.S. Substitutions of 2S and 7U chromosomes of *Aegilops kotschyi* in wheat enhance grain iron and zinc concentration. Theor. Appl. Genet. 2010;121(2):259-269.

Welch R.M., William A., Ortiz-Monasterio I., Cheng Z. Potential for improving bioavailable zinc in wheat grain (*Triticum* species) through plant breeding. J. Agric. Food Chem. 2005;53:2176-2180.

Wooding A.R., Kavale S., Wilson A.J., Stoddard F.L. Effects of nitrogen and sulfur fertilization on commercial-scale wheat quality and mixing requirements. Cereal Chem. 2000;77(6):791-797.

Zhao F.J., Salmont S.E., Withers P.J.A., Monaghan J.M., Evans E.J., Shewry P.R., McGrath S.P. Variation in the breadmaking quality and rheological properties of wheat in relation to sulphur nutrition under field conditions. J. Cereal Sci. 1999;30:19-31.

Изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops tauschii* по устойчивости к листовой ржавчине

Э.Р. Давоян ✉, Д.С. Миков, Ю.С. Зубанова, Д.М. Болдаков, Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, В.А. Бибишев

Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

Проведена оценка синтетических форм *Triticum miguschovae* (GGAADD), *Triticum palmovae* (A^bA^bDD), *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* (BBAADD) и созданных на их основе интрогрессивных линий мягкой пшеницы на устойчивость к листовой ржавчине. *T. miguschovae* и *T. palmovae* проявили полный иммунитет, симптомы поражения отсутствовали. Синтетическая форма *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* проявляет высокую устойчивость. Отобраны 22 устойчивые к листовой ржавчине линии мягкой пшеницы с генетическим материалом *T. miguschovae*, 10 линий с генетическим материалом *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* и 4 линии, полученные на основе *T. palmovae*. С использованием молекулярных маркеров проведен скрининг на присутствие генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr21*, *Lr26*, *Lr32*, *Lr39*. Синтетические формы *T. miguschovae*, *T. palmovae*, *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* несут маркер *GDM35*, сцепленный с геном *Lr39*. Присутствие маркеров *Lr21F/R* и *BARC135*, сцепленных с генами *Lr21* и *Lr32* соответственно, не было выявлено. Показано, что устойчивость к листовой ржавчине в линиях 729, 1555, 2203, 2289, 2295, 2296, 4155, 4171, полученных на основе *T. miguschovae*, линиях 3261, 3265, полученных на основе *T. palmovae*, и в линии 4141 с генетическим материалом *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* контролируется присутствием гена *Lr39*. Маркер *SCM9*, указывающий на наличие транслокации 1BL.1RS с геном *Lr26*, наследуемой от сорта Кавказ, выявлен в 15 линиях, полученных на основе *T. miguschovae*, в двух линиях с генетическим материалом от *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* и в одной линии, полученной с участием *T. palmovae*. Линии 729, 1555, 2203, 2289, 2295, 2296, 4155, 4171, полученные с участием *T. miguschovae*, и линия 3261 с участием *T. palmovae* несут комбинацию генов (*Lr39*+*Lr26*).

Ключевые слова: *Triticum aestivum*; *Aegilops tauschii*; листовая ржавчина; молекулярные маркеры; *Lr*-гены; синтетические формы; интрогрессивные линии мягкой пшеницы.

Study of introgressive lines of common wheat with *Aegilops tauschii* genetic material for resistance to leaf rust

E.R. Davoyan ✉, D.S. Mikov, Y.S. Zubanova, D.M. Boldakov, R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, V.A. Bibishev

National Center of Grain of P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

The synthetic forms of *Triticum miguschovae* (GGAADD), *Triticum palmovae* (A^bA^bDD), *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* (BBAADD) and the introgressive lines of common wheat created on their basis were evaluated for resistance to leaf rust. All synthetic forms have a high resistance to leaf rust. Twenty-two lines of common wheat resistant to leaf rust with genetic material from *T. miguschovae*, 10 lines with genetic material from *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* and 4 lines obtained on the basis of *T. palmovae* were identified. A screening with the use of molecular markers for the presence of leaf rust resistance genes *Lr21*, *Lr26*, *Lr32*, *Lr39* was done. The *GDM35* marker linked to the *Lr39* gene was identified in the synthetic forms. Molecular markers *Lr21F/R* and *BARC135* linked to the genes *Lr21* and *Lr32*, respectively, were not identified. Resistance to leaf rust in lines 729, 1555, 2203, 2289, 2295, 2296, 4155, 4171, obtained on the basis of *T. miguschovae*, lines 3261, 3265, obtained on the basis of *T. palmovae*, and in line 4141 with the genetic material from *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* is controlled by the presence of the *Lr39* gene. The *SCM9* marker indicating the presence of translocation of 1BL.1RS with the *Lr26* gene was detected in 15 lines obtained on the basis of *T. miguschovae*, in 2 lines with genetic material from *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii*, and in 1 line created on the basis of *T. palmovae*. Lines 729, 1555, 2203, 2289, 2295, 2296, 4155, 4171 obtained with the participation of *T. miguschovae* and line 3261 with the participation of *T. palmovae* carry a combination of genes (*Lr39*+*Lr26*).

Key words: *Triticum aestivum*; *Aegilops tauschii*; leaf rust; molecular markers; *Lr*-genes; synthetic forms; introgressive lines of common wheat.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Давоян Э.Р., Миков Д.С., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М., Давоян Р.О., Бебякина И.В., Бибишев В.А. Изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops tauschii* по устойчивости к листовой ржавчине. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):97-101. DOI 10.18699/VJ18.336

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Davoyan E.R., Mikov D.S., Zubanova Y.S., Boldakov D.M., Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Bibishev V.A. Study of introgressive lines of common wheat with *Aegilops tauschii* genetic material for resistance to leaf rust. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):97-101. DOI 10.18699/VJ18.336 (in Russian)

Received 30.01.2017
Accepted for publication 23.10.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: davayan@rambler.ru

Листовая ржавчина пшеницы (*Puccinia triticinia* Erikss.) относится к числу самых вредоносных болезней мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и наносит огромный ущерб урожайности и качеству зерна. Наиболее эффективный и экологически безопасный способ защиты от нее – создание устойчивых сортов. Эта работа ориентирована на расширение разнообразия эффективных генов, обеспечивающих длительную устойчивость к листовой ржавчине.

Значительный резерв по устойчивости к болезням сосредоточен в генофонде дикорастущих сородичей мягкой пшеницы. В настоящее время выявлено около 80 генов устойчивости к этому патогену, при этом большинство эффективных генов переданы мягкой пшенице от родственных ей видов (McIntosh et al., 2013). Поэтому использование дикорастущих сородичей в качестве источников новых генов устойчивости к болезням мягкой пшеницы – актуальная задача современной селекции.

Одним из ценных источников генов устойчивости к листовой ржавчине является диплоидный вид *Aegilops tauschii* Coss. От этого вида мягкой пшенице переданы гены устойчивости к листовой ржавчине *Lr21*, *Lr22a*, *Lr32*, *Lr39*, *Lr42* (McIntosh et al., 2013). Для передачи устойчивости были использованы геномно-добавленные синтетические формы *Triticum miguschovae*, *T. palmovae* и *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii*, у которых геном D от *Ae. tauschii* был добавлен соответственно к геномам GGAA от *T. militinae*, A^b от *T. boeoticum* и BBAA от твердой пшеницы Mutico italicum (Жиров, Терновская, 1984; Иванов, 1984).

При использовании этих форм были получены интрогрессивные линии озимой мягкой пшеницы, характеризующиеся устойчивостью к болезням, высоким содержанием белка и другими интересными для селекции морфобиологическими признаками (Давоян и др., 2012). Исходя из родословных полученных интрогрессивных линий можно предположить, что они содержат известные гены устойчивости к листовой ржавчине *Lr21*, *Lr22a*, *Lr32*, *Lr39*, *Lr42* от *Ae. tauschii* и *Lr26* от сорта Кавказ.

В настоящей работе приведены результаты оценки синтетических форм *T. miguschovae*, *T. palmovae*, *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* и полученных на их основе интрогрессивных линий мягкой пшеницы по устойчивости к листовой ржавчине, наличию у них известных генов устойчивости *Lr21*, *Lr32*, *Lr39* и *Lr26*.

Материалы и методы

Объектом исследования служили синтетические формы *T. migushovae*, *T. palmovae*, *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii*, 22 линии, полученные с участием синтетической формы *T. miguschovae*, 15 линий с участием *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* и 4 линии – *T. palmovae*.

Заражение и оценку по устойчивости к листовой ржавчине проводили во взрослой стадии в полевых условиях. Популяцию линий заражали в фазе выхода в трубку смесью уредоспор ржавчины, собранных с разных сортов пшеницы. Устойчивость определяли по международной шкале Майнса и Джексона (Mains, Jakson, 1926). К устойчивым относили растения с типом реакции 0 (иммунные), 1 (высокоустойчивые) и 2 (умеренно устойчивые). Растения с промежуточным типом реакции (от 0 до 1) обозначали баллом 1–. К восприимчивым относили растения с типом реакции 3 и 4.

ДНК выделяли из 5–7-дневных этиолированных проростков пшеницы по методу Плашке с соавторами (Plaschke et al., 1995).

Идентификацию *Lr*-генов осуществляли с использованием ПЦР с праймерами, маркирующими гены *Lr21*, *Lr32*, *Lr39*. Для гена *Lr26* использовали праймеры к маркеру *SCM9*, указывающему на наличие транслокации 1BL.1RS, в состав которой входит данный ген. Праймеры отбирали на основании литературных данных, их названия и условия амплификации представлены в табл. 1.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1× буфер для Taq-ДНК-полимеразы (50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8.4, 2–5 мМ $MgCl_2$, 0.01 % твин-20), 2 мМ $MgCl_2$, по 0.2 мМ каждого dNTP, 12.5 пМ каждого праймера, 50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы. Амплификацию вели согласно условиям, рекомендуемым авторами, с незначительными модификациями (см. табл. 1).

В качестве положительных контролей для определения известных генов были использованы почти изогенные линии сорта Thatcher с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr21* (TcLr21), *Lr32* (TcLr32), *Lr26* (TcLr26) и сорт Кавказ, содержащий ген *Lr26*. Положительным контролем для определения гена *Lr39* служила линия KS93U62. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2 % агарозном геле для генов *Lr21*, *Lr39*, *Lr26* и в 8 % полиакриламидном геле (ПААГ) для гена *Lr32*. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью фотобокса Infiniti 1000. В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК-маркер М 24 100 bp производства «СибЭнзим».

Результаты

Результаты оценки изучаемого материала по устойчивости к листовой ржавчине представлены в табл. 2.

Синтетические формы *T. miguschovae* и *T. palmovae* проявили полный иммунитет, симптомы поражения отсутствовали. Синтетическая форма *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* проявляет высокую устойчивость (тип реакции 1).

По устойчивости к листовой ржавчине 22 линии с генетическим материалом *T. miguschovae* варьировали от высокоустойчивых с типом реакции 1– (3313, 1453, 503, 3901, 4045, 4047, 729, 1555, 2203, 2289, 2295, 2296, 4155, 4171) и 1 (3907, 3913, 4033, 4043) до умеренно устойчивых – тип реакции 2 (линии 538, 2803, 4032, 4039). В линиях, полученных с участием синтетической формы *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii*, к группе высокоустойчивых отнесены 3453, 4147, 4159, 4125, 4129, 4165, 4141; к группе умеренно устойчивых – 3621, 3913, 3931; к восприимчивым – линии 3459, 3639, 3575, 3895, 4201. Выявлены высокоустойчивые к листовой ржавчине линии 3254, 3261, 3265 и одна умеренно устойчивая 3256, полученные на основе *T. palmovae*.

Линии сорта Thatcher с генами *Lr21* (TcLr21), *Lr32* (TcLr32) и *Lr26* (TcLr26) имеют высокую восприимчивость (4 балла). Линия KS93U62 с геном *Lr39* проявляет полный иммунитет к листовой ржавчине. Сорт мягкой пшеницы Кавказ с геном устойчивости *Lr26* также ха-

Table 1. PCR regimes and primers used for genotyping

Gene	Primer	Amplification regime	Amplicon size	Reference
Lr21	Lr21F	94 °C 5 min; 30 cycles (94 °C 1 min; 50 °C 1 min; 72 °C 2 min); 72 °C 5 min	669	Huang, Gill, 2001
	Lr21R			
Lr32	BARC135F	94 °C 2 min; 30 cycles (95 °C 1 min; 52 °C 50 c; 73 °C 1 min); 72 °C 5 min	273	Thomas et al., 2010
	BARC135R			
Lr 39	GDM35-L	94 °C 4 min; 35 cycles (94 °C 30 c; 55 °C 30 c; 72 °C 30 c)	190	Singh et al., 2004
	GDM35-R			
Lr26	SCM9/F	94 °C 3 min; 30 cycles (94 °C 45 c; 60 °C 60 c; 72 °C 90 c); 72 °C 5 min	207	Weng et al., 2007
	SCM9/R			

Table 2. Leaf rust resistance in synthetic forms *T. miguschovae, T. durum(*M.it.*)/Ae. tauschii, T. palmovae*, introgression lines derived therefrom, and lines TcLr21, TcLr32, TcLr26, KS93U62

Synthetic	Response score	Line	Response score
T. miguschovae	0	3313, 1453, 503, 3901, 4045, 4047, 729, 1555, 2203, 2289, 2295, 2296, 4155, 4171	1–
		3907, 3913, 4033, 4043	1
		538, 2803, 4032, 4039	2
T. durum (M. it.)/*Ae. tauschii*	1	3453, 4147, 4159, 4125, 4129, 4165, 4141	1
		3621, 3913, 3931	2
		3459, 3639	3
		3575, 3895, 4201	4
T. palmovae	0	3254, 3261, 3265	1
		3256	2
Reference accessions		TcLr21, TcLr32, TcLr26	4
		KS93U62	0
		Kavkaz	4

рактеризуется высокой восприимчивостью к листовой ржавчине.

Далее исследуемый материал был изучен на присутствие молекулярных маркеров, сцепленных с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr21*, *Lr32*, *Lr39* и *Lr26*.

Маркер *GDM35*, сцепленный с геном *Lr39*, позволил выявить характерный фрагмент амплификации 190 п. н. в синтетических формах *T. miguschovae*, *T. palmovae*, *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii*, а также в восьми линиях 729, 1555, 2203, 2289, 2295, 2296, 4155, 4171, полученных на основе *T. miguschovae*, линиях 3261, 3265, полученных на основе *T. palmovae*, и в линии 4141 с генетическим материалом *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* (рис. 1).

Диагностические продукты амплификации для маркеров *Lr21F/R*, специфичного для гена *Lr21*, а также *BARC135*, сцепленного с геном *Lr32*, были выявлены в положительных контролях – линиях TcLr21 и TcLr32 соответственно. В синтетических формах *T. miguschovae*, *T. palmovae*, *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* их наличие не установлено (рис. 2).

Продукт амплификации размером 207 п. н., полученный с использованием маркера *SCM9* и указывающий на наличие транслокации 1BL.1RS с геном *Lr26*, наследуемым от сорта Кавказ, выявлен в линиях 538, 3313, 729, 1555, 2203, 2289, 2295, 2296, 4155, 4171, 4033, 4039, 4043, 4045, 4047, созданных на основе *T. miguschovae*, в линиях 4125 и 4129 с генетическим материалом от *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii*, в линии 3261, полученной с участием *T. palmovae* (рис. 3).

Обсуждение

Изученные синтетические формы *T. miguschovae*, *T. palmovae*, *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii*, послужившие генетическим мостиком для передачи устойчивости к листовой ржавчине и других ценных признаков в интрогрессивные линии, несут маркер *GDM35*, сцепленный с геном *Lr39*. Присутствие маркеров *Lr21F/R* и *BARC135*, сцепленных с генами *Lr21* и *Lr32*, не было выявлено. Возможно, это связано с тем, что образцы *Ae. tauschii*, использовавшиеся для создания изучаемых синтетиков, не несли генов *Lr21* и *Lr32*.

Выявление маркера *GDM35* в высокоустойчивых линиях 729, 1555, 2203, 2289, 2295, 2296, 4155, 4171, полученных на основе *T. miguschovae*, линиях 3261, 3265, созданных на основе *T. palmovae*, и в линии 4141 с генетическим материалом *T. durum* (M. it.)/*Ae. tauschii* предполагает возможное наличие в них гена *Lr39*.

В настоящее время среди генов устойчивости к листовой ржавчине, переданных от *Ae. tauschii*, высокую эффек-

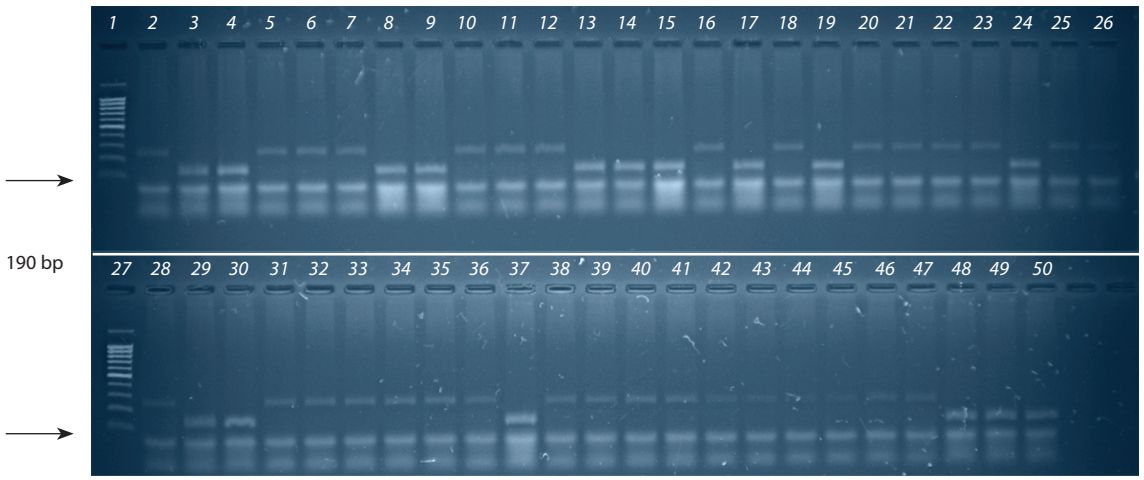


Fig. 1. PCR with primers *GDM35-R* and *GDM35-L* for the diagnostic marker linked to the leaf rust resistance gene *Lr39:*

1, 27, molecular weight ladder; 2, 28, variety Kavkaz; 3, 29, KS93U62 (*Lr39*); 4, *T. miguschovae*; 5-26, lines with genetic material from *T. miguschovae*; 8, 729; 9, 1555; 13, 2203; 14, 2289; 15, 2295; 17, 2296; 19, 4155; 24, 4171; 30, *T. durum(*M.it.*)/Ae. tauschii; 31-45,* lines with genetic material from *T. durum(*M.it.*)/Ae. tauschii; 37, 4141;* 46-49, lines with genetic material from *T. palmovae;* 48, 3261; 49, 3265; *50, T. palmovae*.

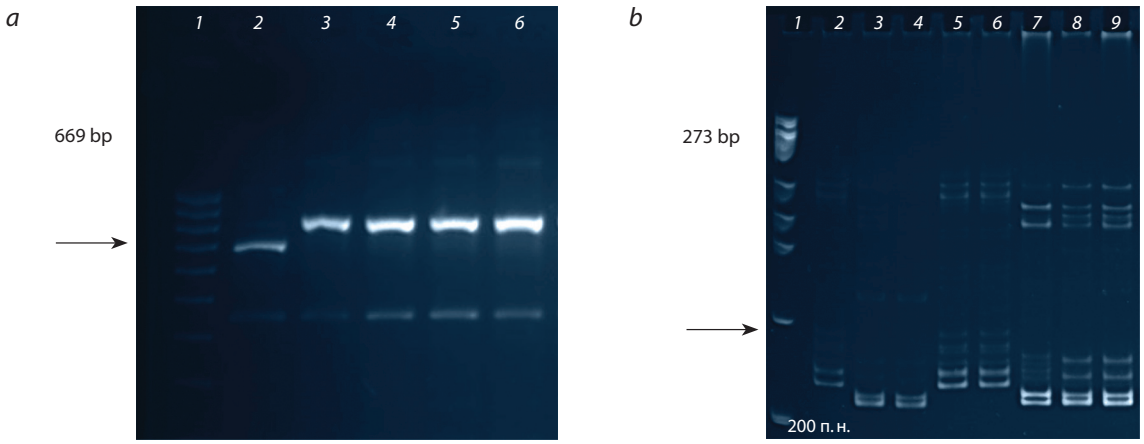


Fig. 2. (*a*) Amplification fragments obtained with primers *Lr21F* and *Lr21*L for the diagnostic marker linked to the leaf rust resistance gene *Lr21:*

1, molecular weight ladder; 2, line TcLr21; 3, variety Kavkaz; 4, *T. migushovae*; 5, *T. palmovae*; 6, *T. durum(*M.it.*)/Ae. tauschii;* (*b*) Amplification fragments obtained with primers *BARC135F* and *BARC135R* for the diagnostic marker linked to the leaf rust resistance gene *Lr32:* 1, molecular weight ladder; 2, 5, 6, line TcLr32; 3, 4, variety Kavkaz; 7, *T. migushovae*; 8, *T. palmovae*; 9, *T. durum(*M.it.*)/Ae. tauschii.*

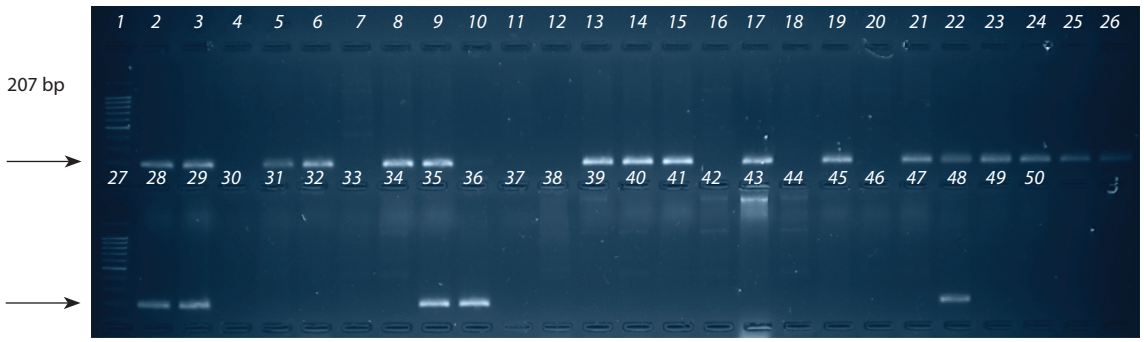


Fig. 3. Amplification fragments obtained with primers *SCM9/F* and *SCM9/R* for the diagnostic marker linked to the leaf rust resistance gene *Lr26:*

1, 27, molecular weight ladder; 2, 28-variety Kavkaz; 3, 29, line TcLr26; 4, *T. miguschovae*; 5-26, lines with genetic material from *T. miguschovae*; 5, 538; 6, 3313; 8 - 729; 9, 1555; 13, 2203; 14, 2289; 15, 2295; 17, 2296; 19, 4155; 21, 4033; 22, 4039; 23, 4043; 24 - 4171; 25- 4045; 26, 4047; 30, *T. durum(M.it.)/Ae. tauschii; 31-45,* lines with genetic material from *T. durum(*M.it.*)/Ae. tauschii* (among them: 35, 4125; 36, 4129) 46-49, lines with genetic material from *T. palmovae*; 48, 3261; 50, *T. palmovae*.

тивность на всей территории России проявляет ген *Lr39* (Zhemchuzhina, Kurkova, 2010). По данным Е.И. Гультяевой (2012), *Lr39* перспективен для использования в селекции пшеницы в России среди группы высокоэффективных генов.

Устойчивость к листовой ржавчине в линиях, созданных с участием *T. miguschovae*, в которых не были выявлены маркеры, сцепленные с геном *Lr39*, а также в устойчивых линиях 3453, 3621, 4125, 4129, 4147, 4159, 4165, 3913, 3931 с генетическим материалом *T. durum* (M.it.)/*Ae. tauschii* и в линиях 3254, 3256, полученных на основе *T. palmovae*, может контролироваться другим геном(ами), отличным(ми) от генов *Lr21*, *Lr32*, *Lr39*. Эти линии могут нести как гены *Lr42* и *Lr22a*, полученные от *Ae. tauschii*, так и гены устойчивости от *T. militinae* (линии с участием *T. miguschovae*) и *T. boeoticum* (линии с участием *T. palmovae*).

Ген *Lr42* относится к группе генов, характеризующихся как частично эффективные в России (Садовая и др., 2014). Ген возрастной устойчивости *Lr22a* входит в группу умеренно эффективных в США, Австралии, Европе (Mesterhazy et al., 2000) и высокоэффективных в Канаде (Hiebert et al., 2007). По данным (Коваленко и др., 2012), ген *Lr22a* является эффективным на всей территории России. Е.И. Гультяева (2012) относит *Lr22a* к перспективным для использования в селекции России среди генов устойчивости взрослых растений. Не стоит также исключать возможность потери маркеров, сцепленных с генами *Lr21*, *Lr32*, *Lr39*, при рекомбинациях в процессе беккроссирования и самоопылений.

Установлены линии, несущие маркер *SCM9*, выявляющий пшенично-ржаную транслокацию 1BL.1RS, сцепленную с геном *Lr26*. Транслокация 1BL.1RS могла быть передана в интрогрессивные линии от сорта Кавказ, который использовался в качестве реципиента при их создании. В настоящее время ген *Lr26* описан как утративший эффективность, вирулентные к нему клоны гриба широко распространены во всех регионах России. Тем не менее следует отметить, что данная транслокация дополнительно несет гены, повышающие урожайность зерна и засухоустойчивость за счет увеличения массы корней (Kim et al., 2004).

В ходе исследования отобраны линии 729, 1555, 2203, 2289, 2295, 2296, 4155, 4171 на основе *T. miguschovae* и линия 3261, полученная с участием *T. palmovae*, которые несут комбинацию генов (*Lr39*+*Lr26*).

Данная работа требует продолжения, в частности проведения фитопатологического теста, а также цитогенетического исследования передачи генетического материала в созданные интрогрессивные линии, поиска и апробации маркеров, сцепленными с генами *Lr42*, *Lr22a*, переданными в мягкую пшеницу также от *Ae. tauschii*.

Следует отметить, что в сортах отечественной селекции ген *Lr39* не представлен. В связи с этим отобранные линии с генами *Lr39* и (*Lr39*+*Lr26*) и другой изученный нами материал являются ценными источниками для селекции пшеницы на устойчивость к листовой ржавчине.

Acknowledgments

This work was supported by the RAS Presidium, Fundamental Research Program “Methodology and molecular methods for involvement of nontraditional cereals to breeding in order to create varieties of a novel species with unique parameters of adaptive value and grain quality”.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zinchenko A.N., Davoyan E.R., Kravchenko A.M., Zubanova Y.S. Use of synthetic forms in the preservation and exploitation of the gene pool of wild common wheat relatives. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(1):44-51.

Gultyaeva E.I. Methods of identification of wheat leaf rust resistance genes with use of DNA-markers and characterization of efficiency of *Lr*-genes. St. Petersburg, 2012;59-60. (in Russian)

Hiebert C.W., Thomas J.B., Somers D.J., McCallum B.D., Fox S.L. Microsatellite mapping of adult-plant leaf rust resistance gene *Lr22a* in wheat. Theor. Appl. Genet. 2007;115:877-884.

Huang L., Gill B.S. An RGA-like marker detects all known *Lr21* leaf rust-resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. Theor. Appl. Genet. 2001;103(6-7):1007-1013.

Ivanov G.I. New amphidiploid of wheat with the genomic constitution DDA^bA^b. Nauchno-tekhnicheskiy byulleten VNII rastenievodstva = Scientific and Technological Bulletin of the Vavilov Institute of Plant Industry.1984;142:78-79. (in Russian)

Kim W., Jonson P.S., Baenziger P.S., Lukaszewski A.J., Gaines C.S. Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources. Crop Sci. 2004;44:1254-1258.

Kovalenko E.D., Zhemchuzhina A.I., Kiseleva M.I., Kolomiets T.M., Scherbik A.A. Strategy of wheat breeding for resistance to rust deseases. Zashchita i karantin rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2012;9:19-22. (in Russian)

Mains E.B., Jakson H.S. Physiologic specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticiana* Erikss. Phytopathology. 1926;16:89-120.

McIntosh R.A., Yamayaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2013 Supplement. Available at: http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2013.

Mesterhazy A., Bartos P., Goyeau G., Niks R. European survey for leaf rust in wheat. Agronomie. 2000;20:793-804.

Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 1995;91:1001-1007.

Sadovaya A.S., Gultyaeva E.I., Mitrofanova O.P., Shaidayuk E.L., Hakimova A.G., Zuev E.V. Leaf rust resistance in common wheat varieties and lines from the collection of the Vavilov plant industry institute carrying alien genetic material. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(4):739-750. (in Russian)

Singh S., Franks C.D., Huang L., Brown-Guedira G.L., Marshall D.S., Gill B.S., Fritz A. *Lr41*, *Lr39* and a leaf rust resistance gene from *Aegilops cylindrica* may be allelic and are located of wheat chromosome 2DS. Theor. Appl. Genet. 2004;108:586-591.

Thomas J., Nilmalgoda S., Hiebert C., McCallum B., Humphreys G., DePauw R. Genetic markers and leaf rust resistance of the wheat gene *Lr32*. Crop Sci. 2010;50(6):2310-2317.

Weng Y., Azhaguvel P., Devkota R.N., Rudd J.C. PCR-based markers for detection of different sources 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background. Plant Breed. 2007;126(5):482-486.

Zhemchuzhina A., Kurkova N. Structure of population of *Puccinia triticina* in various regions of Russia in 2006–2008. Abstr. of the 8th Int. Wheat Conference, June 1–4, 2010, St. Petersburg, Russia. St. Petersburg, 2010;279.

Zhirov E.G., Ternovskaya T.K. Genomic engineering in wheat. Vestnik selskokhozyaystvennoy nauki = Herald of Agricultural Sciences. 1984;10:58-66. (in Russian)

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):102-107
DOI 10.18699/VJ18.337

Молекулярно-генетическое исследование одуванчика осеннего (*Taraxacum hybernum* Steven) с использованием SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров

Б.Р. Кулуев[1] ✉, А.В. Фатерыга[2], А.Р. Кулуев[1], Е.В. Михайлова[1], А.В. Чемерис[1]

[1] Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия
[2] Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН, Феодосия, Россия

Одуванчик осенний (*Taraxacum hybernum* Steven) – растение-каучуконос, одно из альтернативных гевее бразильской растений. В России произрастает только на Крымском полуострове, поэтому его часто называют крым-сагыз. Несмотря на свою потенциальную хозяйственную ценность, генетическая структура крымской популяции одуванчика осеннего на сегодняшний день остается неизученной. В связи с этим целью нашей работы была сравнительная молекулярно-генетическая характеристика одуванчика осеннего из различных местообитаний Крымского полуострова при использовании SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров. В результате проведенной работы из десяти географических точек Крымского полуострова были собраны семянки, листья и корни одуванчика осеннего. В целом одуванчик осенний обнаружен нами в пределах западной части Южного берега Крыма и западной части Крымских Предгорий – двух основных регионов его произрастания на полуострове. Из сухих листьев анализируемых растений при помощи цетилтриметиламмоний бромида была выделена тотальная ДНК. Впервые на одуванчике осеннем были испытаны 12 SSR- и по три RAPD- и ISSR-маркера. Полиморфизм RAPD- и ISSR-фрагментов определяли аналитическим электрофорезом в 1.7 % агарозном геле. Для сравнительного анализа длин SSR-фрагментов использовали гель-электрофорез в 8 % полиакриламидном геле. В результате проведенной работы была показана гомогенность крымской популяции одуванчика осеннего, что может быть связано с небольшой областью распространения и апомиктичным способом размножения этого вида. Однако известные по литературным данным фенотипические различия внутри крымской популяции говорят о необходимости продолжения исследований полиморфизма ДНК одуванчика осеннего, в том числе с использованием высокоразрешающих методов анализа.

Ключевые слова: *Taraxacum hybernum*; *Taraxacum kok-saghyz*; одуванчик осенний; крым-сагыз; кок-сагыз; SSR; RAPD; ISSR.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Кулуев Б.Р., Фатерыга А.В., Кулуев А.Р., Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Молекулярно-генетическое исследование одуванчика осеннего (*Taraxacum hybernum* Steven) с использованием SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):102-107. DOI 10.18699/VJ18.337

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Kuluev B.R., Fateryga A.V., Kuluev A.R., Mikhaylova E.V., Chemeris A.V. The molecular genetic study of krim-saghyz (*Taraxacum hybernum* Steven) using SSR, RAPD and ISSR markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):102-107. DOI 10.18699/VJ18.337 (in Russian)

Received 13.06.2017
Accepted for publication 04.09.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: kuluev@bk.ru

The molecular genetic study of krim-saghyz (*Taraxacum hybernum* Steven) using SSR, RAPD and ISSR markers

B.R. Kuluev[1] ✉, A.V. Fateryga[2], A.R. Kuluev[1], E.V. Mikhaylova[1], A.V. Chemeris[1]

[1] Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre RAS, Ufa, Russia
[2] T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of RAS, Feodosiya, Russia

Krim-saghyz (*Taraxacum hybernum* Steven) is an alternative to *Hevea brasiliensis* as a source of natural rubber. In Russia, krim-saghyz is common only in the Crimean Peninsula and is traditionally named after it. In spite of its potential for economical use, the genetic structure of the Crimean population of this plant is still unexplored. In this regard, the purpose of our work was a comparative molecular-genetic characterization of *T. hybernum* from various habitats of the Crimean Peninsula using SSR, RAPD and ISSR markers. According to the plan, we collected achenes, leaves and roots of krim-saghyz in 10 spots all over the Crimean Peninsula. We found the plants in the western part of the southern Crimean coast and the western part of the Crimean foothills, which are two general regions of the area of this species. Total DNA was extracted from dry leaves of krim-saghyz with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). For the first time 12 SSR, 3 RAPD and 3 ISSR markers were tested on krim-saghyz. To observe polymorphism of RAPD- and ISSR-fragments, we used analytical electrophoresis in 1.7 % agarose gel. To compare the length of SSR amplicons, we used gel-electrophoresis in 8 % polyacrylamide gel. We found that the Crimean population of krim-saghyz appears to be genetically homogeneous. This could be due to a small geographic range and apomictic reproduction of this species. However, the phenotypical diversity within the population of *T. hybernum* is well known from the literature. Consequently, the study of the DNA polymorphism of this species should be continued, in particular, with the help of high-resolution techniques.

Key words: *Taraxacum hybernum*; *Taraxacum kok-saghyz*; krim-saghyz; kok-saghyz; SSR; RAPD; ISSR.

В связи с нарастающим мировым спросом на натуральный каучук и уязвимостью его основного источника – тропического дерева гевеи бразильской (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.) становится актуальным поиск растений-каучуконосов, относящихся к другим видам. В нашей стране впервые важность этого вопроса была осознана на государственном уровне еще в 20-е годы прошлого века. В 1929–1932 гг. были организованы специальные экспедиции с целью отбора среди растений флоры СССР каучуконосных видов, пригодных для хозяйственного использования. В ходе поисковых экспедиций пересмотрено и оценено по содержанию каучука более тысячи видов растений и среди них обнаружено множество каучуконосов, из которых наиболее перспективными признаны кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* E.L. Rodin), тау-сагыз (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. & G.G. Bosse) и одуванчик осенний (*Taraxacum hybernum* Steven) (Ильин, Якимов, 1950), известный также под названием крым-сагыз (Аксельрод, 1944). В советское время были разработаны основные агротехнические приемы возделывания кок-сагыза и промышленного производства из его корней натурального каучука, тогда как тау-сагыз и одуванчик осенний оказались задействованы в меньшей степени. В нашей стране последний произрастает только по южному побережью Крыма и в западной части Крымских предгорий (по данным сайта Плантариум), однако этот же вид одуванчиков распространен в Болгарии и Турции (Kirschner et al., 2017). Одуванчик осенний как отдельный вид был выделен российским ботаником шведского происхождения Х.Х. Стевеном в 1856 г., а его каучуконосность открыта советскими ботаниками в 1931 г., причем показано, что качество каучука у него лучше, чем у кок-сагыза (Бондаренко, 1941).

Несмотря на свою потенциальную хозяйственную ценность, одуванчик осенний остается весьма малоизученным видом как в нашей стране, так и за рубежом. Более того, сейчас это растение почти забыто, по крайней мере последние 50 лет в литературе оно упоминается лишь вскользь, а каких-либо серьезных исследований вида не проводилось уже более 70 лет (Ильин, Якимов, 1950). В то же время в мире наблюдается большой рост исследований кок-сагыза, связанных в том числе с изучением генетической гетерогенности его отдельных популяций (McAssey et al., 2016). Данное направление исследований совместно с изучением каучуконосности имеет важное значение для отбора лучших генотипов из природы и дальнейшей их селекции с целью получения новых высокопродуктивных сортов кок-сагыза. Поскольку для одуванчика осеннего подобные исследования никогда не проводились, представляет большой интерес генетический анализ его крымской популяции для оценки генетической гетерогенности и разграничения возможных отдельных популяций.

На сегодняшний день геном одуванчика осеннего не секвенирован, поэтому для выявления полиморфизма его ДНК прежде всего могут применяться методы, основанные на ПЦР для одновременного выявления мультилокусного полиморфизма ДНК, не требующие изначального знания нуклеотидных последовательностей всего генома или его частей. Из этих методов наиболее известен и широко распространен RAPD-анализ (от Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990). Отрицательной чертой метода RAPD является относительно плохая воспроизводимость, что может быть связано, в частности, с низкой температурой отжига RAPD-праймеров. В другом методе выявления полиморфизма ДНК, также основанном на ПЦР, который называется ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), используются относительно высокие температуры отжига (около 52 °С), что существенно увеличивает воспроизводимость анализа. ISSR-анализ тоже базируется на использовании в ПЦР только одного праймера, представляющего собой тандемный повтор 2–6 нуклеотидов микросателлитов и 2–4 специфических вырожденных нуклеотидов (Zietkiewicz et al., 1994).

В настоящее время одуванчик осенний нигде в мире не культивируется, его семена можно собрать только в природных популяциях. В связи с этим представляет большой интерес поиск и сбор его семян в естественных местообитаниях Крымского полуострова и оценка ареала данного вида. Исходя из вышеизложенного, целью нашей работы была сравнительная молекулярно-генетическая характеристика одуванчика осеннего из различных местообитаний Крымского полуострова. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи: сбор растительного материала одуванчика осеннего из десяти пунктов естественного местообитания; выделение из них тотальной ДНК различными методами; испытание ряда RAPD- и ISSR-праймеров для определения мультилокусного полиморфизма ДНК крымской популяции одуванчика осеннего. Планировалось также провести SSR-анализ (Simple Sequence Repeat), поскольку ранее была показана возможность применения этого метода для оценки генетического разнообразия популяций кок-сагыза (McAssey et al., 2016).

Материалы и методы

Поиск растений одуванчика осеннего проводили в Крыму в конце октября 2016 г. Состояние популяции вида за последние 70 лет оставалось неисследованным, поэтому представляли большой интерес поиск и сбор семян по всей области его распространения в Крыму. В целом одуванчик осенний обнаружен нами в пределах западной части Южного берега Крыма и западной части Крымских предгорий – двух основных регионов его произрастания на полуострове. Семянки одуванчика осеннего были собраны из десяти разных пунктов (табл. 1, рис. 1), в каждом пункте для этого использовано по пять разных растений. Собирали также корни и листья одуванчиков. Через два месяца после сбора материала проводили опыты по прорашиванию семян и получению проростков. Морфологических различий между одуванчиками осенними из разных местообитаний не выявлено.

Тотальную ДНК из молодых проростков одуванчика осеннего выделяли методом солевой экстракции (Aljanabi, Martinez, 1997). При этом для каждого местообитания выборка растений составила 3 ($n = 3$). Из сухих листьев, собранных из естественных местообитаний, ДНК выделяли с использованием цетилтриметиламмоний бромида (CTAB) (Rogers, Bendich, 1985). Выборка образцов ДНК составила 3. Качество выделенной тотальной ДНК определяли при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле. Для SSR-анализа использовали праймеры для амплификации

Table 1. Sampling localities of *Taraxacum hybernum* seeds, leaves, and roots

Locality No.	Location	Cenosis	Coordinates (N, E) and elevation AMSL.
1	Eastern outskirts of Sevastopol, Verkhnesadovoe village, roadside	Lawn	44.688806, 33.693270, 83 m
2	Northern outskirts of Sevastopol, heap near a trench of the First Siege of Sevastopol	Ruderal vegetation	44.632801, 33.536325, 53 m
3	Sevastopol, Inkerman, right bank of the Chernaya River	Steppe slope	44.607195, 33.606330, 13 m
4	Sevastopol, right bank of Kazach'ya Bay	Feathergrass steppe	44.570643, 33.415666, 10 m
5	Sevastopol, Varnutka Valley, roadside between the Yalta motorway and Rezervnoe Village	Steppificated slope inside an oak forest	44.479177, 33.692432, 244 m
6	Sevastopol, Baydar Valley, roadside between Orlinoe Village and the Baydar Gate passage	Meadow–steppe slope in the fringe of an oak forest	44.430331, 33.790343, 354 m
7	Urban district Yalta, northern outskirsts of Katsiveli Settlement, roadside	Underneath cypresses	44.401846, 33.968530, 203 m
8	Urban district Yalta, eastern outskirsts of Gurzuf Settlement, Ayu-Dag piedmont	Oak forest fringe	44.566569, 34.319395, 224 m
9	Urban district Yalta, northeastern outskirsts of Nikita Settlement, roadside	Underneath cypresses	44.517823, 34.245204, 258 m
10	Urban district Yalta, southern slope of Polikurovskiy Hill, roadside	»	44.500394, 34.184486, 39 m

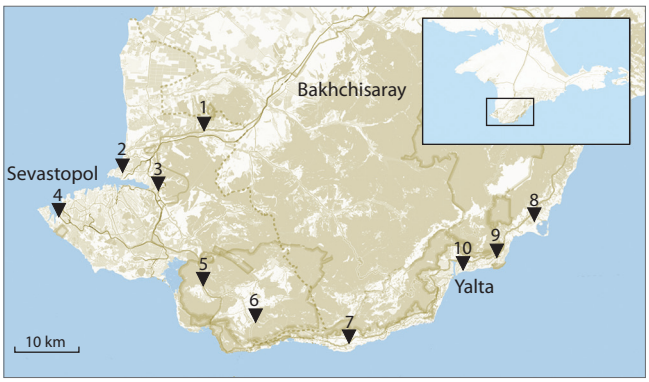


Fig. 1. Geographical locations of the 10 sampling localities of T. hybernum seeds on the map of Crimea.

The map was prepared with OpenStreetMap (http://www.openstreetmap.org).

12 различных локусов, обозначенных TKS_003–TKS_0177 (табл. 2). RAPD-анализ проводили с применением универсальных праймеров AFK1, AFK3 и LMBD (табл. 3) (Baymiev et al., 2011), которые были синтезированы в ООО «Евроген» (Россия). В работе были использованы три ISSR-праймера, синтезированные ООО «Биоскрин» (Россия), последовательности которых приведены в табл. 3 (Ефимов, 2012; Костюкова и др., 2013). Во всех экспериментах в качестве контроля использовали тотальную ДНК кок-сагыза, выделенную из сухих листьев CTAB-методом. Зрелые семянки кок-сагыза были получены из коллекции Ботанического сада Университета г. Бонн (Германия) и затем выращены на опытном участке Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН.

Реакционная смесь для SSR-, RAPD- и ISSR-анализов объемом 30 мкл содержала следующие компоненты: 1 ед. Taq-полимеразы («Евроген», Россия), 3 мкл 10-кратного буфера Taq-полимеразы, $MgCl_2$ (2.5 мМ для SSR, 5 мМ для RAPD и ISSR), 0.25 мМ каждого dNTP, 90 пМ праймера (для RAPD- или ISSR-анализа) или каждого праймера из пары (в случае SSR-анализа), 0.2–0.5 мкг тотальной ДНК. Смесь покрывали 20 мкл минерального масла и оставляли для проведения реакции в амплификаторе производства компании «ДНК-технология» (Россия) с использованием следующих протоколов. SSR-анализ: начальная денатурация – 3 мин при 94 °C; 35 циклов: денатурация при 94 °C – 40 с, отжиг праймеров при температурах 50–55 °C (табл. 4) – 40 с, элонгация при 72 °C – 40 с; финальная элонгация при 72 °C – 5 мин. RAPD-анализ: начальная денатурация – 3 мин при 94 °C; 35 циклов: денатурация при 94 °C – 50 с, температура отжига 30 °C – 50 с и элонгация при 72 °C – 1 мин 40 с; заключительная элонгация – 7 мин при 72 °C. ISSR-анализ: начальная денатурация – 5 мин при 94 °C; 35 циклов: денатурация при 94 °C – 50 с, температура отжига 52 °C – 50 с и элонгация при 72 °C – 1 мин 40 с; заключительная элонгация – 7 мин при 72 °C (Костюкова и др., 2013).

Полиморфизм RAPD- и ISSR-фрагментов определяли аналитическим электрофорезом в 1.7 % агарозном геле. Агарозный гель-электрофорез проводили в приборах модели Sub-Cell GT WIDE MINI (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве маркеров молекулярной массы использовали 1 kb DNA Ladder и 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия). Для сравнительного анализа размеров SSR-маркеров использовали гель-электрофорез в 8 % полиакриламидном геле. Все гели фотографировали с помощью фотодокументационной системы Gel Camera System (UVP Inc., США). Длину ДНК-фрагментов оценивали при помощи программы для документирования и анализа изображений Labworks (версия 4.0).

Table 2. SSR primers (McAssey et al., 2016)

Locus	Forward primer (5′–3′)	Reverse primer (5′–3′)
TKS_003	TCACCGAGTTGTAGAGAGAGA	CAGCAATTAAGGCTCTGTAAA
TKS_0025	GCTCTCATAATAAGAACCCAGA	ATACCGTGGTGAGCATAAATA
TKS_0085	AGTTTCTCTAGAGCTCGATCC	TGTAAAGAATCAAACGAATGG
TKS_0091	GCAAGTTTGCACCAGTTT	GTTATTTGTTAACCCATTCCA
TKS_0097	AAGATGTAATGCTTGGAAAGA	AACACAAGCCAAACAAATAAC
TKS_0105	ACCTTGGAGACGAAAGTAAAT	CAACTCTAACAAGAGCGACAC
TKS_0107	GAACCGTGATACAAGCATAAA	CATCTCCATTGTTGTCCATAC
TKS_0110	GGCTGATCAAGAGTACTGTCC	TTATATGGGAATATACCGGAAG
TKS_0111	ATCTACAACAAGTTCGTGAGG	AATCAACTGGATTTCTTAGGG
TKS_0112	ACAGGAGTTGATGTCTTGATG	ATTGAATCATTAACCGTCAGA
TKS_0113	CCAAGACCTCTACAATCGTTA	ATCTTCGGAGTAGTGGATTGA
TKS_0177	CCGATAACCGTAGTCAGATAA	CTTCTTCTTCGTCCTCTTCAT

Результаты

В результате проведенного агарозного гель-электрофореза из проростков одуванчика осеннего методом солевой экстракции и из сухих листьев CTAB-методом выделена высокомолекулярная и нефрагментированная ДНК, пригодная для SSR-анализа. Однако тотальная ДНК, выделенная методом солевой экстракции, оказалась малопригодной для RAPD- и ISSR-анализов, так как при использовании этой ДНК в каждом случае амплифицировалось не более трех ее фрагментов. Возможно, это связано с повышенным содержанием солей в препаратах ДНК, полученных методом солевой экстракции. Поэтому в дальнейшей работе была использована только ДНК, экстрагированная CTAB-методом.

Для работы по SSR-анализу были отобраны пары праймеров, которые ранее показали свою эффективность при анализе не только кок-сагыза, но и одуванчика лекарственного (*Taraxacum* sect. *Taraxacum* F.H. Wigg.) (McAssey et al., 2016). В результате проведенного SSR-анализа доказано, что все использованные 12 пар SSR-праймеров подходят для амплификации соответствующих локусов как кок-сагыза, так и одуванчика осеннего. При электрофорезе в полиакриламидном геле четких различий в размерах SSR-маркеров между одуванчиком осенним из разных местообитаний обнаружить не удалось. В то же время во многих случаях выявлялась существенная разница в размерах анализируемых SSR-локусов данного вида с кок-сагызом (рис. 2). Приблизительные размеры полученных в ходе работы SSR-ампликонов одуванчика осеннего и оптимальные температуры отжига праймеров представлены в табл. 4.

При RAPD-анализе с праймером AFK1 в серии экспериментов выявлялось не менее пяти четко различимых ампликонов, которые по размеру были схожи во всей анализируемой группе одуванчика осеннего (рис. 3, *а*). У кок-сагыза при этом амплифицировались тоже пять ампликонов, но все они по размеру отличались от AFK1-фрагментов одуванчика осеннего. RAPD-анализ с праймером AFK3 тотальной ДНК одуванчика осеннего приводил к амплификации семи локусов разного размера (см. рис. 3, *б*). При этом среди образцов из десяти разных

Table 3. RAPD and ISSR primers

Primer name	Sequence 5′–3′
AFK1	ACGGTGGACG
AFK3	GCGTCCATTC
LMBD	GGGCGCTG
IS1	AGAGAGAGAGAGAGAGYG
IS3	GAGAGAGAGAGAGAGAC
DAC1	CACACACACACAT

Table 4. Lengths of the amplified DNA fragments in the SSR analysis of *T. hybernum* in 8% polyacrylamide gel and the optimum annealing temperatures of TKS primers

Locus	Amplicon size, bp	Optimum annealing temperature, °C
TKS_003	200	55
TKS_0025	280	55
TKS_0085	160	55
TKS_0091	170	55
TKS_0097	160	50
TKS_0105	170	50
TKS_0107	250	55
TKS_0110	170	50
TKS_0111	180	50
TKS_0112	150	55
TKS_0113	150	55
TKS_0177	200	55

местообитаний не удалось выявить ни одного полиморфного локуса. В случае использования праймера LMBD амплифицировалось пять фрагментов ДНК, и также среди всей анализируемой группы крымской популяции одуванчика осеннего полиморфные локусы не обнаруживались. При сравнении одуванчика осеннего с кок-сагызом такие полиморфные локусы выявлялись при использовании всех

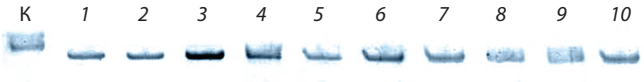


Fig. 2. PAGE analysis of amplification products of T*araxacum kok-saghyz* (K) and *T. hybernum* from 10 localities (1-10) after SSR-PCR of the TKS_0091 locus.

The size of the TKS_0091 amplicon of *Taraxacum kok-saghyz* (K) is 180 bp.

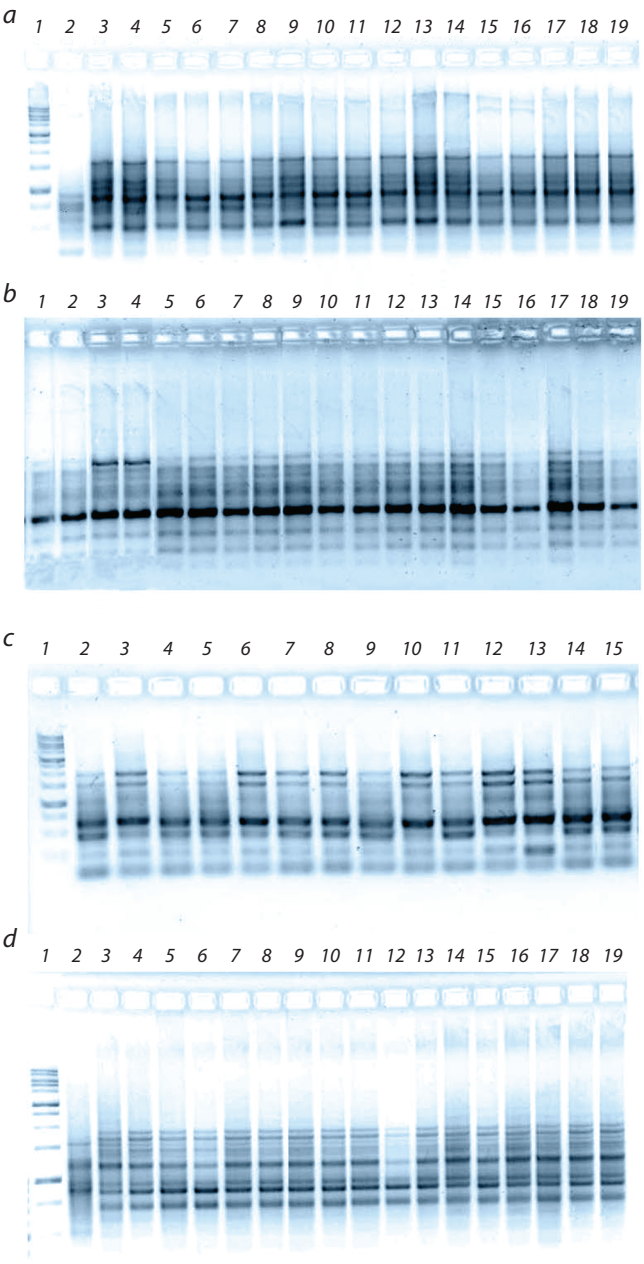


Fig. 3. Results of RAPD and ISSR analyzes.

(*a*) RAPD analysis with AFK1 primer (Lanes: *1*, molecular weight ladder; *2*, kok-saghyz, *3-19*, *T. hybernum* from ten different habitats). (*b*) RAPD analysis with AFK3 primer (*1-19*, *T. hybernum* from ten different habitats). (*c*) ISSR analysis with DAC1 primer (*1*, molecular weight ladder; *2-15 T. hybernum* from 10 different habitats). (*d*) ISSR analysis with IS3 primer (*1*, molecular weight ladder; *2*, kok-saghyz; *3-19 T. hybernum* from ten different habitats). The sizes of the molecular weight ladder fragments from bottom to top are: 250, 500, 750, 1000, 1500. 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp.

трех RAPD-праймеров: обнаруживались совпадающие между двумя видами одуванчиков ампликоны, однако их никогда не было больше двух в одном RAPD-анализе.

При ISSR-анализе одуванчика осеннего во всех экспериментах выявлялись четко различимые ампликоны: шесть – в случае с праймером IS1, семь – IS3, шесть – DAC1 (см. рис. 3, *в*, *г*). В то же время при использовании этих трех ISSR-праймеров не было выявлено ни одного полиморфного локуса, который позволил бы оценить возможную генетическую гетерогенность крымской популяции исследуемого вида. При ISSR-анализе кок-сагыза выявлялось примерно столько же отдельных ампликонов, однако многие из них отличались по размеру от аналогичных ISSR-фрагментов одуванчика осеннего, хотя общие для этих двух видов одуванчика фрагменты также амплифицировались (см. рис. 3, *г*).

Обсуждение

Впервые после почти 70-летнего перерыва в изучении отечественных каучуконосов нами проведен поиск растений одуванчика осеннего на территории Крымского полуострова. Показано, что крымская популяция данного вида произрастает на сравнительно небольшом участке и поэтому может считаться уязвимой. С целью дальнейшего изучения генетической гетерогенности популяции одуванчика осеннего были собраны его семянки, листья и корни из десяти разных географических точек (см. рис. 1), различающихся особенностями биоценоза и высотой над уровнем моря (см. табл. 1).

В ходе дальнейшей работы была создана коллекция тотальной ДНК одуванчика осеннего из сухих листьев и молодых проростков. Установлено, что для выделения качественной тотальной ДНК из образцов исследуемого вида больше всего подходит CTAB-метод, причем листья до процедуры выделения должны быть высушены.

Показано, что все 12 использованных в ходе работы праймеров TKS могут быть применены для SSR-анализа не только кок-сагыза и одуванчика лекарственного (McAssey et al., 2016), но и одуванчика осеннего. При этом методом SSR-анализа нам не удалось выявить генетический полиморфизм внутри крымской популяции одуванчика осеннего. Необходимо отметить, что в оригинальной работе (McAssey et al., 2016) для сравнения размеров SSR-маркеров разных популяций кок-сагыза проводился капиллярный электрофорез в автоматическом секвенаторе, который позволяет детектировать минимальные изменения в размере ампликонов. Проведенный нами для разделения SSR-ампликонов электрофорез в небольшом полиакриламидном геле, к сожалению, не позволял увидеть изменения в размерах фрагментов ДНК менее 10 п. н. Поэтому в дальнейшем представляет определенный интерес использование высокоразрешающих методов анализа длины фрагментов ДНК, полученных с помощью SSR-маркеров.

Впервые для генетического анализа одуванчиков нами были применены RAPD-праймеры AFK1, AFK3 и LMBD, которые ранее использовались при исследовании микроорганизмов (Baymiev et al., 2011). Показана высокая эффективность данных праймеров для изучения одуванчиков осеннего и кок-сагыза. Также впервые на одуванчиках

были испытаны ISSR-праймеры IS1, IS3 и DAC1, которые ранее показали свою эффективность при генетическом анализе однодольных растений семейства орхидных (Ефимов, 2012; Костюкова и др., 2013). Количество и качество выявляемых ISSR-маркеров при этом было достаточным, по крайней мере для четкого разделения двух видов рода. Несмотря на относительно большое количество амплифицируемых при RAPD- и ISSR-анализах фрагментов ДНК, нам не удалось выявить ни одного полиморфного локуса, позволяющего говорить о генетической гетерогенности крымской популяции одуванчика осеннего. Исходя из этих данных следует, что работы по поиску эффективных праймеров для генетического анализа популяций данного вида методами RAPD и ISSR должны быть продолжены.

Таким образом, растущий в Крыму одуванчик осенний, вероятнее всего, представлен одним видом растений (*T. hybernum*) и, возможно, одной относительно гомогенной популяцией. Можно предполагать, что это связано с относительно небольшой областью распространения этого вида на Крымском полуострове, а также с тем, что он размножается в основном апомиктично, образуя семена без оплодотворения. Стерильность пыльцы одуванчика осеннего при этом достигает 95 %. Поэтому возможности образования гибридных форм данного вида в результате перекрестного опыления и последующего расщепления очень ограничены (Филиппов и др., 1948). Среди исследованных образцов одуванчика осеннего были растения из типовой местности *T. hybernum*, описанного из окрестностей пгт Никита (пункт 9), а также из типовой местности *T. pobedimovae* Schischk., описанного из окрестностей Севастополя (бухта Камышевая, расположенная в непосредственной близости к бухте Казачьей, пункт 4) (Цвелев, 1989).

Полученные нами результаты могут служить одним из подтверждений выводов об отсутствии таксономической обособленности *T. pobedimovae* и его синонимии с *T. hybernum*, высказанных на основе исследования морфологической изменчивости этих растений (Ена, 2001). Однако по данным литературы известно, что, несмотря на апомиктичный способ размножения одуванчика осеннего, внутри этого вида, возможно, имеется определенное морфологическое разнообразие, которое, однако, может и не быть связано с генетической гетерогенностью. Так, в работе (Филиппов и др., 1948) выделены розовосемянковые и белосемянковые формы одуванчика осеннего, которые отличались от типовой буросемянковой формы не только окраской семянок, но и рядом других признаков. Тем не менее сведения, приведенные авторами указанной работы, не позволяют с уверенностью заключить, относились ли исследованные ими формы действительно к *T. hybernum*, или же принадлежали к другим видам одуванчиков секции *Scariosa* Hand.-Mazz. Среди представителей этой секции имеются виды с красноватой окраской семянок, например *Taraxacum hyberniforme* Soest, описанный в 1968 г. из Турции, а затем найденный и в Крыму (Van Soest, 1975). Кроме того, среди образцов, рассмотренных Д.И. Филипповым с соавторами, могли быть и иные таксоны, возможно, еще не описанные. Исходя из этого следует, что изучение генетического разнообразия одуванчика осеннего (и близких к нему видов) в Крыму должно быть продолжено с привязкой к морфологическим особенностям растений, а также содержанию и качеству каучука.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project Povolzh'e 17-44-020120 r_a. Use was made of equipment of the Agidel Shared Access Center and the KODINK unique research facility.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Akselrod D.M. Agrotekhnika krym-sagyza na polivnykh zemlyakh [Agrotechnology of krym-sagyz on meliorated lands]. Moscow, 1944. (in Russian)

Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Res. 1997;25(22):4692-4693. DOI 10.1093/nar/25.22.4692.

Baymiev An.K., Ptitsyn K.G., Blagova D.K., Muldashev A.A., Baymiev Al.K. Genetic diversity and phylogeny of root nodule bacteria entering into symbiosis with bitter peavine *Lathyrus vernus* (L.) Bernh. Microbiology. 2011;80(1):96-100. DOI 10.1134/S0026261711010036.

Bondarenko P.V. Krym-sagyz. Priemy vyrashchivaniya v Sredney Azii [Krym-sagyz. Methods of growing in Central Asia]. Tashkent: Uzfan Publ., 1941. (in Russian)

Ena A.V. Annotated check-list of endemics of the Crimean flora. Ukrainskiy botanicheskiy zhurnal = Ukrainian Botanical Journal. 2001;58(6):667-676. (in Russian)

Efimov P.G. The study of ISSR polymorphism of *Dactylorhiza baltica*, *D. fuchsii* and *D. incarnata* (Orchidaceae) from the northwest European Russia. Botanicheskiy zhurnal = Botanical Journal. 2012; 97(6):751-761. (in Russian)

Filippov D.I., Nichiporovich A.A., Akselrod D.M. Kultura kauchukonosov v SSSR [Culture of Rubber Plants in the USSR]. Moscow: OGIZ; Selkhozgiz Publ., 1948. (in Russian)

Ilyin M.M., Yakimov P.A. Kauchukonosy i guttaperchenosy SSSR [Rubber plants and gutta-percha plants of the USSR]. Ilyin M.M. (Ed.). Rastitel'noe syr'e SSSR. Tekhnicheskie rasteniya [Raw plant materials in the USSR: Industrial crops. V. 1.]. Moscow, Leningrad: AS of USSR Publ., 1950;61-141. (in Russian)

Kirschner J., Štepánek J., Greuter W. *Taraxacum*. In: Greuter W., von Raab-Straube E. (Eds.). Compositae. Euro+Med Plantbase – the Information Resource for Euro-Mediterranean Plant Diversity. Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, 2017. Available at: http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed. Accessed May 5, 2017.

Kostuykova E.E., Zayakin V.V., Nam I.Ya. The molecular-genetic identification of rare orchid species of the Bryansk region. Byulleten Bryanskogo otdeleniya Rossiyskogo botanicheskogo obshchestva = Bulletin of Bryansk department of Russian botanical society. 2013; 1(1):51-55. (in Russian)

McAssey E.V., Gudger E.G., Zuellig M.P., Burke J.M. Population genetics of the rubber-producing Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz*). PLoS ONE. 2016;11(1):e0146417. DOI 10.1371/journal.pone.0146417.

Plantarium: an online plant indicator. *Taraxacum hybernum* Steven. Available at: http://www.plantarium.ru/page/view/item/37597.html. (in Russian)

Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol. 1985;5(2):69-76. DOI 10.1007/BF00020088.

Tsvelev N.N. Genus *Taraxacum* Wigg. N.N. Tsvelev (Ed). Flora evropeiskoi chasti SSSR [Flora of the European USSR. V. 8]. Leningrad: Nauka Publ., 1989;61-114. (in Russian)

Van Soest J.L. 127. *Taraxacum* Wiggers. In: Davis P.H. (Ed.). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh: Edinburgh Univ. Press, 1975;788-812.

Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990;18(22):6531-6535. DOI 10.1093/nar/18.22.6531.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 1994;20(2):176-183. DOI 10.1006/geno.1994.1151.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):108-114
DOI 10.18699/VJ18.338

Внутривидовой полиморфизм гена сахарозосинтазы *Sus1* у образцов *Pisum sativum* L.

Е.А. Дьяченко[1] ✉, М.А. Слугина[1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра биотехнологии, Москва, Россия

Горох посевной *Pisum sativum* широко культивируется в России и в мире. Продуктивность гороха во многом зависит от его способности образовывать симбиоз с клубеньковыми бактериями. Ранее было показано, что на симбиотическую активность гороха оказывает существенное влияние работа сахаролитических ферментов. Одним из важнейших ферментов углеводного метаболизма является сахарозосинтаза *Sus1*, которая осуществляет реакцию обратимого гидролиза сахарозы до УДФ-глюкозы и фруктозы. В настоящей статье охарактеризована внутривидовая вариабельность гена *Sus1* у 14 образцов гороха *Pisum sativum*. Длина полученных генов варьировала от 3514 до 3532 п. н. Все гены имели сходную структуру и состояли из 13 экзонов и 12 интронов и по своему строению были отнесены к SUS1-группе двудольных растений. В составе нуклеотидных последовательностей выявлено 125 SNP. Интронные последовательности помимо единичных нуклеотидных замен содержали шесть инделей, вследствие чего их протяженность варьировала от 1093 до 1111 п. н. Наиболее вариабельным оказался интрон III. В кодирующих последовательностях найдено 47 SNP, при этом наиболее вариабельным у *P. sativum* оказался экзон II. Среди выявленных в экзонах единичных замен 16 приводили к замещению аминокислотных остатков, при этом шесть замещений потенциально могут влиять на функционирование белка. В составе транслированной аминокислотной последовательности выявлены активные сайты и консервативные мотивы, последовательности которых инвариантны у всех исследуемых образцов. На основе биоинформационного анализа аминокислотной последовательности предложена гипотетическая модель третичной структуры белка Sus1. Согласно этой модели, белок представляет собой тетрамер, каждая субъединица которого имеет трехдоменную структуру. В результате проведенного филогенетического анализа с использованием полученных последовательностей, а также известных гомологов генов сахарозосинтаз бобовых было показано, что гены *Sus1* и *Sus3* эволюционно ближе друг к другу, чем к *Sus2*. Также выдвинута гипотеза о том, что гены семейства сахарозосинтаз дивергировали раньше, чем произошло разделение бобовых на виды.

Ключевые слова: *Pisum sativum*; сахарозосинтаза; нуклеотидная вариабельность; замещения аминокислотных остатков; третичная структура Sus1.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Дьяченко Е.А., Слугина М.А. Внутривидовой полиморфизм гена сахарозосинтазы *Sus1* у образцов *Pisum sativum* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):108-114. DOI 10.18699/VJ18.338

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Dyachenko E.A., Slugina M.A. Intraspecific variability of the *Sus1* sucrose synthase gene in *Pisum sativum* accessions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):108-114. DOI 10.18699/VJ18.338 (in Russian)

Intraspecific variability of the *Sus1* sucrose synthase gene in *Pisum sativum* accessions

E.A. Dyachenko[1] ✉, M.A. Slugina[1, 2]

[1] Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow, Russia
[2] Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The pea *Pisum sativum* is widely cultivated in Russia as well as over the world. Pea productivity depends on the ability of the pea plant to get into a symbiosis with nodule bacteria. It was previously shown that the strength of the symbiotic activity depends on the activity of plant sucrose cleavage enzymes. Sucrose synthase *Sus1* is one of the most important enzymes involved in carbohydrate metabolism. Sucrose synthase cleaves sucrose into UDP-glucose and fructose. This paper is devoted to characterization of *Sus1* gene intraspecific variability in 14 *Pisum sativum* accessions. The length of the identified *Sus1* gene varied from 3514 bp to 3532 bp. All identified genes had a similar structure and contained 13 exons and 12 introns. According to their structure, they were assigned to the SUS1-group of dicotyledonous plants. In nucleotide sequences, 125 SNPs were identified. In addition to SNPs, intron sequences contained six indels, thus their length varied from 1093 bp to 1111 bp. The most variable was the intron III. In coding sequences, 47 SNPs were found, wherein the most variable was the exon II. 16 exon SNPs led to amino acid substitutions. Six of them were deleterious and may potentially influence protein folding and stability. All the conservative motifs and active sites were detected in the translated amino acid sequences. It was shown that their sequences were invariable in all the tested accessions. Computational analysis of the amino acid sequences has predicted Sus1 tertiary structure. The protein is a tetramer and each subunit in its turn consists of three domains. The phylogenetic analysis using identified *Pisum Sus1* sequences and homologous sucrose synthase genes revealed that the *Sus1* and *Sus3* genes are closer to each other than to *Sus2*. It was also proposed that the sucrose synthase family genes had diverged before legumes split into species.

Key words: *Pisum sativum*; sucrose synthase; nucleotide variability; amino acid substitutions; Sus1 tertiary structure.

Received 30.10.2017
Accepted for publication 15.11.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: dyachenko-el@yandex.ru

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) – одна из основных зернобобовых культур в России и в мире. Обладает высокой питательной и диетической ценностью, обусловленной большим содержанием белка, клетчатки, жирных кислот и антиоксидантов (Dahl et al., 2012). Продуктивность гороха существенно зависит от симбиоза с клубеньковыми бактериями, которые снабжают растения азотом. В свою очередь растение обеспечивает бактерии углеводами. Было высказано предположение, что на симбиотическую активность гороха может оказывать влияние работа сахарозолитических ферментов. Одним из таких ферментов, ассоциированных с симбиотической активностью, является сахарозосинтаза (Horst et al., 2007).

Фермент сахарозосинтаза, осуществляющий реакцию обратимого гидролиза сахарозы до УДФ-глюкозы и фруктозы, кодируется семейством генов *Sus*, представленным у всех высших растений. У отдельных представителей бобовых известно до шести изоформ сахарозосинтазы (Horst et al., 2007). К числу наиболее интересных генов сахарозосинтаз бобовых относится ген *Sus1*, так как именно он может влиять на формирование клубеньков (Horst et al., 2007).

В семействе бобовых (Fabaceae) в настоящее время полная нуклеотидная последовательность гена сахарозосинтазы *Sus1* известна только у люцерны (*Medicago truncatula*, триба Trifolieae; NC_016410.2) и гороха красножелтого (*P. fulvum*, триба Fabeae; KP219422–KP219424) (Дьяченко и др., 2015). Помимо полногеномной последовательности *Sus1 P. fulvum*, среди представителей трибы Fabeae в базе NCBI присутствуют только мРНК генов сахарозосинтаз *P. sativum* и *Vicia faba*. У вида *P. sativum* помимо гена *Sus1* (*PsSus1*) известны последовательности мРНК еще двух генов сахарозосинтаз – *Sus2* (*PsSus2*) и *Sus3* (*PsSus3*) (Barratt et al., 2001).

Целью настоящей работы стала идентификация и характеристика полноразмерной последовательности гена *Sus1* у образцов *P. sativum*, анализ экзон-интронной структуры гена, а также исследование внутривидового нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма *Sus1*.

Материалы и методы

Для изучения полиморфизма полноразмерных генов-гомологов *Sus1* у представителей рода *Pisum* и родственных видов трибы Fabeae выбрано 14 образцов *P. sativum* из коллекции Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) (г. Санкт-Петербург). Набор включал образцы различного географического происхождения, подвиды и разновидности (табл. 1). Семена проращивали в чашках Петри при комнатной температуре, затем проростки высаживали в теплицу с искусственным климатом.

Ядерную ДНК выделяли из свежих тканей молодых листьев с двойной депротеинизацией смесью фенол : хлороформ (Рыжова и др., 2013). Реакционная смесь для ПЦР-амплификации полноразмерных генов *Sus1* включала ~100 нг геномной ДНК, разработанные ранее праймеры 1F (5′-GAAGAATTTSAATGGCTACTG) и 4R (5′-MAAAGCCGGTTYCTYCATTTC) в конечной концентрации 10 мкМ и полимеразу LongAmp® Hot Start Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, США). Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле (Universal Agarose, PEQlab, Германия). ПЦР-фрагменты длиной ~4 т. п. н. очищали с помощью набора Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США). Клонирование фрагментов проводили с использованием набора pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, США). Первичные нуклеотидные последовательности фрагментов определяли на автоматическом секвенаторе ABI 310 Cappilary DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием разработанных праймеров:

1F 5′-GAAGAATTTSAATGGCTACTG;
1R 5′-AATAGAAGCTGAATGGACTCG;
2F 5′-CTGAAGAGTATCTARGCAC;
2R 5′-TCCAGTAAATATCAGATTCAGG;
3F 5′-CTTGAGAAGACTAAGTATCCT;
3R 5′-AAGAATTCGACTAGGAGATCA;
4F 5′-TTACCAACATTCGCAACACTCA;
4R 5′-MAAAGCCGGTTYCTYCATTTC,

которые позволяют амплифицировать как полноразмерный ген, так и его перекрывающиеся участки длиной до 1000 п. н., и реагентов ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) (АЦКП «Биоинженерия») (Дьяченко и др., 2015).

Полученные последовательности выравнивали и анализировали с помощью программы MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Для сравнительного анализа использовали ранее идентифицированные полные последовательности гена *Sus1 P. fulvum* (Дьяченко и др., 2015). Положение аминокислотных замен определяли относительно последовательности *Sus1 P. sativum*, взятой из GenBank NCBI (AJ012080). Границы консервативных доменов идентифицировали согласно данным, представленным в базе UniProt (Q9T0M9_PEA; http://www.uniprot.org/). Возможное влияние аминокислотных замен на структуру и функции белков оценивали с помощью программы PROVEAN (Choi et al., 2012). Структуру белков анализировали с использованием программы Phyre2 (Kelley et al., 2015) и визуализировали посредством Chimera-1.11.2 (http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/).

Результаты и обсуждение

Клонирование полноразмерных последовательностей генов-гомологов *Sus1* у представителей рода *Pisum*

Ранее были разработаны специфичные праймеры, позволяющие амплифицировать последовательности генов-гомологов *Sus1* у представителей рода *Pisum*, а также дифференцировать их от последовательностей *Sus2* (AJ001071) и *Sus3* (AJ311496) (Дьяченко и др., 2015). С использованием этих праймеров были амплифицированы, клонированы и секвенированы полноразмерные последовательности гена сахарозосинтазы *Sus1* у 14 образцов гороха посевного *P. sativum* различного географического происхождения.

Сравнительный анализ полученных последовательностей *Sus1 P. sativum* выявил их высокую гомологию (97–98 %) с ранее описанными последовательностями *Sus1 P. fulvum* (Дьяченко и др., 2015). Анализ экзон-инт-

Table 1. *Pisum* accessions analyzed and corresponding *Sus1* sequences

Accession/Species	VIR accession no.	Origin	NCBI accession no.	Gene length, bp	Intron III	Intron VII			Intron IX			Intron XII		Intron XIII
					GAAGCACAGATAT deletion	TTGTAAGTCATAGTT deletion	W deletion	C deletion	CATGAAC deletion	AGTTT insertion	TATCT deletion	ACCAA tandem repeat	TGGTTGTG deletion	TA insertion
P. sativum ssp. *transcaucasicum*	289	Russia	MG544306	3522							+			
P. sativum ssp. *asiaticum*	2827	Tajikistan	MG544307	3527										
P. sativum ssp. *abyssinicum*	2759	Ethiopia	MG544308	3531						+		+	+	+
P. sativum ssp. *syriacum* (=*humile*)	2521	Israel	MG544309	3514	+									
P. sativum ssp. *elatius*	3115	Italy	MG544310	3527										
P. sativum ssp. *sativum*	9190	Russia	MG544311	3527										
	6373	Mongolia	MG544312	3527										
	2587	Armenia	MG544313	3532						+				
	1982	Afghanistan	MG544314	3527										
	1937	Austria	MG544315	3527										
	7584	Ethiopia	MG544316	3527										
	8522	Russia	MG544317	3527										
	8599	Bhutan	MG544318	3527										
	5493	Iraq	MG544319	3527										
P. fulvum	702	Israel	KP219422	3494		+	+	+	+				+	
	706	»	KP219423	3501		+	+	+					+	
	2523	Palestine	KP219424	3506		+	+	+		+			+	

Note. Insertions/deletions were determined with reference to the majority of specimens.

ронной структуры показал, что все последовательности *Sus1 P. sativum* включали 13 экзонов и 12 интронов и по структуре относились к SUS1-группе двудольных растений (Harada et al., 2005). Надо отметить, что у генов данной группы первый экзон является нетранслируемым (Baud et al., 2004), в связи с чем нумерация экзонов в настоящей статье приводится с экзона II. Последовательности *Sus1* у образцов *P. sativum* и *P. fulvum* были вариабельны по длине (см. табл. 1): от 3514 до 3532 п. н. у *P. sativum* и от 3494 до 3506 п. н. у *P. fulvum*. Такие различия в протяженности гена сахарозосинтазы были обусловлены наличием инсерций и делеций в интронах (табл. 2). Последовательности же экзонов были инвариантны по длине. Выявлено три видоспецифичных инделя (см. табл. 1, выделены серым фоном). У образцов *P. sativum* протяженность интронных последовательностей гена сахарозосинтазы варьировала в пределах от 1093 до 1111 п. н., а наиболее полиморфным оказался интрон III (11.9 %), при этом уровень полиморфизма интронов IV и VII также превышал 10 %.

Изученные последовательности гена сахарозосинтазы характеризовались высоким уровнем полиморфизма. Все анализируемые последовательности гена сахарозосинтазы *P. sativum* содержали 125 вариабельных сайтов (3.5 %) и шесть инделей. Сравнительный анализ показал более низкий уровень вариабельности у образцов *P. fulvum*, в последовательностях *Sus1* которого было детектировано 63 SNP и общий уровень вариабельности не превышал 1.8 %. Как и ожидалось, экзоны *Sus1* были более консервативны по сравнению с интронами. У образцов *P. sativum* последовательности экзонов содержали 47 вариабельных сайтов, что составило 1.9 % (см. табл. 2). Интересно отметить, что наиболее вариабельным у представителей *P. sativum* оказался экзон II, в то время как у образцов *P. fulvum* – экзон VIII (см. табл. 2).

Более высокий уровень вариабельности *Sus1 P. sativum*, по сравнению с *P. fulvum*, может быть объяснен относительно более широкой географией отобранных образцов, отражающей естественный ареал *P. sativum*, тогда как естественный ареал *P. fulvum* намного уже и ограничен Ближним Востоком.

Значения внутривидового полиморфизма гена сахарозосинтазы *Sus1* у *P. sativum* сопоставимы со средним уровнем полиморфизма у других семейств растений. Так, значения внутривидовой вариабельности генов *Sus4* у видов сахарного тростника (*Saccharum*) не превышали 1.9 % (Zhang et al., 2013). У гексаплоидной мягкой пшеницы ген *Sus2* был идентифицирован на трех гомеологичных хромосомах, на двух из которых он был инвариантен (2A и 2D), в то время как на третьей (2B) – полиморфен (Jiang et al., 2011).

Table 2. Sucrose synthase *Sus1* coding sequences in *P. sativum* and *P. fulvum*

Exon (bp)	Exon polymorphism, % (number of variable sites)	
	P. sativum	*P. fulvum*
II (98)	5.10 (5)	1.02 (1)
III (127)	3.15 (4)	0.79 (1)
IV (152)	1.32 (2)	0.66 (1)
V (193)	1.04 (2)	1.04 (2)
VI (336)	3.57 (12)	1.19 (4)
VII (96)	1.04 (1)	0.0
VIII (174)	1.15 (2)	4.60 (8)
IX (117)	0.85 (1)	0.0
X (167)	2.40 (4)	0.0
XI (225)	0.44 (1)	1.33 (3)
XII (564)	2.13 (12)	2.48 (14)
XIII (139)	0.72 (1)	0.72 (1)
XIV (33)	0.0	0.0
All exons (2421)	1.94 (47)	1.45 (35)

Эволюция сахарозосинтазы *Sus1* и филогения рода *Pisum*

С целью определения особенностей эволюции гена сахарозосинтазы *Sus1* у видов бобовых была построена дендрограмма с использованием как проанализированных в данной работе кодирующих последовательностей этого гена, так и доступных в базе данных NCBI гомологичных последовательностей основных видов бобовых (рис. 1). На представленной дендрограмме гены сахарозосинтаз бобовых формируют три кластера, соответствующие генам *Sus1*, *Sus2* и *Sus3*. При этом исследуемые последовательности *Sus1* рода *Pisum* образуют единый кластер внутри другого более крупного кластера, соответствующего генам *Sus1* семейства Fabaceae. Сестринскую ветвь для *Sus1*-кластера образует ген *Sus3* рода *Pisum*. В отдельный кластер входят последовательности генов *Sus2* Fabaceae. Таким образом, в результате проведенного филогенетического анализа было показано, что у бобовых гены *Sus1* и *Sus3* эволюционно ближе друг к другу, чем к гену *Sus2*. Другой важный вывод заключается в том, что гены семейства сахарозосинтаз, вероятно, дивергировали раньше, чем произошло разделение бобовых на виды.

Вариабельность аминокислотных последовательностей Sus1 у представителей рода *Pisum*

Кодирующие последовательности сахарозосинтазы образцов *P. sativum*, а также ранее идентифицированные последовательности *P. fulvum* были транслированы, после чего проведен анализ их вариабельности с использованием в качестве референсной последовательности *P. sativum* Sus1 (AJ012080 GeneBank NCBI). Протяженность белка Sus1 у всех анализируемых образцов *P. sativum* и *P. fulvum* была одинакова и составила 806 а. к. Рассчитанные значения изоэлектрических точек белков сахарозосинтазы были практически одинаковыми – от 5.47 до 5.61 (табл. 3).

Из 74 обнаруженных в экзонах нуклеотидных замен 16 SNP приводили к замещениям аминокислотных остатков в белке, и вариабельность белка Sus1 у видов *Pisum* составила 1.98 %. Последовательности *P. sativum* отличались наличием видоспецифичных аминокислотных сайтов. Так, последовательности Sus1 у *P. sativum* содержат

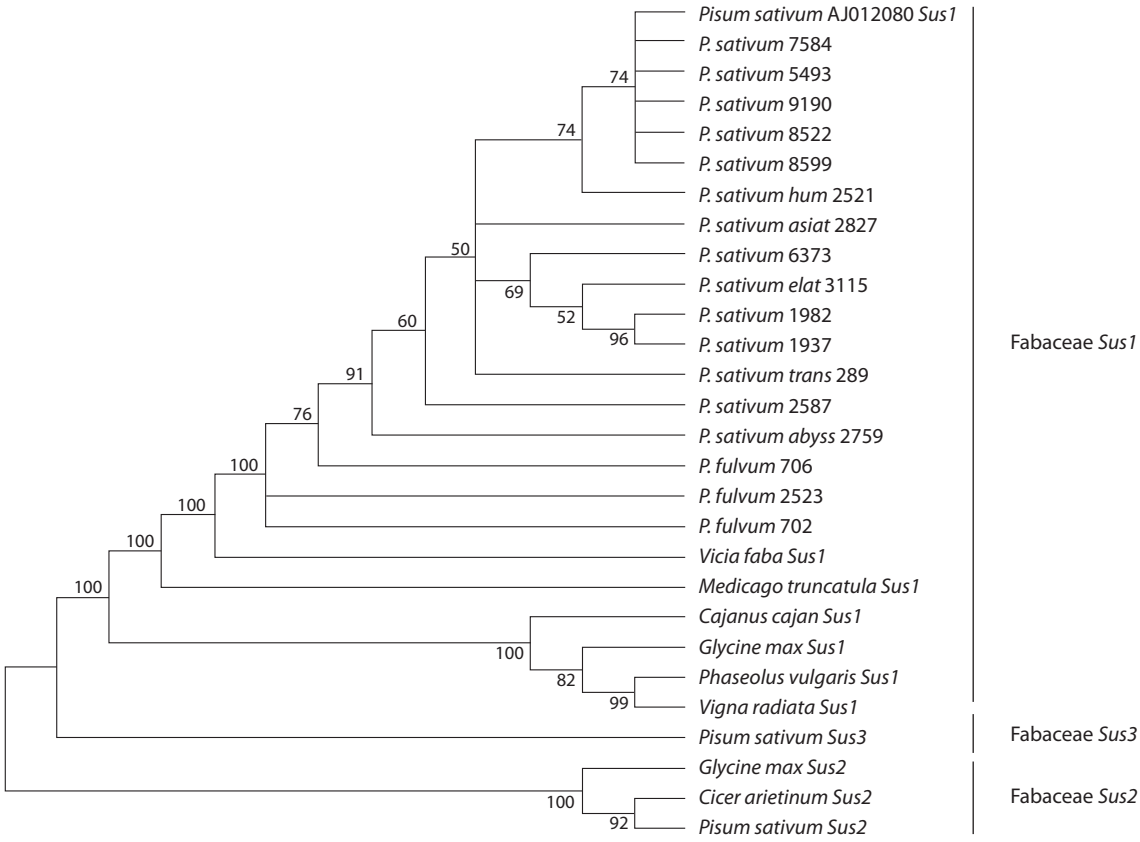


Fig. 1. The phylogenetic tree constructed in the comparison of coding sequences of legume sucrose synthase by the maximum likelihood method.

Table 3. Amino acid substitution sites found in sucrose synthase Sus1 sequences of *Pisum* accessions

Accession	Site no. in the protein																Isoelectric point
	17	19	25	63	117	231	234	376	462	547	570	577	609	630	701	795	
	Sucrose synthase domain										Glycosyl transferase domain						
AJ012080	D	T	N	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
P. sativum trans 289	D	T	N	T	**T**	F	I	K	Q	**D**	K	A	G	H	I	K	5.57
P. sativum asiat 2827	D	T	N	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	**V**	K	5.61
P. sativum abyss 2759	D	T	N	T	**T**	F	I	K	Q	E	K	**S**	G	H	I	K	5.57
P. sativum hum 2521	D	T	N	**I**	K	F	I	**E**	Q	E	K	A	G	H	**V**	**E**	5.47
P. sativum elat 3115	**E**	T	N	T	K	**C**	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
P. sativum 9190	**E**	T	N	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
P. sativum 6373	D	T	N	T	**T**	**C**	**S**	**E**	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.50
P. sativum 2587	D	T	N	T	**T**	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.57
P. sativum 1982	D	T	N	T	K	F	**S**	K	Q	**D**	**E**	**S**	**A**	H	I	**E**	5.47
P. sativum 1937	D	T	N	T	K	F	I	K	Q	**D**	**E**	**S**	**A**	H	I	**E**	5.47
P. sativum 7584	D	T	N	T	K	F	I	K	**P**	E	K	A	G	H	I	K	5.61
P. sativum 8522	D	T	N	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
P. sativum 8599	D	**N**	**S**	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
P. sativum 5493	D	T	N	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
P. fulvum 702	D	T	N	**I**	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	**L**	I	K	5.59
P. fulvum 706	D	T	N	**I**	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	**L**	I	K	5.59
P. fulvum 2523	D	T	N	**I**	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	**L**	I	K	5.59

Amino acid substitutions are shown in boldface; radical substitutions in amino acid residues are underlined.

треонин T_{63} и гистидин H_{630}, в то время как у образцов *P. fulvum* в аналогичных сайтах Sus1 находятся изолейцин I_{63} и лейцин L_{630}. При этом следует отметить, что у образца *P. sativum* ssp. *humile* 2521, в отличие от остальных образцов того же вида, вместо T_{63} присутствует I_{63}, подобно *P. fulvum*. Аминокислотные последовательности Sus1 образцов *P. sativum* 1982 и *P. sativum* 1937 были наиболее дивергированными (см. табл. 3).

В ходе анализа последовательностей Sus1 были идентифицированы два основных функционально значимых участка, кодирующих сахарозосинтазный (экзоны II–XI) и глюкозилтрансферазный (экзон XII) домены и консервативный сайт фосфорилирования – серин S_{11}, характерные для сахарозосинтаз растений (Silvente et al., 2003). Среди 16 выявленных замещений аминокислотных остатков десять были локализованы в сахарозосинтазном домене и шесть – в гликозилтрансферазном домене. Возможный структурно-функциональный эффект этих замен был проанализирован в программе PROVEAN с использованием в качестве референсной последовательности *P. sativum* Sus1 (AJ012080 GeneBank NCBI) (Choi et al., 2012) (см. табл. 3). Из 16 вариабельных сайтов потенциально значимыми были признаны шесть (F231C, I234S, Q462P, K570E, A577S и G609A), что составило 0.74 % (см. табл. 3). В последовательностях доменов были также выявлены консервативные трансмембранные мотивы FLDRIPMVFNVVILSPHGYFA (экзон VI) и FGLTVVEAMATGLPTFATLN (экзон XII), инвариантные у всех образцов.

Анализ третичной структуры Sus1

Белки Sus относятся к подсемейству GT-4 гликозилтрансфераз, входящему в состав более крупного суперсемейства металл-независимых GT-B гликозилтранфераз (Lairson et al., 2008).

При построении предполагаемой третичной структуры белка Sus1 с использованием программы Phyre2 в качестве референсной была использована известная кристаллическая структура белка сахарозосинтазы AtSus1 *Arabidopsis thaliana* (PDB: 3S29C) (Zheng et al., 2011), гомологичного Sus1 видов Fabaceae.

При моделировании трехмерной структуры Sus1 более 97 % последовательности было предсказано с достоверностью 100 % на основе известных структур белков гликозилтрансфераз растений суперсемейства GT-B (GT-4). Оставшиеся 24 аминокислотных остатка на N-конце (1–24) моделировались *ab initio*. Полученная структура была визуализирована и представлена в виде мономера на рис. 2.

Белок AtSus1 имеет структуру, типичную для сахарозосинтаз, и является тетрамером. В каждом мономере выделяют домены CTD (cellular targeting domain), EPBD (ENOD40, peptide-binding domain) и Rossmann-fold домен GT-B гликозилтрансферазы (Lairson et al., 2008). EPBD-домен особенно интересен в случае бобовых, так как он может связываться с белком нодулином ENOD40, который является гормон-подобным пептидом и вовлечен в формирование клубенька (Rohrig et al., 2002).

Предполагаемое пространственное строение Sus1 было сходно с описанным ранее для AtSus1 (Zheng et al., 2011) и представляло собой трехлопастную структуру с основными доменами сахарозосинтаз: CTD (9–125 а. о.), EPBD (155–274 а. о.), соединенными линкерной последовательностью (126–154 а. о.), и GT-B гликозилтрансферазой с Rossmann-fold доменом (225–774 а. о.). При этом были найдены некоторые различия, в основном в CTD-доменах AtSus1 и PsSus1. На С-конце EPBD-домена выявлены пять аминокислотных остатков (Leu182, Arg183, His185, Leu192 и Leu194), образующие сайт связывания с ионом K^+.

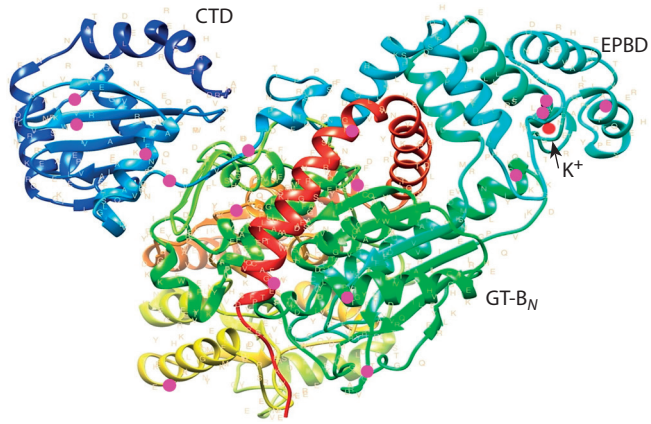


Fig. 2. Tertiary structure of the PsSus1 monomer.
Red dots indicate sites of amino acid substitutions.

Таким образом, в результате проведенного анализа впервые были получены и охарактеризованы полные нуклеотидные последовательности гена *Sus1* и соответствующие аминокислотные последовательности сахарозосинтазы у 14 образцов *P. sativum*. Идентифицированы и проанализированы все функционально значимые домены и их трансмембранные мотивы, характерные для сахарозосинтаз растений. Проведен сравнительный анализ нуклеотидной вариабельности последовательностей *Sus1* и аминокислотного полиморфизма соответствующих белков у *P. sativum* и *P. fulvum*.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-34-00981mol_a and by State Budgeted Project 0104-2014-0210 (State Registration No. 01201371086). Plants were grown in a phytotron. Sequencing was conducted at the Bioengineering Shared Access Center, Research Center for Biotechnology, Russian Academy of Sciences.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Barratt D.H.P., Barber L., Kruger N.J., Smith A.M., Wang T.L., Martin C. Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. Plant Physiol. 2001;127:655-664.

Baud S., Vaultier M.-N., Rochat C. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. J. Exp. Bot. 2004;55(396):397-409.

Choi M.-K., Le M.T., Nguyen D.T., Choi H., Kim W., Kim J.-H., Chun J., Hyeon J., Seo K., Park C. Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine β-*defensin* genes. BMC Genetics. 2012;13:98-107.

Dahl W.J., Foster L.M., Tyler R.T. Review on the health benefits of peas (*Pisum sativum* L). Br. J. Nutr. 2012;108:3-10.

Dyachenko E.A., Boris K.V., Kochieva E.Z. Identification and polymorphism of the sucrose synthase gene *Sus1* in *Pisum fulvum*. Molekulyarnaya biologia = Molecular Biology (Moscow). 2015;49(4):700-704. (in Russian)

Harada T., Satoh S., Yoshioka T., Ishizawa K. Expression of sucrose synthase genes involved in enhanced elongation of pondweed (Potamogeton distinctus) turions under anoxia. Ann. Botany. 2005;96: 683-692.

Horst I., Welham T., Kelly S., Kaneko T., Sato S., Tabata S., Parniske M., Wang T.L. Tilling mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. Plant Physiol. 2007;144:806-820.

Jiang Q., Hou J., Hao C., Wang L., Ge H., Dong Y., Zhang X. The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (*TaSus2*) active in endosperm development is associated with yield traits. Funct. Integr. Genomics. 2011;11:49-61.

Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat. Protoc. 2015;10(6):845-858.

Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 2016;33:1870-1874.

Lairson L.L., Henrissat B., Davies G.J., Withers S.G. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. Annu. Rev. Biochem. 2008;77:521-555.

Rohrig H., Schmidt J., Miklashevichs E., Schell J., John M. Soybean ENOD40 encodes two peptides that bind to sucrose synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002;99(4):1915-1920.

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):824-829. (in Russian)

Silvente S., Camas A., Lara M. Heterogeneity of sucrose synthase genes in bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for a nodule-enhanced sucrose synthase gene. J. Exp. Bot. 2003;54:749-755.

Zhang J., Arro J., Chen Y., Ming R. Haplotype analysis of sucrose synthase gene family in three *Saccharum* species. Genomics. 2013;14: 314. DOI 10.1186/1471-2164-14-314.

Zheng Y., Anderson S., Zhang Y., Garavito R.M. The structure of sucrose synthase-1 from *Arabidopsis thaliana* and its functional implications. J. Biol. Chem. 2011;286(41):36108-36118.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):115-121
DOI 10.18699/VJ18.330

Информационные ресурсы по коллекциям картофеля

Д.А. Афонников[1, 2] ✉, И.В. Тоцкий[1], З. Сташевски[3]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[3] ТатНИИСХ – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одной из важнейших продовольственных культур, преимущество которой заключается в способности давать высокий урожай в широком спектре агроэкосистем и высоком удельном производстве сухой массы пищевого продукта на единицу возделываемой площади. Все большее внимание картофелю уделяется как источнику не только углеводов, но и витаминов, минералов, пищевых волокон и других полезных веществ. Культурные сорта картофеля отличаются низким внутривидовым разнообразием, что уменьшает их потенциал для создания сортов с улучшенными свойствами. Дикие сородичи картофеля сохраняют высокую степень генетического разнообразия, которое может быть использовано для поиска нужных аллелей и их дальнейшего переноса в возделываемые сорта. С этой целью в мире идет интенсивное развитие, изучение и углубленная инвентаризация генетических ресурсов картофеля, содержащихся в генбанках, для чего активно используются компьютерные технологии. Настоящий обзор посвящен мировым информационным ресурсам в области картофелеводства. Представлено описание наиболее актуальных порталов и баз данных генетических ресурсов по картофелю. Анализ показывает, что основные базы данных по коллекциям картофеля сосредоточены в США и Европе. Web-порталы предоставляют большое количество разнообразных сведений, полезных как производителям и потребителям, так и селекционерам. На таких порталах идет интенсивная информационная поддержка новейших технологий в области картофелеводства и селекции. Интересным направлением является предоставление услуг по анализу образцов картофеля (семенного и иного материала) с помощью ДНК-маркеров для установления соответствия генотипа исследуемого материала генотипу заявленного сорта, а также вовлечение производителей картофеля в сетевой процесс оперативного мониторинга заболеваний и вредителей картофеля. Важную роль на современном этапе играет интеграция данных по коллекциям картофеля. В этом направлении развиваются европейские коллекции и базы данных. Однако несмотря на существование общеевропейской коллекции картофеля, продолжается поддержка национальных коллекций. Важной тенденцией в последнее время стало включение в описание образцов коллекции большого количества (свыше сотни) характеристик, для оценки которых в рамках зарубежных государственных селекционных программ ведется постоянное тестирование сортообразцов. В результате доступа к такой информации селекционер имеет возможность эффективного планирования эксперимента с целью направленной селекции по ключевым признакам растений. Эти тенденции подтверждают эффективность применения новейших технологий (в том числе информационных) в области поддержания и распространения генетических ресурсов картофеля.

Ключевые слова: картофель; генетические ресурсы; информационные порталы; базы данных; характеристики картофеля; Интернет.

Informational resources on potato germplasm collections

D.A. Afonnikov[1, 2] ✉, I.V. Totsky[1], Z. Stasevski[3]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] TatSRIA – Subdivision of FRC KazanSC of RAS, Kazan, Russia

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important food crops, the advantage of which is the ability to give a high yield in a wide range of agroecosystems, high specific production of dry weight per unit of cultivated area. Nowadays potato is considered a source of vitamins, minerals, dietary fiber and other nutrients. Potato cultivars are characterized by low genetic diversity, which reduces their potential to produce varieties with improved properties. Wild potato relatives retain a high degree of genetic diversity, which can be used to find the superior alleles and for their further transfer to cultural genotypes. To this end, there is an intense development of potato gene banks, with the help of the information technology to access the data. The present review is devoted to global information resources in potato. It describes the most relevant information portals and databases of genetic resources for potatoes. Analysis of information in the Internet shows that the main information resources on potato collections are concentrated in the United States and Europe. Information portals provide a wide variety of information useful to producers, consumers and breeders. On such portals, there is an intensive information support of the latest technologies in the field of potato growing and breeding. An interesting direction is the provision of services to determine the DNA prints (markers) of potato varieties, involvement of potato growers in the process of operational monitoring of diseases and pests of potatoes. Integration of data on potato collections plays an important role at the present stage. In line with this, European collections and databases are being developed. However, despite the existence of pan-European potato collection, national collections are still given support. An important collection-related trend in recent years has been inclusion of samples with a large number (more than a hundred) characteristics, which are evaluated by constantly testing varieties within the framework of foreign state breeding programs. As a result of access to such information, the breeder can effectively plan an experiment with the purpose of directed selection for key features of plants. These trends confirm the

Received 20.12.2017
Accepted for publication 09.02.2018
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: ada@bionet.nsc.ru

effectiveness of the use of the latest technologies (including information) in the maintenance and dissemination of potato genetic resources.

Key words: potato; genetic resources; informational portal; databases; potato traits; Internet.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Афонников Д.А., Тоцкий И.В., Сташевски З. Информационные ресурсы по коллекциям картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):115-121. DOI 10.18699/VJ18.330

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Afonnikov D.A., Totsky I.V., Stasevski Z. Informational resources on potato germplasm collections. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):115-121. DOI 10.18699/VJ18.330 (in Russian)

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) – одна из важнейших продовольственных культур, которая выращивается более чем в ста странах мира. По объемам производства данная культура занимает четвертое место в мире после кукурузы, пшеницы и риса (FAOSTAT, 2018). Ее преимущество заключается в способности давать высокий урожай в широком спектре агроэкосистем и в высоком удельном производстве сухой массы пищевого продукта на единицу возделываемой площади (Lutaladio, Castaldi, 2009; Devaux et al., 2014). Еще одним важным фактором, способствующим популярности культуры, в том числе в развитых странах, является все большее внимание к картофелю как источнику не только углеводов, но и витаминов, минералов, пищевых волокон (Ortiz, Mares, 2017), каротиноидов и флавоноидных пигментов антоцианов (Стрыгина, Хлесткина, 2017). Этим обусловливается постоянный интерес к исследованиям, направленным на улучшение пищевых характеристик картофеля, повышение устойчивости растений к биотическим и абиотическим факторам среды.

Культурные сорта картофеля отличаются низким генетическим разнообразием по сравнению с дикими сородичами (Hardigan et al., 2017). Этому способствовало множество факторов, включая снижение разнообразия культивируемых линий в результате эпифитотий фитофтороза в 1800-х гг., вирусные болезни, распространяющиеся в процессе размножения, увеличение генетического груза популяции как результата инбридинга, приводящего к сохранению вредных мутаций (Hirsch et al., 2013). Снижение генетического разнообразия по некоторым локусам в результате селекции характерно для многих сельскохозяйственных культур (Zhang et al., 2017). Это уменьшает их потенциал для создания сортов с улучшенными свойствами. Дикие сородичи современных сельскохозяйственных культур, напротив, сохраняют высокую степень генетического разнообразия, которое может быть использовано для поиска нужных аллелей и их дальнейшего переноса в возделываемые сорта (Гавриленко, Ермишин, 2017; Фадина и др., 2017). Большую роль в этой работе играют коллекции генетического материала картофеля (Киру, Рогозина, 2017; Machida-Hirano, Niino, 2017). Они интенсивно используются для выделения нового исходного материала в селекции на продуктивность, устойчивость к патогенам и вредителям (Зотеева, 2012; Костина, Косарева, 2015), позволяя осуществлять оценку степени проявления основных хозяйственно ценных признаков в конкретных условиях выращивания, выявлять лучшие образцы по отдельным признакам и формировать признаковую коллекцию источников для селекции картофеля (Красавин, Айтбаев, 2015). К генетическим коллекциям обращаются и при решении фундаментальных задач, таких как изучение происхождения и эволюции видов и сортов картофеля, уточнение его систематики (Hirsch et al., 2013; Spooner et al., 2014; Hardigan et al., 2017).

Как отмечено С.Д. Киру и Е.В. Рогозиной (2017), основной проблемой при работе с коллекциями являются трудности в подборе материала, возникающие из-за неполной оцифровки данных по коллекциям, неполноты описания образцов, отсутствия систем быстрого поиска данных. Одно из приоритетных направлений в этой связи – координированная инвентаризация коллекций генных банков. Поскольку современные коллекции содержат сотни тысяч образцов, их невозможно инвентаризировать без применения информационных технологий, обеспечивающих хранение данных в электронных каталогах и быстрый доступ к информации (Agrawal et al., 2012; Thormann et al., 2012).

Настоящий обзор посвящен мировым информационным ресурсам в области картофелеводства. В нем представлено описание наиболее актуальных информационных порталов и баз данных генетических ресурсов по картофелю.

Информационные порталы, посвященные картофелю

Информационные порталы в области картофеля содержат большое количество разнородной информации и гиперссылок, связанных с селекцией и производством картофеля. Список порталов по картофелеводству как в российском, так и в зарубежном сегментах сети Интернет приведен в табл. 1. Эти порталы могут служить первичными источниками специализированной информации, своеобразными «точками входа» на информационные ресурсы Интернета, связанные с картофелем. Далее кратко охарактеризуем перечисленные в табл. 1 информационные ресурсы.

В российском сегменте к числу таких сайтов можно отнести ресурс kartofel.org, который создан и поддерживается С.Н. Еланским. Собранная на сайте информация охватывает широкий круг вопросов, связанных с картофелеводством. Это полезные советы аграриям по агротехнологическим мероприятиям при выращивании картофеля и его защите от вредителей и заболеваний; каталог хозяйств, которые занимаются картофелеводством в России и зарегистрированы на сайте (126 хозяйств); ссылки на электронные версии книг и статей по картофелеводству, включая страницу электронного журнала «Защита картофеля»; описание кулинарных рецептов, а

Table 1. Media sites dedicated to potato

Resource	Targeted audience	Language	Internet address	Short reference
kartofel.org	Breeders, researchers, customers, and producers	Russian	http://kartofel.org	–
Potato Union	Producers and customers	»	http://www.welikepotato.ru/index/about/abouts	http://tiny.cc/ukqxqy
PGR potato portal	Breeders and researchers	English	https://www.pgrportal.nl/en/Potato-genetic-resources-Portal.htm	http://tiny.cc/jnjxqy
The Potato Association of America	Breeders and producers	»	http://potatoassociation.org/	–
The European Association for Potato Research	Breeders and researchers	»	https://www.eapr.net	–
AHDB Potato	Breeders, customers, and producers	»	https://potatoes.ahdb.org.uk	–
SASA Seed and Ware potatoes	»	»	https://www.sasa.gov.uk/seed-ware-potatoes	http://tiny.cc/ao8yqy
Solanaceae Source	Researchers and breeders	»	http://solanaceaesource.org/	–
SpudDB	»	»	http://solanaceae.plantbiology.msu.edu	http://tiny.cc/vucyqy

также калькулятор прогноза развития фитофтороза. На сайте размещен каталог сортов картофеля, включающий детальное описание характеристик растений: морфологические показатели (высота и форма растения, форма листьев, цвет цветков), характеристики клубней (форма и цвет кожуры и мякоти, глубина глазков), хозяйственно важные признаки (назначение, сроки созревания, вкусовые качества, содержание крахмала, урожайность, товарность, лежкость), устойчивость к заболеваниям по балльной шкале (к фитофторозу листьев и клубней, раку картофеля и нематоде, к вирусам картофеля), изображение клубней. Такие данные приведены для 425 сортов картофеля, а для 435 сортов дано краткое неформализованное описание сорта. Ресурс kartofel.org позволяет также размещать объявления о покупке и продаже продовольственного и семенного картофеля и техники.

Портал Картофельного союза в большей степени ориентирован на информацию о производителях картофеля в Российской Федерации. На портале сосредоточены нормативные документы союза, реестры семеноводческих хозяйств (157 организаций), производителей семенного материала (37 организаций), участников Картофельного союза (55 организаций), статистика участников рынка по регионам РФ, реестр семян на основе данных из Государственного реестра селекционных достижений. Представлены материалы публикаций и презентаций, связанных с деятельностью союза, имеется доска объявлений и страница новостного блога.

Среди зарубежных порталов к наиболее информативным относится PGR potato portal, который поддерживается сотрудниками Университета Вагенингена. Он включает три основных раздела. Первый, PGR material, представляет ссылки на сайты организаций, поддерживающих генетические ресурсы картофеля, включая академические (10 ресурсов), коммерческие (19 компаний из восьми стран Европы) и частные коллекции (2 представителя). В разделе Traits описываются ключевые характеристики картофеля, прежде всего заболевания, вредители, факторы стресса, а также особенности клубней и пищевые и агрономические характеристики. В разделе Other info содержится информация о происхождении картофеля, ссылки на описание характеристик различных сортов картофеля, культивируемых преимущественно в Европе.

Официальный сайт Американской картофельной ассоциации (PAA) содержит информацию о производстве, обработке и научных исследованиях в области картофелеводства США. На главной странице дана информация о текущих мероприятиях организации. Сайт предоставляет ссылки на большое количество ресурсов, в первую очередь в Северной Америке, доступна информация по 320 сортам картофеля.

Страница Европейской ассоциации исследования картофеля (EAPR) ориентирована на исследователей в области картофелеводства и включает пять разделов: агрономия и физиология; селекция и тестирование сортообразцов; патология и вредители; хранение и переработка; вирусология. На сайте расположена официальная информация о контактных лицах EAPR и текущих мероприятиях этой организации.

В Великобритании информация о картофелеводстве размещена на сайте Управления по делам сельского хозяйства и садоводства (the Agriculture and Horticulture Development Board – AHDB). Картофелю здесь посвящен специальный раздел, содержащий информацию о составе управления и его миссии, о производимых в Великобритании сортах картофеля. Портал содержит материалы по выращиванию картофеля и мониторингу заболеваний, информацию о рынке картофеля, новостную ленту, большое количество презентаций, научных и научно-популярных публикаций. На сайте есть также ссылка на базу данных сортов

картофеля AHDB potato variety database (http://varieties.ahdb.org.uk).

В Шотландии существует подразделение правительства по Науке и рекомендациям в сельском хозяйстве (Science and Advice for Scottish Agriculture – SASA), информационный портал которого включает раздел по картофелеводству. На этом сайте размещена различная официальная информация по сертифицированию и тестированию картофеля. SASA предоставляет также услуги по генотипированию образцов картофеля с помощью ДНК-маркеров.

Ресурс Solanaceae Source посвящен таксономической классификации пасленовых и содержит общую информацию о разнообразии представителей этого семейства, ссылки на литературные источники, внешние ресурсы. Описание таксонов, представленных на ресурсе, включает краткие сведения, ссылки на молекулярно-биологические базы данных NCBI (нуклеотидные, белковые, базы данных геномных вариаций, экспрессионные данные и др. – всего 24 внешних базы данных), изображения растений, литературные источники. База содержит 626 записей для представителей, относящихся к виду *Solanum tuberosum*, однако данные о коллекционных образцах немногочисленны (описано 20 образцов).

На сайте SpudDB (Hirsch et al., 2014) представлена информация о геномных данных по картофелю. Прежде всего, это браузер генома картофеля, визуализирующий структуру хромосом и генов, геномные вариации, локализацию маркеров и др. Ресурс обеспечивает поиск информации по генам картофеля на основе ключевых слов аннотации, идентификаторов последовательности или их сходства. Специальный раздел для селекционеров предоставляет утилиты по анализу данных геномных вариаций картофеля, полученных с помощью чипа SolCAP в популяции из 250 генотипов картофеля (Hirsch et al., 2013). На сайте также приведены ссылки на внешние информационные ресурсы по картофелю.

Базы данных генетических ресурсов картофеля

Генетические ресурсы картофеля часто являются частью генетических банков, содержащих коллекции растений разных видов (Reddy, 2017). Однако для описания генетических ресурсов картофеля создан и ряд специализированных баз данных, преимущество которых заключается в более полном и детальном описании характеристик образцов, что предпочтительнее для селекционеров и генетиков. Интернет-страницы этих ресурсов приведены в табл. 2. Ниже представлено их краткое описание.

В Российской Федерации официальным ресурсом по охраняемым селекционным достижениям и селекционным достижениям, допущенным к использованию на территории РФ, является сайт ФГБУ «Госсорткомиссия». Поисковая система сайта позволяет формулировать сложные запросы к базе данных реестра. На странице результата запроса выводится: код сорта, название, год включения в реестр, код региона доступа, оригинатор сорта/патентообладатель, краткая информация о характеристиках сорта (категория, направление использования, период потребления, срок созревания, тип растения, условия выращивания, форма). В реестр включены 422 сорта картофеля, допущенных к использованию. На странице о сорте приводится текстовое описание его характеристик. Информация о сортах из реестров находится в свободном доступе и может быть загружена отдельным файлом в формате PDF или Excel.

Крупнейшая коллекция растений в России находится во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Сведения об образцах доступны на сайте организации. База данных с описанием образцов содержит более 200 тыс. записей, из которых более 8 500 относятся к коллекции картофеля (Киру, Рогозина, 2017). Информация об образце в этой базе основана на рекомендациях Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO) и представлена в формате так называемых дескрипторов паспортных данных растений (Multi-crop passport descriptors – MCPD). Она включает таксономическое описание, плоидность, характеристики происхождения образца, жизненную форму и статус образца. Интерфейс базы данных позволяет производить поиск записей на основании текстовых запросов, в том числе и по идентификатору образца. По итогу запроса выдается таблица записей, содержащая краткие сведения об образце и гиперссылку для перехода на страницу с полной информацией для образца: Accession number (номер образца в коллекции ВИР), Collecting number (номер, присвоенный при сборе образца), Taxonomy (таксономия), Acquisition date (дата включения в коллекцию), Plant name (lat) (название растения на латыни), Plant name (rus) (название растения на русском языке), Collecting institute (институт, предоставивший образец в коллекцию), Breeding institute (селекционный институт, создавший образец), Donor country (страна, из которой получен материал), Donor institute (институт, предоставивший образец), Expedition (экспедиция), Country of origin (страна происхождения образца), Location of collection site (eng) (расположение места сбора (англ.)), Location of collection site (rus) (расположение места сбора (рус.)), Form of life (форма/тип развития), Biological status of accession (биологический статус образца), Type of germplasm storage (тип хранения зародышевой плазмы), Collection/acquisition source (источник сбора/приобретения), Introduction number (номер введения в коллекцию), Expedition number (экспедиционный номер/номер экспедиции), Other identification numbers (другие идентификационные номера), Donor accession number (номер образца донора), Latitude (широта), Longitude (долгота), Elevation (высота над уровнем моря), Location of safety duplicates (расположение дубликатов для безопасного хранения), Ancestral data (eng) (данные о предках на английском), Ancestral data (rus) (данные о предках на русском), Доступность, Владелец, Remarks (примечания).

На сайте Сетевой коллекции сортов и гибридов картофеля представлена информация о сортах и гибридах, которые исследуются в рамках Комплексного плана научных исследований ФАНО «Развитие селекции и семеноводства картофеля». Для описания свойств картофеля используются 33 дескриптора, сгруппированных в несколько групп: общая информация (оригинаторы, сведения о регистрации в реестре ФГБУ «Госсорткомиссия»), потребительские свойства, характеристики растения, характеристики клуб-

Table 2. Data resources on potato collections

Resource	Number of potato accessions as of December 2017	Internet address	Short reference
State Register of Breeding Achievements	Recommended for use: 422. Protected: 710	http://reestr.gossort.com/	–
Vavilov Institute of Plant Industry	8500	http://91.151.189.38/virdb/	–
Network collection of potato varieties and hybrids	60	http://potatoes.biores.cytogen.ru/	–
U.S. National Plant Germplasm System	6647	https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx?	http://tiny.cc/5tkxqy
GENESYS Potato	19858	https://www.genesys-pgr.org/ru/c/potato	http://tiny.cc/fid2qy
U.S. Potato Genebank	5966	https://www.ars-grin.gov/nr6/index.html	http://tiny.cc/02sxqy
The European Cultivated Potato Database	5924	http://www.europotato.org	–
European Wild Potato Database	10323	http://ecpgr.cgn.wur.nl/eupotato/	http://tiny.cc/ovjxqy
Commonwealth Potato Collection	1515	https://ics.hutton.ac.uk/germinate-cpc/	http://tiny.cc/u7jxqy
CGN potato collection	1470	https://www.wur.nl/en/Expertise-Services/Statutory-research-tasks/Centre-for-Genetic-Resources-the-Netherlands-1/Expertise-areas/Plant-Genetic-Resources/CGN-crop-collections/Potato.htm	http://tiny.cc/lakxqy
IPK wild and cultivated potato species	6100	http://www.ipk-gatersleben.de/en/genebank/satellite-collections-north/gross-luesewitz-potato-collections	http://tiny.cc/d3pxqy
CIP Genebank	4727	https://cipotato.org/genebankcip/	http://tiny.cc/knkxqy
AHDB potato variety database	323	http://varieties.ahdb.org.uk	–

ней, характеристика клубнеобразования, устойчивость к грибным заболеваниям, устойчивость к вирусным заболеваниям, устойчивость к вредителям. В базе данных таким образом описаны 60 генотипов картофеля.

В США генетические ресурсы растений представлены на сайте Системы Национальных генетических ресурсов растений (Germplasm Resources and Information Network – GRIN) (Mowder, Stoner, 1989). Коллекция насчитывает свыше 580 тыс. образцов, четверть из которых приходится на коллекцию семян. База данных содержит информацию о более чем 6600 образцов картофеля, большинство из которых (около 6000) представлены в генетическом банке картофеля. Необходимо отметить, что описание характеристик картофеля в БД GRIN является достаточно подробным и включает 138 дескрипторов (https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/cropdetail.aspx?type=descriptor&id=73), которые распределены на несколько категорий: характеристики химического состава, цитологические характеристики, генетические фонды, характеристики роста, устойчивость к фитопатогенам, устойчивость к насекомым-вредителям и нематоде, характеристики молекулярные, морфологические, физиологические, ответа на стресс, характеристики корневой системы и клубней. Система поиска в базе позволяет осуществлять сложные запросы, отбирая генотипы со специфическим фенотипом растений.

Данные по генетическим ресурсам картофеля представлены среди прочих видов также на портале GENESYS (www.genesys-pgr.org). Это масштабный проект по инвентаризации биоресурсных коллекций сельскохозяйственных растений. В базе данных перечислено около 20 тыс. образцов картофеля, из которых примерно 19 % составляют местные сорта, 24 % – дикие виды картофеля. Образцы описаны по 97 характеристикам, включая морфологические характеристики растений, устойчивость к фитопатогенам, устойчивость к вредителям. Преимущество базы заключается в том, что она интегрирует информацию из целого ряда коллекций в разных странах. Крупнейшие коллекции находятся в распоряжении Института Лейбница по исследованию генетики растений и сельскохозяйственных культур (IPK), Картофельного генофонда США и Международного центра картофеля (CIP).

Европейская база данных культивируемого картофеля (European Cultivated Potato Database – ECPD) содержит сведения о почти 6000 сортов картофеля и является результатом взаимодействия ученых и селекционеров из восьми стран Евросоюза и пяти стран Восточной Европы. Описание сортов включает 148 характеристик (http://www.europotato.org/characters), сгруппированных в несколько основных разделов: характеристики морфологии органов растений, устойчивости к стрессовым факторам среды, устойчивости к заболеваниям, вредителям и др. Коллек-

ция описывает образцы из 49 стран, 593 селекционеров, 15 компаний и организаций. Поисковая система позволяет формировать сложные запросы так, чтобы отбирать сорта с нужными характеристиками.

Информация о дикорастущих представителях картофеля содержится в Европейской базе данных дикорастущего картофеля (European Wild Potato Database – EWPD), в которую вошло более 10 тыс. образцов. Сведения представлены в виде файлов в форматах БД Access или таблицы Excel. Описание образца включает 89 дескрипторов, из которых большая часть характеризует паспортные данные образца, а также устойчивость к заболеваниям (вирусным, грибным и бактериальным патогенам), вредителям (нематоде, тле, колорадскому жуку), химический состав клубней, устойчивость к стрессовым факторам окружающей среды. Интерфейс поиска для этой базы на сайте отсутствует.

База данных коллекции картофеля Британского Содружества включает свыше 1500 образцов 95 таксономических групп картофеля, из которых более 45 % приходится на *S. tuberosum*. Формат описания основан на рекомендациях Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO) (Multi-Crop Passport Descriptors – MCPD; http://tiny.cc/q9nyqy). Однако база данных содержит 32 дополнительные характеристики фенотипа образца, в том числе параметры устойчивости к заболеваниям, стрессовым факторам среды и ряд других. Для некоторых образцов имеются изображения. Интерфейс системы реализован на платформе Germinate 3 (Shaw et al., 2017), созданной для описаний генетических коллекций растений, и позволяет выполнять запросы за счет фильтрации образцов по значениям полей базы данных, сохраняя результат поиска в текстовом формате.

Центр генетических ресурсов Нидерландов (Centre for Genetic Resources, the Netherlands – CGN) Университета Вагенингена поддерживает коллекцию картофеля, включающую более 1400 образцов 107 диких видов и 120 образцов 4 примитивных видов картофеля из двенадцати стран Южной и Северной Америки. В базе данных коллекции содержатся паспортные характеристики картофеля (таксономия, происхождение и статус образца), а также дополнительно 23 характеристики устойчивости к вредителям (нематоде), бактериальным, вирусным и грибным заболеваниям, характеристики клубней. Информация о некоторых образцах сопровождается изображениями растений. Поисковая система (https://cgngenis.wur.nl/ZoekGewas.aspx?ID=rg5qu5cx&Cropnumber=41; короткая ссылка http://tiny.cc/217yqy) позволяет производить сложные запросы к базе данных. Интерфейс предусматривает заказ образцов через Интернет.

Коллекция картофеля (The Gross Luesewitz Potato Collections) Института Лейбница по исследованию генетики растений и сельскохозяйственных культур (The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, IPK) состоит из более чем 5400 образцов, в том числе свыше 2750 сортов культурного картофеля, 550 образцов генотипов картофеля из районов Анд и почти 130 образцов дикого картофеля из Северной и Южной Америки. Описание образцов включает паспортные характеристики (рекомендованные FAO). Поисковая система (короткая ссылка http://tiny.cc/tgb3qy) позволяет отбирать записи на основе комбинированного запроса. Возможен также полнотекстовый поиск записей. Полученную в результате запроса информацию можно сохранить либо в формате CSV (данные, разделенные запятыми), либо в формате системы управления базами данных dBase (DBF).

Генбанк Международного центра картофеля (International Potato Center – CIP) поддерживает клубневые и семенные коллекции картофеля, сладкого картофеля, батата и клубненосных видов из регионов Анд (Andean roots and tubers – ARTC's). Коллекция картофеля насчитывает свыше 4700 образцов, включая 4354 сорта традиционных ландрас из семнадцати стран (преимущественно региона Анд) и сорта, полученные в результате селекции. В базе данных описаны паспортные характеристики образца, морфология растения, характеристика состава клубней, устойчивость к заболеваниям и вредителям, особенности хранения коллекционного материала. Интерфейс пользователя позволяет выполнить заказ материала (для этого необходима регистрация на сайте).

В коллекцию сортов картофеля Великобритании (AHDB potato variety database) входят 323 сорта, которые были представлены 17 организациями и 47 индивидуальными селекционерами. Описание сортов в базе данных включает ботанические характеристики, свойства клубней и устойчивости к болезням и вредителям (всего 21 характеристика, описываются преимущественно в виде шкал от 1 до 9). Удобство интерфейса заключается в возможности графического вывода характеристик сортов и сравнения сортов между собой по этим характеристикам.

Заключение

Анализ информации в сети Интернет показывает, что основные ресурсы по коллекциям картофеля сосредоточены в США и Европе. Порталы предоставляют большое количество сведений, полезных как производителям и потребителям, так и селекционерам. На таких порталах идет интенсивная поддержка новейших технологий в области картофелеводства и селекции. Интересным направлением является предоставление услуг по анализу образцов картофеля (семенного и иного материала) с помощью ДНК-маркеров для установления соответствия генотипа исследуемого материала генотипу заявленного сорта, а также вовлечение производителей картофеля в сетевой процесс оперативного мониторинга заболеваний и вредителей картофеля.

Важную роль на современном этапе играет интеграция данных по коллекциям картофеля. В этом направлении развиваются европейские коллекции. Однако несмотря на наличие общеевропейской коллекции картофеля, поддержка национальных коллекций продолжает осуществляться. Заметной тенденцией в последнее время стало включение в описание образцов коллекции большого количества (более ста) характеристик, для оценки которых в рамках зарубежных государственных селекционных программ ведется постоянное тестирование сортообразцов. В результате доступа к такой информации селекционер имеет возможность эффективного планирования эксперимента с целью направленной селекции по ключевым признакам растений. Эти тенденции подтверждают

эффективность использования новейших технологий (в том числе компьютерных) в области поддержания и распространения генетических ресурсов картофеля.

Acknowledgments

This paper is prepared as part of State Budgeted Project 0745-2017-0003 “Inventory and development of the potato bioresource collection for basic studies, control of breeding programs, and raise of novel plant genotypes with high commercial value and resistance to biotic and abiotic stress factors”.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Agrawal R.C., Archak S., Tyagi R.K. An overview of biodiversity informatics with special reference to plant genetic resources. Comp. Electron. Agricult. 2012;84:92-99. DOI 10.1016/j.compag.2011.12.003.

Devaux A., Kromann P., Ortiz O. Potatoes for sustainable global food security. Potato Res. 2014;57(3-4):185-199. DOI 10.1007/s11540-014-9265-1.

Fadina O.A., Beketova M.P., Sokolova E.A., Kuznetsova M.A., Smetanina T.I., Rogozina E.V., Khavkin E.E. Anticipatory breeding: molecular markers as a tool in developing donors of potato (*Solanum tuberosum* L.) late blight resistance from complex interspecific hybrids. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017;52(11):84-94. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.84rus. (in Russian

FAOSTAT. 2018. Available at http://www.fao.org/faostat/en/#home.

Gavrilenko T.A., Yermishin A.P. Interspecific hybridization of potato: theoretical and applied aspects. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):16-29. DOI 10.18699/VJ17.2. (in Russian)

Hardigan M.A., Laimbeer F.P.E., Newton L., Crisovan E., Hamilton J.P., Vaillancourt B., Wiegert-Riningera K., Wooda J.C., Douchesc D.S., Farréa E.M., Veilleux R.E., Buell C.R. Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017;114(46):E9999-E10008. DOI 10.1073/pnas.1714380114.

Hirsch C.D., Hamilton J.P., Childs K.L., Cepela J., Crisovan E., Vaillancourt B., Hirsch C.N., Habermann M., Neal B., Buell C.R. Spud DB: A resource for mining sequences, genotypes, and phenotypes to accelerate potato breeding. Plant Genome. 2014;7:1. DOI 10.3835/plantgenome2013.12.0042.

Hirsch C.N., Hirsch C.D., Felcher K., Coombs J., Zarka D., Van Deynze A., De Jong W., Veilleux R.E., Jansky S., Bethke P., Douches D.S., Buell C.R. Retrospective view of North American potato (*Solanum tuberosum* L.) breeding in the 20th and 21st centuries. G3: Genes Genom. Genet. 2013;3:1003-1013. DOI 10.1534/g3.113.005595.

Kiru S.D., Rogozina E.V. Mobilization, conservation and study of cultivated and wild potato genetic resources. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):7-15. DOI 10.18699/VJ17.219. (in Russian)

Kostina L.I., Kosareva O.S. Potato varieties promising for breeding targeted at commercial traits. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2015;176(1):59-67. (in Russian)

Krasavin V.F., Aitbaev T.E. Potato genetic resources and their use in breeding in Kazakhstan. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2015;176(1):79-83. (in Russian)

Lutaladio N., Castaldi L. Potato: The hidden treasure. J. Food Comp. Analysis. 2009;22(6):491-493. DOI 10.1016/j.jfca.2009.05.002.

Machida-Hirano R., Niino T. Potato Genetic Resources. In: Kumar Chakrabarti S., Xie C., Kumar Tiwari J. (Eds.) The Potato Genome. Compendium of Plant Genomes. Springer, 2017;11-30. DOI 10.1007/978-3-319-66135-3_2.

Mowder J.D., Stoner A.K. Plant germplasm information systems. In: Knutson L.V., Stoner A.K. (Eds.) Biotic Diversity and Germplasm Preservation, Global Imperatives. Kluw. Acad. Publ., 1989;13. DOI 10.1007/978-94-009-2333-1_21.

Ortiz O., Mares V. The historical, social, and economic importance of the potato crop. In: Kumar Chakrabarti S., Xie C., Kumar Tiwari J. (Eds.) The Potato Genome. Compendium of Plant Genomes. Springer, 2017;1-10. DOI 10.1007/978-3-319-66135-3_2.

Reddy D.E. Emerging trends in seedbanking for food and agriculture: an international perspective. J. Agric. Food Inform. 2017;18(2):145-160. DOI 10.1080/10496505.2017.1289092.

Shaw P.D., Raubach S., Hearne S.J., Dreher K., Bryan G., McKenzie G., Milne I., Stephen G., Marshall D.F. Germinate 3: development of a common platform to support the distribution of experimental data on crop wild relatives. Crop Sci. 2017:57(3):1259-1273. DOI 10.2135/cropsci2016.09.0814.

Spooner D.M., Ghislain M., Simon R., Jansky S.H., Gavrilenko T. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. Bot. Rev. 2014;80(4):283-383. DOI 10.1007/s12229-014-9146-y.

Strygina K.V., Khlestkina E.K. Anthocyanins synthesis in potato (*Solanum tuberosum* L.): genetic markers for smart breeding. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017;52(1):37-49. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.37rus. (in Russian)

Thormann I., Gaisberger H., Mattei F., Snook L., Arnaud E. Digitization and online availability of original collecting mission data to improve data quality and enhance the conservation and use of plant genetic resources. Genet. Resour. Crop Evol. 2012;59(5):635-644.

Zhang H., Mittal N., Leamy L.J., Barazani O., Song B.H. Back into the wild – Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. Evol. Appl. 2017;10(1):5-24. DOI 10.1111/eva.12434.

Zoteeva N.M. Assessment of divers potato germplasm maintained in VIR collection for resistance to late blight. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2012;170(1):178-186. (in Russian)

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):122-131
DOI 10.18699/VJ18.339

Предсказание методами системной биологии наиболее перспективных генов-мишеней для селекции на устойчивость к окислительному стрессу C_3 и C_4 культурных злаков

А.В. Дорошков[1, 2] ✉, А.В. Бобровских[1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Активные формы кислорода (АФК) – один из ключевых повреждающих факторов для живых организмов. АФК производятся в реакциях нормального метаболизма, в стрессовых условиях их выработка повышается. Улучшение характеристик ферментативной системы антиоксидантной защиты культурных растений позволит повысить их устойчивость к абиотическим стрессам, таким как засоленность, засуха и холод. Однако компоненты системы вырождены – каждая реакция катализируется серией ферментов, кодируемых разными генами. Выбор наиболее важных компонентов позволит ускорить нахождение оптимальной селекционной стратегии для улучшения свойств всей системы у хозяйственно ценных видов растений. В настоящей работе впервые проведен системно-биологический анализ особенностей молекулярной эволюции и характеристик экспрессии генов, принадлежащих к четырем функциональным группам ферментов антиоксидантной защиты (APX, GPX, SOD и CAT), у шести представителей C_3 и трех представителей C_4 злаковых растений. Выделены и проанализированы 25 ортологических групп генов. Выявлены шесть ортологических групп с наиболее высоким уровнем экспрессии и наибольшим давлением стабилизирующего отбора для дальнейшей верификации и использования в селекции. Эти шесть ортологических групп, предположительно, вносят больший вклад в функционирование антиоксидантной системы изученных C_3 и C_4 злаковых растений. Показано, что интеграция эволюционных характеристик и экспрессионных данных представляет перспективный подход к предсказанию важных для селекции генов в геномах хозяйственно ценных растений.

Ключевые слова: активные формы кислорода; антиоксидантная система; отношение K_a/K_s; уровень экспрессии; гены-кандидаты.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Дорошков А.В., Бобровских А.В. Предсказание методами системной биологии наиболее перспективных генов-мишеней для селекции на устойчивость к окислительному стрессу C_3 и C_4 культурных злаков. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):122-131. DOI 10.18699/VJ18.339

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Doroshkov A.V., Bobrovskikh A.V. Using the methods of systems biology for predicting perspective target genes to select C_3 and C_4 cereals for oxidative stress resistance. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):122-131. DOI 10.18699/VJ18.339 (in Russian)

Received 05.10.2017
Accepted for publication 24.11.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: ad@bionet.nsc.ru

Using the methods of systems biology for predicting perspective target genes to select C_3 and C_4 cereals for oxidative stress resistance

A.V. Doroshkov[1, 2] ✉, A.V. Bobrovskikh[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Reactive oxygen species (ROS) are some of the most damaging factors for living systems. Cells produce ROS during normal metabolism reactions, but ROS production increases under stressful conditions. Improving the antioxidant system in cultivated plants will increase their tolerance to abiotic stresses, such as salinity, drought and cold. However, the biochemical components of the system are redundant, for each reaction is catalyzed by a series of enzymes encoded by different genes. Choosing the most perspective components of this system will help speed up evaluating the optimal breeding strategy for improving abiotic stress tolerance in economically valuable plants. In the present research article, we present the results of an integrative analysis of evolution- and expression-related characteristics. The work was carried out on a series of genes that belong to 4 functional groups (APX, GPX, SOD and CAT) of enzymatic components of the antioxidant defense system in six species of C_3 cereal plants and 3 species of C_4 cereal plants. As a result, 25 groups of orthologous genes were evaluated and described. The highest gene expression level and the greatest pressure of purifying selection were found to characterize six groups. These genes were chosen for further verification and use in breeding. Because these genes undergo the most conservative evolution and have the highest level of mRNA expression, we may assume that they contribute a lot to the antioxidant system functioning of the C_3 and C_4 cereal plants studied. We have shown that the integration of evolutionary characteristics and expression data represents a promising approach to predict target genes for plant breeding.

Key words: reactive oxygen species; antioxidant system; K_a/K_s ratio; expression level; candidate genes.

Набор современных методов генетики и селекции позволяет эффективно улучшать хозяйственно ценные качества культурных растений, особенно в части признаков, зависящих от одного-двух генов «главного эффекта». Одновременно с этим селекция растений в условиях постоянно растущей потребности в пищевых ресурсах вынуждает использовать все возможности улучшения пищевых культур в комплексе. Расширение спектра используемых генов и целостное понимание функционирования сложных биологических подсистем, ассоциированных с признаками, будут способствовать более эффективной селекции.

Важное направление селекции растений – повышение их устойчивости к стрессовым факторам среды. Существенным поражающим фактором во время стресса являются активные формы кислорода (АФК). В нормальном метаболизме растений существует множество источников АФК – реакции фотосинтеза, дыхания, окисления различных субстратов. Опасность АФК состоит в инициации каскадных реакций, которые усиливают продукцию гидроксилов и липидных пероксидов, возникающих в мембранах клетки (Noctor, Foyer, 1998). Повреждение компонентов клетки под действием АФК называется окислительным стрессом. Установлено, что патогены, ранения или неблагоприятные условия окружающей среды приводят к многократному увеличению производства АФК с участием NAD(P)H-оксидаз (Hammond-Kosack, Jones, 1996; Orozco-Cardenas, Ryan, 1999; Gill, Tuteja, 2010; Das, Roychoudhury, 2014).

К числу наиболее важных поставщиков АФК у растений относятся реакции фотосинтеза. Известно, что некоторые культурные злаки, такие как кукуруза, отличаются особой формой фотосинтеза – C_4, первичным продуктом которого является не 3-фосфоглицериновая кислота, а щавелевоуксусная (Hatch et al., 1987, 2005). Этот путь более эффективный, однако требует большей инсоляции, что само по себе усиливает выработку АФК. Вместе с тем для C_4 пути практически не характерно фотодыхание (Ehleringer et al., 1991; Sage et al., 2012), а связанное с ним окисление гликолевой кислоты в пероксисомах служит основным источником токсичного пероксида водорода в фотосинтезирующей растительной клетке (Sage et al., 2012).

Для борьбы с окислительным стрессом живые организмы в процессе эволюции развили специальную систему ферментов антиоксидантной защиты. Оценочное время появления первых ферментов антиоксидантной защиты в процессе эволюции соответствует появлению фотосинтеза – примерно 2.4 млрд лет назад (Hohmann-Marriott, Blankenship, 2011). У современных растений присутствует множество ферментов антиоксидантной защиты, находящихся в тесных взаимодействиях (Gill, Tuteja, 2010). Основные пути нейтрализации АФК в растительной клетке представлены на рис. 1.

В процессе метаболизма клетки и воздействия стрессовых факторов накапливаются побочные продукты – частично восстановленные формы атмосферного кислорода: синглетный кислород, супероксидный радикал (см. рис. 1), пероксид водорода, гидроксильный радикал и др. Далее они преобразуются супероксиддисмутазой (SOD) в пероксиды, которые в дальнейшем расщепляются каталазой (CAT), глутатионпероксидазой (GPX) либо вовлекаются аскорбатпероксидазой (APX) в аскорбат-глутатионовый цикл (см. рис. 1). Дополнительные акцепторы электронов для упрощения на схеме не приведены.

Активность антиоксидантной системы увеличивает устойчивость растений к высоким температурам (Wang et al., 2014), засоленности (Gill et al., 2013; Khaliq et al., 2015) и другим стрессам (Osipova et al., 2016). Следует отметить, что каждый фермент системы антиоксидантной защиты представлен в геноме растений в нескольких копиях. Например, в геноме *Arabidopsis thaliana* присутствует не менее 25 генов ферментов только этих четырех классов (SOD, CAT, GPX, APX) (Mittler et al., 2004). В связи с многокопийностью генов возникает дополнительная сложность в использовании маркер-опосредованой селекции растений на устойчивость к окислительному стрессу.

Перспективным решением является использование огромного массива геномных данных, накопленных как для модельных, так и для хозяйственно ценных растений. Прежде всего, это геномные последовательности и различные полногеномные экспрессионные эксперименты. Используя эту информацию, становится возможным проанализировать молекулярную эволюцию, выявить ортологические группы генов для серии видов, сопоставить характеристики накопления замен для каждой отдельной копии гена каждого фермента, а также соотнести их уровни экспрессии. Неоднородность относительных скоростей накопления замен в серии копий свидетельствует в пользу различного давления стабилизирующего отбора и позволяет выявить более эволюционно консервативные копии, которые, как правило, являются наиболее функционально важными (Zhang, 2003). Вместе с тем различный уровень экспрессии однородных генов (например, кодирующих ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию) также свидетельствует в пользу неодинаковой функциональной нагрузки: чем выше уровень экспрессии, тем потенциально более высокий вклад вносит соответствующая копия (Li et al., 2005).

Культурные злаки тоже различаются по биохимии фотосинтеза. Такие виды, как пшеница (*Triticum aestivum*), рис (*Oryza sativa*) и ячмень (*Hordeum vulgare*), имеют C_3 фотосинтез, тогда как кукурузу (*Zea mays*) и сорго (*Sorghum bicolor*) отличает C_4 фотосинтез (Карпилов, 1960; Sage et al., 2012). Потенциально C_4 фотосинтез снижает нагрузку на ферменты антиоксидантной системы, утилизирующие пероксид (APX, SOD, CAT), поэтому относительные уровни экспрессии компонентов антиоксидантной системы также могут различаться между видами.

В настоящей работе применен системный подход для поиска и предсказания генов-мишеней, ассоциированных с устойчивостью к окислительному стрессу, основанный на привлечении эволюционных характеристик генов и уровней экспрессии их мРНК у C_3 и C_4 культурных злаков. В связи с различиями в биохимии фотосинтеза нами изучены полногеномные экспрессионные данные для растений обоими типами фотосинтеза. Полученные данные позволяют выявить наиболее консервативные и наиболее высокоэкспрессирующиеся копии генов-ферментов антиоксидантной защиты у девяти видов злаков (*Triticum aestivum*, *T. urartu*, *Aegilops tauschii*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*,

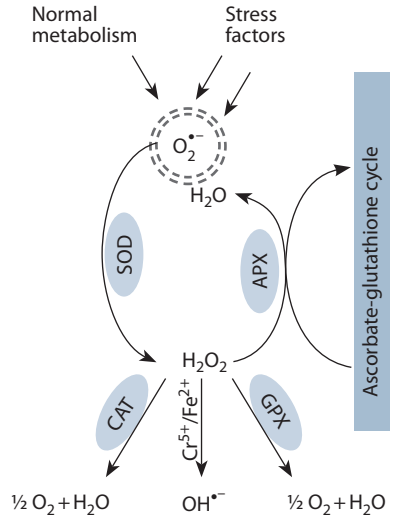


Fig. 1. Main pathways of ROS neutralization
See text for details.

Brachypodium distachyon, *Sorghum bicolor*, *Setaria italica*, *Oryza sativa* ssp. *japonica*) с целью дальнейшего использования их в селекции.

Материал и методы

Выборка видов. Для анализа особенностей эволюции генов антиоксидантной системы у C_3 и C_4 культурных злаков была сформирована следующая выборка видов растений:

- C_4 злаки: *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Setaria italica*;
- C_3 злаки: *Oryza sativa* ssp. *japonica*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *T. urartu*, *Aegilops tauschii*;
- внешняя группа 1 (двудольные растения): *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*;
- внешняя группа 2 (одноклеточная зеленая водоросль): *Chlamydomonas reinhardtii*.

Такая выборка позволила изучить характер событий дупликации у представителей злаковых растений и ряда видов двудольных растений.

Поиск гомологов генов. Для поиска ДНК и белковых последовательностей в геномах и протеомах растительных организмов была использована база данных PLAZA 3.0, а для *T. aestivum*, *T. urartu*, *Ae. tauschii* – дополнительно ENSEMBL PLANTS (http://plants.ensembl.org). Поиск по базам данных выполнялся алгоритмом Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Altschul et al., 1990). На первом этапе для каждого исследуемого гена производили реципрокный поиск гомологов в базе данных с пороговым значением $E_{value} = 10^{-7}$. При поиске в PLAZA учитывали также ее встроенную автоматическую привязку к гомологичным группам. Исходя из выравнивания, выбирали такие белки, которые содержали в себе не менее половины последовательности целевого белка. Такие белки считали гомологами исходного белка.

Множественное выравнивание и филогенетический анализ. Анализ молекулярной эволюции проводили при помощи пакета программ SAMEM v. 0.82 (Gunbin et al., 2012). Исходная выборка гомологичных последовательностей подвергалась множественному выравниванию последовательностей алгоритмом Mafft 6.717 (Katoh, Toh, 2008) с использованием матрицы BLOSUM 62 (Henikoff S., Henikoff J., 1992). После этого осуществлялась экспертная оценка выравнивания и выделение консервативных мотивов. Построение модели замен аминокислот на основе множественного выравнивания проводилось алгоритмом Modelestimator (Arvestad, 2006). Построение филогенетического дерева на основе модели замен осуществлялось алгоритмами: FastTree 2.1.1 (Arvestad, 2006) – для оценки топологии и Phyml (Guindon, Gascuel, 2003) – для окончательной оптимизации. Для проверки устойчивости узлов ветвления дерева использовали многократную генерацию выборок методом bootstrap. Визуализация деревьев и анализ топологии выполнены в программах FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2008) и Archaeopteryx (Han, Zmasek, 2009; Zmasek, 2015).

Выделенные клады, состоящие из последовательностей однодольных злаковых растений, были затем соотнесены с внешними группами двудольных растений и последовательностями водоросли. Исходя из топологии крупных клад на филогенетических деревьях и их видового состава, судили о ранних событиях дупликации. Эволюционно более поздние дупликации, возникшие после дивергенции цветковых растений на двудольные и однодольные, оценивали путем подсчета количества последовательностей ферментов в соответствующих кладах. Подсчет соотношения замен осуществлялся с использованием *Ka/Ks Calculation tool* (http://services.cbu.uib.no/tools/kaks) для клад однодольных растений. На вход сервиса подавалось предварительно оцененное экспертом на предмет протяженных делеций множественное выравнивание каждой клады последовательностей однодольных растений. Реконструкция топологии филогенетических отношений и последовательностей предков проводилась сервисом *Ka/Ks Calculation tool*. Полученная топология сопоставлялась с независимо рассчитанной нами. Отношения частот K_a/K_s для всех ветвей были извлечены и использованы для дальнейшего расчета средних значений и доверительных интервалов и приведены в виде «ящиков с усами».

Анализ полногеномных экспрессионных экспериментов. Поиск экспрессионных данных осуществляли в базе GEO DataSets NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds). Для этого выбирали эксперименты, в которых присутствовало по три повторности тотальной РНК либо мРНК у растений с нормальным генотипом в стандартных условиях в корне и/или в листе. Были выбраны следующие эксперименты: *H. vulgare* – GSE56437 (лист), GSE6325 (корень); *O. sativa* – GSE14300 (корень и лист); *Z. mays* – GSE50191 (корень и лист). Далее проводился корреляционный анализ уровня экспрессии изучаемых генов между корнем и листом, а также между видами растений. В работе привлечены данные об уровне экспрессии генов в экспериментах с использованием как ДНК-микрочипов (GSE56437, GSE6325, GSE14300), так и высокопроизводительного секвенирования (GSE50191) на платформе Illumina. Данные высокопроизводительного секвенирования предварительно нормировали на общий размер библиотеки (число ридов в эксперименте) и длину целевого гена (UTR+CDS), было рассчитано значение FPKM (fragments per kilobase million). Известно, что микрочиповые данные и данные высокопроизводительного секвенирования имеют разные размерности. Поэтому для сопоставления их между разными экспериментами была использована суммарная доля мРНК каждой копии фермента, отнесенная к общему количеству мРНК функционально однородных ферментов, например APX. Такая величина универсальна,

ее можно рассчитать как из микрочиповых данных, так и из данных высокопроизводительного секвенирования.

Для расчета коэффициентов корреляции Пирсона, применения *t*-критерия Стьюдента, вычисления квантилей и построения графиков использовался пакет PAST STATISTICS (Hammer et al., 2001).

Результаты

Для выявления соответствия генов ферментов антиоксидантной защиты у разных видов растений был проведен поиск гомологов и реконструкция филогенетических отношений. Результаты приведены в таблице, а топологии деревьев – в Приложениях 1–4[1].

В геномах 14 видов растительных организмов было найдено 110 гомологичных последовательностей APX. Филогенетические отношения гомологов приведены в Приложении 1. При анализе топологии дерева было выделено восемь ортологических групп последовательностей злаков – A–H (см. Приложение 1). Следует отметить, что в основном последовательности в ортологических группах (кладах) представлены единичными копиями, однако в кладах B и C часть организмов не представлена (например, *T. urartu, Ae. tauschii*), а в кладе D произошла дупликация гена у *O. sativa*. Клады A и D имеют собственную внешнюю группу из последовательностей двудольных растений, а клады E и F, а также G и H являются результатом дупликаций после обособления однодольных растений и имеют по одной общей внешней группе на пару (см. Приложение 1).

Для анализа молекулярной эволюции GPX был сформирован набор гомологичных последовательностей в количестве 110 шт. Филогенетические отношения гомологов приведены в Приложении 2, а данные о соответствии последовательностей – в таблице. Последовательности злаков кластеризуются в семь монофилетических групп. В основном последовательности в кладах представлены единичными копиями, однако *Z. mays* имеет молодые дупликации генов в кладах C и E. Клады A, B, F, G имеют собственные внешние группы из последовательностей двудольных растений, а клады C, D, E являются результатом дупликации после обособления однодольных растений и имеют одну общую внешнюю группу двудольных (см. Приложение 2). Фрагмент дерева, содержащий клады F и G, имеет слабую бутстрэп-поддержку базальной топологии. В связи с этим последовательности двудольных растений отнесены в настоящей работе к кладе GPX G на основе дополнительного анализа эволюционных расстояний между последовательностями двудольных и однодольных растений в рассматриваемом фрагменте дерева.

Далее был сформирован набор из 100 гомологичных последовательностей SOD. Филогенетические отношения гомологов приведены в Приложении 3, а данные о составе ортологических групп и соответствии последовательностей между видами представлены в таблице. Последовательности злаков кластеризуются в семь монофилетических групп. *A. thaliana* и *Z. mays* имеют относительно молодые дупликации генов (после обособления эволюционных линий изучаемых видов друг от друга) в кладах A, B, F и C, E соответственно. Клады A, B, F, G имеют собственную внешнюю группу из последовательностей двудольных растений. В кладах B и E произошли относительно молодые дупликации генов (*Z. mays*, *O. sativa*, а также во внешних группах – *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *V. vinifera*).

Для филогенетического анализа CAT был сформирован набор из 39 гомологичных последовательностей. Филогенетические отношения гомологов приведены в Приложении 4, а данные о последовательностях – в таблице. Последовательности злаков кластеризуются в три монофилетические группы. При этом лишь клада C имеет соответствующую внешнюю группу из последовательностей двудольных.

Затем для каждой монофилетической группы злаковых растений был сделан расчет отношения несинонимичных замен к синонимичным (K_a/K_s). Результаты представлены на рис. 2, *д–з*.

Для каждой диаграммы приведена схема филогенетических отношений клад. Средние значения K_a/K_s для всех клад не превосходят 0.5, что говорит о стабилизирующем характере отбора каждой из копий в выборке видов. Следует отметить, что давление отбора на разные копии различно, для APX и SOD значения K_a/K_s между копиями достоверно различаются (вероятность принадлежности к одной генеральной совокупности $P < 0.0005$; Приложение 5), а для GPX и CAT значения этой характеристики между копиями не показывают высокой достоверности (см. рис. 2 и Приложение 5). Анализ значений K_a/K_s позволяет выделить копии, находящиеся под более сильным давлением стабилизирующего отбора ($\langle K_a/K_s \rangle < 0.2$). Для APX это представители клад E, F, G, для SOD – B и E, для GPX такую тенденцию проявляют последовательности клады E. Примечательно, что между копиями CAT не выявляется заметных различий по значениям K_a/K_s, они находятся под относительно высоким давлением стабилизирующего отбора ($\langle K_a/K_s \rangle < 0.2$).

В дальнейшем анализе использовали полногеномные экспрессионные данные, с помощью которых рассчитывалась доля мРНК каждой копии фермента во всем объеме мРНК фермента для каждой из четырех функциональных групп (APX, GPX, SOD, CAT) в тканях корня и листа по отдельности. Данные по экспрессии ортологичных генов в разных видах растений во всех случаях выявили положительную корреляцию ($P << 0.0005$). Графики рассеяния усредненных по корню и листу значений экспрессии ортологичных генов и соответствующие коэффициенты корреляции приведены в Приложении 6. Интересно отметить, что, несмотря на разницу в биохимических характеристиках фотосинтеза между C_3 злаками – рисом (*O. sativa*), ячменем (*H. vulgare*) и C_4 – кукурузой (*Z. mays*), наблюдается высокий уровень корреляции между рассматриваемыми значениями экспрессии всех гомологов генов, вовлеченных в данную работу (см. Приложение 6). Таким образом, можно заключить, что относительный уровень экспрессии генов, принадлежащих к одной кладе, не выявляет существенных различий у изученных видов.

Поскольку данные по экспрессии изученных генов хорошо соотносятся друг с другом, мы привели усредненные по всем изученным видам значения (см. рис. 2, *и–м*). Мож-

[1] Приложения 1–6 см. по адресу:
http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx2.pdf

Genes for antioxidant protection analyzed in the study

Enzyme	Clade	*Zea mays*	*Sorghum bicolor*	*Setaria italica*	*Oryza sativa* ssp. *japonica*	*Brachypodium distachyon*	*Hordeum vulgare*
APX	**A**	–	SB07G027300	SI006G20910	–	BD3G40330	HV39901G00010
	B	ZM05G30510	SB04G022560	SI001G20200	OS02G34810	BD3G45700	HV205777G00010 HV39745G00010
	C	ZM02G14900	SB06G017080	SI007G10710	OS04G35520	BD5G10490	HV1566829G00010
	D	–	SB08G004880	SI007G29170	OS12G07830 OS12G07820	BD4G41180	HV158476G00020
	E	**ZM01G11990 ZM09G23350**	**SB01G038760**	**SI009G45750**	**OS03G17690**	**BD1G65820**	**HV40855G00010**
	F	ZM02G41460	SB02G044060	SI002G45330	OS07G49400*	BD1G16510	HV56215G00010
	G	ZM04G35080	SB07G024880	SI006G24130	OS08G43560	BD3G42340	HV137092G00010
	H	–	SB06G001970	SI007G02570	OS04G14680	BD5G03640	HV1569071G00010
GPX	**A**	ZM06G15260	SB10G005820	SI004G04770	OS06G08670	BD1G47140	–
	B	–	SB00G00200	SI008G10560	OS11G18170	–	–
	C	ZM01G14850 ZM01G14890	SB01G035940	–	–	–	–
	D	ZM04G20660	SB04G032520	SI001G27470	OS02G44500	BD3G51010	HV63919G00010
	E	**ZM02G07380 ZM10G22600**	**SB06G024920**	**SI007G20040**	**OS04G46960**	**BD5G18000**	**HV54906G00010**
	F	ZM09G20790	–	SI009G41050	OS03G24380	BD1G61930	HV1584327G00010
	G	–	SB06G033440	SI003G01000	–	BD5G26725	–
SOD	**A**	ZM09G06320	SB10G001280	SI009G12380	OS06G02500	BD1G50550	HV56996G00010
	B	ZM06G08270 ZM09G05010	SB10G002970	SI004G03040	OS06G05110	BD1G51140	HV2547265G00020
	C	ZM06G21620 ZM08G13670	SB09G011450	SI003G29220	OS05G25850	BD2G30580	HV6255G00010
	D	ZM01G08150	SB01G042660	SI009G50380	OS03G11960	BD1G69680	HV2550555G00010
	E	**ZM07G29600 ZM09G21130 ZM01G15520**	**–**	**SI002G43250 SI009G41550**	**OS03G22810 OS07G46990**	**BD1G18340**	**HV160480G00010**
	F	ZM01G36030	SB07G023950	SI006G25290	OS08G44770	BD3G43070	HV1577939G00010
	G	ZM02G06820	–	–	OS04G48410	–	–

Triticum aestivum	*Triticum urartu*	*Aegilops tauschii*	*Arabidopsis thaliana*	*Solanum lycopersicum*	*Solanum tuberosum*	*Vitis vinifera*	*Chlamydomonas reinhardtii*
–	TRIUR3_01974	F775_01406	AT4G32320	SL08G059760	ST08G011590	VV04G12170	
6AL_470886_AA1497540 6BL_499717_AA1589930 6DL_526775_AA1691860	TRIUR3_33614	–	–	–	–	–	
2AL_095116_AA0307060 2DL_158409_AA0517920 2BL_130399_AA0410390	–	–	–	–	–	–	
5DL_433012_AA1398100 U_642188_AA2112960 5AS_392962_AA1266880	TRIUR3_14147	F775_27748	AT1G77490 AT4G08390	SL06G060260 SL11G018550	ST06G019350 ST11G014780	VV18G01950	
4DL_342793_AA1122380 **4AS_307333_AA1019630** **4BL_320270_AA1033310**	**TRIUR3_20326**	**F775_32980**	AT1G07890 AT3G09639	SL09G007270 SL06G005150 SL06G005159	ST09G006729	VV08G01790 VV06G04679	CR06G10160 CR09G08770
U_641465_AA2095890 2BS_146384_AA0464000 2DS_179678_AA0608540	TRIUR3_16101	F775_32894					
7AS_569494_AA1817480 7BS_593978_AA1955430 7DS_624295_AA2060370	TRIUR3_11069	F775_30828	AT4G35970 AT4G35000	SL02G083620 SL01G111510	ST02G026930 ST01G048890	VV04G00420 VV03G04820	
2AS_112531_AA0340050 2BS_146663_AA0470350 2DS_180302_AA0610730	TRIUR3_26505	F775_05651					
–	TRIUR3_07828	–	AT2G25080 AT4G31870	SL08G006720	ST08G007960	VV04G13240	
–	–	–	AT2G31570 AT2G43350	SL06G073460	ST06G027530	VV05G00410	
–	–	–				–	
U_641028_AA2082690 6DL_526629_AA1688510	TRIUR3_16000	F775_26338	AT4G11600	SL08G080940	ST08G029520	–	CR10G08850 CR10G05020 CR03G12200 CR08G00160
2BL_130949_AA0420440 **2DL_157956_AA0503330**	**TRIUR3_07893**	**F775_05616**				–	
4BS_328368_AA1086960 U_641855_AA2105830 4AS_306489_AA1008990	–	–	AT3G63080 AT2G48150	SL09G064850	ST09G015140	VV07G04720	
–	TRIUR3_18588	F775_31639	AT1G63460*	SL12G056240* SL12G056230*	ST12G024020* ST12G024030*	VV02G06550*	
4AL_289135_AA0965570 7AS_571265_AA1846380 7DS_625535_AA2065460	TRIUR3_20218	–	–	–	–	–	
7AS_570531_AA1837180 4AL_291448_AA0994630 7DS_622963_AA2047880	TRIUR3_00248	–	AT5G23310 AT4G25100 AT5G51100	SL02G021140 SL06G048410 SL03G095180	ST02G006550 ST06G015010 ST06G015020 ST03G018550	VV10G06370 VV16G01530	
2DL_158719_AA0524930 2BL_131439_AA0427700 2AL_094166_AA0293620	TRIUR3_09843	F775_26675	AT3G56350 AT3G10920	SL06G049080	ST06G013090	–	CR13G07570 CR16G10140 CR17G01600
4BL_321588_AA1062590 4AS_306564_AA1010270 4DL_342699_AA1119920	TRIUR3_22623	F775_29877	AT1G08830	SL03G062890	–	VV08G08520	CR12G01760 CR10G04050 CR02G06330
2AS_114204_AA0365000 **2BS_148548_AA0493640** **2DS_179233_AA0605480**	–	–	AT2G28190	–	–	VV14G04290	
7AL_557214_AA1778230 7DL_602770_AA1968180 7BL_578150_AA1890160	–	–	AT5G18100*	SL11G066390	ST11G024220	VV06G08800	
–	–	–	AT1G12520	SL08G079830	–	–	

End of table

Enzyme	Clade	*Zea mays*	*Sorghum bicolor*	*Setaria italica*	*Oryza sativa* ssp. *japonica*	*Brachypodium distachyon*	*Hordeum vulgare*
CAT	**A**	**ZM05G16210**	**SB10G030840**	**SI004G29580**	**OS06G51150**	**BD1G29800**	**HV7888G00010**
	B	**ZM01G02380**	–	**SI009G57040**	**OS03G03910**	**BD1G76330**	**HV71788G00010**
	C	**ZM04G41390**	–	**SI001G12120**	**OS02G02400**	**BD3G01470**	**HV1561906G00010**

Rows group orthologous genes. Clades are indicated according to the topology of phylogenetic trees in Supplements 1–4. Asterisks indicate sequences whose assignment to an orthologous group has not been reliably proven. Genes promising for breeding programs are shown in boldface (see Discussion).

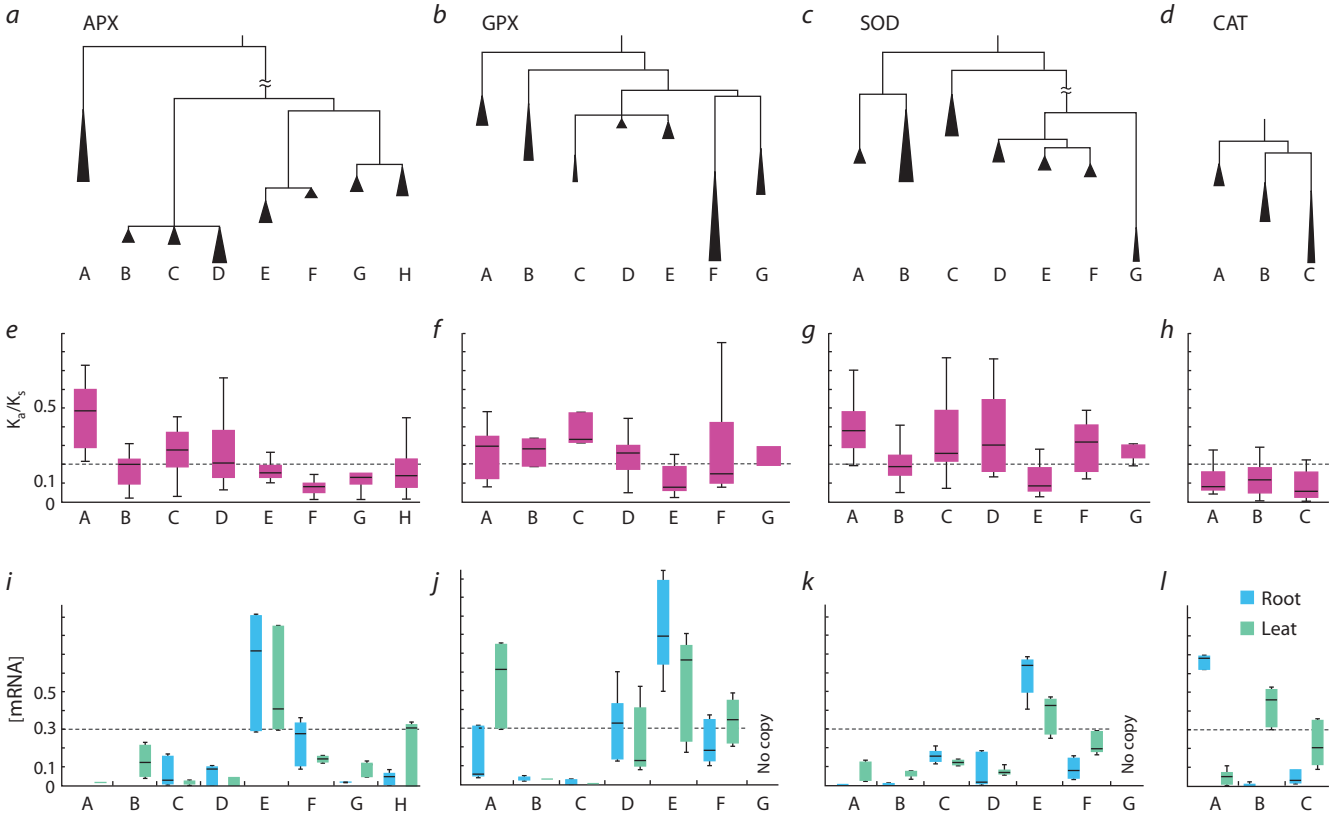


Fig. 2. Phylogenetic relationships among the recognized clades of monocotyledonous species based on (*a*) APX, (*b*) GPX, (*c*) SOD, and (*d*) CAT; (*e–h*) K_a/K_s values for each clade; and (*i–l*) relative levels of mRNAs for corresponding enzyme copies in root and leaf tissues.

Topologies of phylogenetic trees are shown in full in Supplements 1–4.

но заметить, что уровень экспрессии для каждой клады также различен. Отметим, что для разных тканей нередко наблюдается схожий характер экспрессии изучаемых генов. Корреляция значений уровня экспрессии генов в корне и листе достоверна ($P < 0.005$) во всех случаях. Высокий относительный уровень экспрессии ($\langle$[мРНК]$\rangle > 0.3$) APX и SOD наблюдается для генов клады E в корне и листе. Гены GPX и CAT выявляют тканеспецифичный характер экспрессии. В корне имеют высокую экспрессию копии GPX D и E, а в листе – GPX A, E и F. Для корня характерна высокая относительная экспрессия генов CAT A, а для листа – CAT B и C. При этом CAT A отличается высоким относительным уровнем мРНК в тканях корня, а CAT B и CAT C – в тканях листа.

Для более комплексного понимания функциональной важности генов данные характера накопления замен (K_a/K_s) были объединены с усредненными значениями экспрессии в корне и листе. По характеру накопления за-

Triticum aestivum	*Triticum urartu*	*Aegilops tauschii*	*Arabidopsis thaliana*	*Solanum lycopersicum*	*Solanum tuberosum*	*Vitis vinifera*	*Chlamydomonas reinhardtii*
7AL_556567_AA1765730 **7DL_602975_AA1973160** **7BL_576925_AA1860110**	**TRIUR3_21127**	**–**	AT1G20630* AT4G35090*	SL04G082460* SL02G082760*	–	–	
5AL_376544_AA1238210 **4BL_320451_AA1039710** **4DL_343177_AA1131150**	**–**	**F775_28042**			ST02G026140 ST04G035910	VV18G12260	CR09G11950
U_640838_AA2076560 **6DS_545065_AA1749890** **6BS_513206_AA1634480**	**TRIUR3_31187**	**F775_32212**	AT1G20620	SL12G094620			

мен из 25 ортологических групп можно выделить десять, выявивших более сильное давление стабилизирующего отбора: APX E–H; GPX E, F; SOD E; CAT A–C. Одновременно с этим наиболее высокий уровень экспрессии характерен для APX E, SOD E, GPX E и тканеспецифичных форм CAT A (ткани корня), CAT B и C (ткани листа).

Обсуждение

Активные формы кислорода – один из важнейших повреждающих факторов для живых систем. Основой молекулярной механики антиоксидантной защиты растений являются специализированные ферменты, утилизирующие АФК и пероксиды. Улучшение характеристик этой системы позволит повысить устойчивость культурных растений к абиотическим стрессам, таким как засоленность, засуха и холод (Gill et al., 2013; Khaliq et al., 2015; Osipova et al., 2016). В настоящей работе впервые проведен системный анализ особенностей молекулярной эволюции и уровней экспрессии генов четырех функциональных групп ферментов – компонентов системы антиоксидантной защиты (APX, GPX, SOD и CAT).

При реконструкции филогенетических отношений выявлено 25 групп ортологичных генов у злаков, что несколько превосходит количество соответствующих ферментов у наиболее изученного семейства капустоцветных, в то же время в большинстве случаев установлены соответствия (см. таблицу). Таким образом, со времени появления первых ферментов системы антиоксидантной защиты в процессе эволюции – примерно 2.4 млрд лет назад (Hohmann-Marriott, Blankenship, 2011), до появления цветковых растений (более 100 млн лет назад) произошло усложнение состава ферментативной системы, сохранившееся в эволюционных линиях изученных видов. При анализе отношения несинонимичных замен к синонимичным (K_a/K_s) установлено, что характер накопления замен соответствует стабилизирующему отбору. Вместе с тем достоверные различия этого значения между копиями свидетельствуют в пользу неодинакового давления отбора на гены, входящие в разные ортологические группы (клады).

Нами впервые показано, что паттерны экспрессии генов антиоксидантной системы на эволюционных расстояниях менее 50 млн лет (время дивергенции рассчитано по данным 28 исследований, доступных в системе (http://www.timetree.org/) являются достоверно скоррелированными. Это говорит об относительно высокой устойчивости экспрессионных характеристик изучаемой системы на текущем этапе эволюции. Ранее была показана следующая тенденция: паттерны экспрессии в одних и тех же органах между разными видами животных тем лучше скоррелированы, чем меньше время дивергенции между этими видами (Peremyslov et al., 2011).

Значения K_a/K_s для разных копий ферментов антиоксидантной системы были отмечены в пределах от 0.08 до 0.45. Для генов с относительно низким давлением стабилизирующего отбора ($\langle K_a/K_s \rangle \in (0.2; 0.45)$) наблюдался низкий относительный уровень экспрессии – $\langle [\text{мРНК}] \rangle \in (0.3; 0.92)$. Гены с относительно высоким давлением стабилизирующего отбора ($\langle K_a/K_s \rangle \in (0.08; 0.2)$) имеют как низкий, так и высокий относительный уровень экспрессии мРНК (см. рис. 2). Это согласуется с мировыми исследованиями в данной области. В ряде работ установлена связь между уровнем экспрессии мРНК набора генов и их консервативностью (Wright et al., 2004; Ingvarsson, 2007). На примере голосеменных отмечено, что экспрессия мРНК вносит значимый вклад в частоты используемых кодонов (De La Torre et al., 2015).

В свою очередь, высокому давлению стабилизирующего отбора подвергаются наиболее важные для жизнеспособности гены, что свидетельствует о том, что характер накопления замен является важным индикатором при выборе наиболее перспективных для селекции генов. При интеграции экспрессионных данных и характеристик накопления замен предсказание генов, которые вносят наибольший вклад в работу антиоксидантной системы растений, становится более однозначным.

В результате из 25 ортологических групп было выделено шесть наиболее приоритетных групп генов-кандидатов для дальнейшей верификации и использования в процессе селекции. Это APX E, SOD E, GPX E и тканеспецифичные CAT A (ткани корня), CAT B и C (ткани листа) (см. таблицу). Соответствующие копии для каждого из изученных видов растений и хромосомная локализация генов приведены в таблице. Для всех видов, кроме представителей родов *Triticum* и *Aegilops*, хромосомная локализация

генов дана в цифровой кодировке (первое число после буквенного идентификатора вида) и отделена буквой G от идентификатора локуса (второе число). Можно заметить, что гены антиоксидантной защиты представлены на различных хромосомах C_3 и C_4 злаков (см. таблицу). Для кукурузы *Z. mays* найдено и проанализировано 27 гомологов генов APX, GPX, SOD и CAT. Гены *Z. mays* в ортологических группах APX E, SOD E и GPX E представлены в двух и трех копиях. Одновременно с этим паралоги с низким уровнем экспрессии и относительно высоким уровнем K_a/K_s, такие как, например, APX A и APX D, отсутствуют.

Номенклатурные названия генов мягкой пшеницы начинаются с кодировки хромосомы. Следует отметить, что изученные гены мягкой пшеницы найдены на хромосомах гомеологических групп 2 и 4–7. Предсказанные гены-кандидаты с наибольшим уровнем экспрессии мРНК GPX и SOD находятся на хромосомах 2-й гомеологической группы, а CAT – на хромосомах 4–7-й гомеологических групп. Это соотносится с классическими работами, в которых анализировались анеуплоидные линии сорта Чайниз Спринг: основные локусы, ассоциированные с активностью SOD, были локализованы на хромосомах 2-й гомеологической группы, а ассоциированные с CAT – на хромосомах 2-й и 7-й гомеологических групп (Neuman, Hart, 1986; Li et al., 1999; Wu et al., 1999). Это свидетельствует в пользу того, что за полиморфизм в активности антиоксидантной системы могут быть ответственны аллельные варианты именно структурных, а не регуляторных генов. Современные исследования подтверждают эти данные, а также позволяют выявить большее количество ассоциированных локусов, например локус, ассоциированный с активностью APX на хромосоме 7D, и локус, ассоциированный с активностью SOD на хромосоме 4D (Osipova et al., 2016).

Дикие сородичи мягкой пшеницы являются перспективным источником генов устойчивости к стрессовым факторам (Trethowan, Mujeeb-Kazi, 2008; Reynolds et al., 2009). Один из самых актуальных на данный момент источников – *Ae. tauschii*, донор D-генома для мягкой пшеницы, который имеет высокое генетическое разнообразие (Jia et al., 2013). Этот вид вовлечен нами в анализ совместно с *T. urartu*. Информацию о наборе генов антиоксидантной защиты для этих видов можно будет в дальнейшем использовать в селекции для контроля уровня экспрессии ключевых генов у интрогрессивных форм совместно с оценкой их физиологического эффекта.

Таким образом, в настоящей работе проведен широкомасштабный поиск гомологов генов антиоксидантной защиты APX, GPX, SOD и CAT, анализ их эволюционных характеристик и паттернов экспрессии. В результате предсказаны шесть структурных генов-компонентов антиоксидантной системы с наиболее высоким уровнем экспрессии и наибольшим давлением стабилизирующего отбора. Полученные данные требуют дальнейшей экспериментальной верификации. Показано, что интеграция эволюционных характеристик и экспрессионных данных позволяет проводить приоритизацию генов в многокопийных генетических системах и предсказывать перспективные мишени для селекции.

Acknowledgments

The development of the approach and data analysis were supported by the Russian Science Foundation, project 17-74-10198. Use of equipment of the Bioinformatics Shared Access Center for the analysis was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0008

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 1990;215(3):403-410. DOI 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Arvestad L. Efficient methods for estimating amino acid replacement rates. J. Mol. Evol. 2006;62(6):663-673. DOI 10.1007/s00239-004-0113-9.

Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. Front. Environ. Sci. 2014;2:53. DOI 10.3389/fenvs.2014.00053.

De La Torre A.R., Lin Y., Van de Peer Y., Ingvarsson P.K. Genome-wide analysis reveals diverged patterns of codon bias, gene expression, and rates of sequence evolution in *Picea* gene families. Genome Biol. Evol. 2015;7(4):1002-1015. DOI 10.1093/gbe/evv044.

Ehleringer J.R., Sage R.F., Flanagan L.B., Pearcy R.W. Climate change and the evolution of C4 photosynthesis. Trends Ecol. Evol. 1991;6(3):95-99. DOI 10.1016/0169-5347(91)90183-X.

Gill S.S., Tajrishi M., Madan M., Tuteja N. A DESD-box helicase functions in salinity stress tolerance by improving photosynthesis and antioxidant machinery in rice (*Oryza sativa* L. cv. PB1). Plant Mol. Biol. 2013;82(1-2):1-22. DOI 10.1007/s11103-013-0031-6.

Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 2010;48(12):909-930. DOI 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

Guindon S., Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 2003; 52(5):696-704. DOI 10.1080/10635150390235520.

Gunbin K.V., Suslov V.V., Genaev M.A., Afonnikov D.A. Computer system for analysis of molecular evolution modes (SAMEM): analysis of molecular evolution modes at deep inner branches of the phylogenetic tree. In Silico Biol. 2012;11(3,4):109-123. DOI 10.3233/ISB-2012-0446.

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. Paleontological statistics software: Package for education and data analysis. Palaeontol. Electronica. 2001;4. Available at: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

Hammond-Kosack K.E., Jones J.D. Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell. 1996;8(10):1773-1791.

Han M.V., Zmasek C.M. phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. BMC Bioinformatics. 2009;10(1):356. DOI 10.1186/1471-2105-10-356.

Hatch M.D. C_4 photosynthesis: a unique elend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. Biochim. Biophys. Acta – Rev. Bioenergetics. 1987;895(2):81-106. DOI 10.1016/S0304-4173(87)80009-5.

Hatch M.D. C_4 photosynthesis: discovery and resolution. In: Govindjee, Beatty J.T., Gest H., Allen J.F. (Eds.). Discoveries in Photosynthesis. Springer, 2005:875-880.

Henikoff S., Henikoff J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992;89(22):10915-10919.

Hohmann-Marriott M.F., Blankenship R.E. Evolution of photosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 2011;62(1):515-548. DOI 10.1146/annurev-arplant-042110-103811.

Ingvarsson P.K. Gene expression and protein length influence codon usage and rates of sequence evolution in *Populus tremula*. Mol. Biol. Evol. 2007;24(3):836-844. DOI 10.1093/molbev/msl212.

Jia J., Zhao S., Kong X., Li Y., Zhao G., He W., Appels R., Pfeifer M., Tao Y., Zhang X., Jing R., Zhang C., Ma Y., Gao L., Gao C., Span-

nagl M., Mayer K., Li D., Pan S., Zheng F., Hu Q., Xia X., Li J., Liang Q., Chen J., Wicker T., Gou C., Kuang H., He G., Luo Y., Keller B., Xia Q., Lu P., Wang J., Zou H., Zhang R., Xu J., Gao J., Middleton C., Quan Z., Liu G., Wang J., International Wheat Genome Sequencing Consortium, Yang H., Liu X., He Z., Mao L., Wang J. *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. Nature. 2013;496:91-95. DOI 10.5524/100054.

Karpilov Y.S. The distribution of radioactive carbon 14 amongst the products of photosynthesis of maize. Trudy Kazanskogo sel'skokhozyaystvennogo instituta = Works of the Kazan Agricultural Institute. 1960;41(1):15-24. (in Russian)

Katoh K., Toh H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. Brief. Bioinform. 2008;9(4):286-298. DOI 10.1093/bib/bbn013.

Khaliq A., Zia-ul-Haq M., Ali F., Aslam F., Matloob A., Navab A., Hussain S. Salinity tolerance in wheat cultivars is related to enhanced activities of enzymatic antioxidants and reduced lipid peroxidation. CLEAN – Soil, Air, Water. 2015;43(8):1248-1258. DOI 10.1002/clen.201400854.

Li W.L., Faris J.D., Chittoor J.M., Leach J.E., Hulbert S.H., Liu D.J., Chen P.D., Gill B.S. Genomic mapping of defense response genes in wheat. Theor. Appl. Genet. 1999;98(2):226-233. DOI 10.1007/s001220051062.

Li W.H., Yang J., Gu X. Expression divergence between duplicate genes. Trends Genet. 2005;21(11):602-607. DOI 10.1016/j.tig.2005.08.006.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 2004;9(10):490-498. DOI 10.1016/j.tplants.2004.08.009.

Neuman P.R., Hart G.E. Genetic control of the mitochondrial form of superoxide dismutase in hexaploid wheat. Biochem. Genet. 1986;24(5-6):435-446.

Noctor G., Foyer C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Biol. 1998;49(1):249-279. DOI 10.1146/annurev.arplant.49.1.249.

Orozco-Cardenas M., Ryan C.A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999;96(11):6553-6557. DOI 10.1073/pnas.96.11.6553.

Osipova S., Permyakov A., Permyakova M., Pshenichnikova T., Verkhoturov V., Rudikovsky A., Rudikovskaya E., Shishparenok A., Doroshkov A., Börner A. Regions of the bread wheat D genome associated with variation in key photosynthesis traits and shoot biomass under both well watered and water deficient conditions. J. Appl. Genet. 2016;57(2):151-163. DOI 10.1007/s13353-015-0315-4.

Peremyslov V.V., Mockler T.C., Filichkin S.A., Fox S.E., Jaiswal P., Makarova K.S., Koonin E.V., Dolja V.V. Expression, splicing, and evolution of the myosin gene family in plants. Plant Physiol. 2011;155(3):1191-1204. DOI 10.1104/pp.110.170720.

Rambaut A. FigTree, version 1.4: tree figure drawing tool. 2008. http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/.

Reynolds M., Foulkes M.J., Slafer G.A., Berry P., Parry M.A., Snape J.W., Angus W.J. Raising yield potential in wheat. J. Exp. Bot. 2009;60(7):1899-1918. DOI 10.1093/jxb/erp016.

Sage R.F., Sage T.L., Kocacinar F. Photorespiration and the evolution of C_4 photosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 2012;63:19-47. DOI 10.1146/annurev-arplant-042811-105511.

Trethowan R.M., Mujeeb-Kazi A. Novel germplasm resources for improving environmental stress tolerance of hexaploid wheat. Crop Sci. 2008;48(4):1255-1265. DOI 10.2135/cropsci2007.08.0477.

Wang X., Cai J., Liu F., Dai T., Cao W., Wollenweber B., Jiang D. Multiple heat priming enhances thermo-tolerance to a later high temperature stress via improving subcellular antioxidant activities in wheat seedlings. Plant Physiol. Biochem. 2014;74:185-192. DOI 10.1016/j.plaphy.2013.11.014.

Wright S.I., Yau C.K., Looseley M., Meyers B.C. Effects of gene expression on molecular evolution in *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata*. Mol. Biol. Evol. 2004;21(9):1719-1726. DOI 10.1093/molbev/msh191.

Wu G., Wilen R.W., Robertson A.J., Gusta L.V. Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. Plant Physiol. 1999;120(2):513-520. DOI 10.1104/pp.120.2.513.

Zhang J. Evolution by gene duplication: an update. Trends Ecol. Evol. 2003;18(6):292-298. DOI 10.1016/S0169-5347(03)00033-8.

Zmasek C.M. Archaeopteryx: visualization, analysis, and editing of phylogenetic trees. 2015. Available at: https://sites.google.com/site/cmzmasek/home/software/archaeopteryx.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):132-140
DOI 10.18699/VJ18.340

SpikeDroidDB – информационная система для аннотации морфометрических характеристик колоса пшеницы

М.А. Генаев[1] ✉, Е.Г. Комышев[1], Фу Хао[2, 3], В.С. Коваль[1], Н.П. Гончаров[1, 4], Д.А. Афонников[1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[3] Хэйлунцзянский университет, Харбин, Китай
[4] Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

Структура колоса – один из важнейших признаков злаков, связанный с такими их хозяйственно ценными качествами, как продуктивность, устойчивость к факторам внешней среды и вредителям, легкость обмолота. Колосья различаются по форме, размерам, плотности, остистости, цвету и т. д. Оценка характеристик колоса выполняется экспертом на основании визуального анализа и требует существенных затрат времени. Эффективность фенотипирования колосьев можно повысить за счет внедрения компьютерных технологий, организации хранения информации в базах данных, использования алгоритмов машинного обучения для анализа полученной информации. В настоящей работе представлен новый подход для сбора, хранения и анализа информации о морфометрических характеристиках колоса пшеницы. Разработано несколько протоколов получения цифровых изображений колоса. Создана компьютерная информационная система SpikeDroidDB, которая позволяет хранить цифровые изображения колоса, аннотировать их фенотипические характеристики (всего 14 признаков), предоставляет гибкую систему запросов для доступа к данным. В системе SpikeDroidDB для растений взаимосвязанным образом описываются генотип, фенотип, место и условия выращивания. Web-интерфейс системы SpikeDroidDB доступен по адресу http://spikedroid.biores.cytogen.ru/ и позволяет работать с системой как со стационарных компьютеров, так и с мобильных устройств. С использованием SpikeDroidDB произведена оцифровка и аннотация коллекции колосьев гибридов F_2 от скрещивания австралийского сорта мягкой пшеницы Triple Dirk с образцом KU506 китайской пшеницы *Triticum yunnanense*. Проведен анализ изменчивости колосьев по форме, длине и ширине.

Ключевые слова: пшеница; характеристики колоса; фенотипирование; аннотация; интеграция данных; базы данных.

SpikeDroidDB: an information system for annotation of morphometric characteristics of wheat spike

M.A. Genaev[1] ✉, E.G. Komyshev[1], Fu Hao[2, 3], V.S. Koval[1], N.P. Goncharov[1, 4], D.A. Afonnikov[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] Heilongjiang University, Harbin, China
[4] Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

The structure of the ear is one of the most important features of cereals associated with such agronomically important traits as productivity, resistance to environmental factors and pests, threshebility. Ears differ in shape, size, density, awnedness, color, etc. Analysis of the ear traits requires visual inspection, manual measurements and is very time-consuming. The effectiveness of ears' phenotyping can be improved by the introduction of an automated image processing technology, storage of information in databases, use of machine learning algorithms to analyze this information. This paper presents a new approach for collecting, storing and analyzing of information about morphometric characteristics of ears of wheat. Two protocols for obtaining digital images of the ear have been developed. The computer-aided information system SpikeDroidDB has been developed, which allows you to store digital images of the ear, annotate their phenotypic features (14 features, including plant variety description, links to parent genotypes, generation, planting number, ear morphology description). The interface provides a flexible query system to access the data. SpikeDroidDB represents an interconnected representation between genotype, phenotype, location, and growing conditions. The web interface of SpikeDroidDB is available at http://spikedroid.biores.cytogen.ru/ and allows you to work with the system as with desktop computers or mobile devices. We used SpikeDroidDB for the digitization and annotation of a collection of ears of F_2 hybrids from crosses between the Australian cultivar of common wheat Triple Dirk and accession KU506 of Chinese wheat *Triticum yunnanense*. This experiment includes analysis of 104 plants, 230 spike images. The analysis of the variability of ears in form, length, and other traits allowed determination of the type of their genetic control: compactness is controlled by two recessive genes, awn type and hairi-

Received 12.09.2017
Accepted for publication 02.11.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: mag@bionet.nsc.ru

ness at the site of attachment of the spikelet to the axis is controlled by single dominant gene type, hairiness on the axis of the spike is controlled by two dominant genes.

Key words: wheat; spike characteristics; phenotyping; annotation; data integration.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Генаев М.А., Комышев Е.Г., Фу Хао, Коваль В.С., Гончаров Н.П., Афонников Д.А. SpikeDroidDB – информационная система для аннотации морфометрических характеристик колоса пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):132-140. DOI 10.18699/VJ18.340

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Genaev M.A., Komyshev E.G., Fu Hao, Koval V.S., Goncharov N.P., Afonnikov D.A. SpikeDroidDB: an information system for annotation of morphometric characteristics of wheat spike. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):132-140. DOI 10.18699/VJ18.340 (in Russian)

Одни из важнейших хозяйственно ценных признаков злаков – характеристики колоса, которые тесно связаны с продуктивностью растения. Для селекционеров и генетиков имеют большое значение такие параметры, как число зерен в колосе, масса 1000 зерен и др. (Гончаров, 2012). Форма зерновки тоже является полезным селекционным признаком, поскольку наравне с размером и выравненностью определяет рыночную стоимость зерна. Существенное влияние на урожайность растений оказывают и характеристики формы колоса (Dobrovolskaya et al., 2015), к которым относятся тип колоса, его длина и профиль, число колосков в колосе. Важны для селекционеров также остистость–безостость колосьев, число плодоносных и стерильных колосков (озерненность), ломкость колоса, свойства колосковой чешуи и др. (Konopatskaia et al., 2016).

Параметры зерновок и колоса контролируются множеством генов, тесно связанных с архитектурой соцветия злаков (Sreenivasulu, Schnurbusch, 2012). Идентификация многих генов является сложной задачей (Dobrovolskaya et al., 2015). Часто для этого используют поиск локусов количественных признаков (quantitative trait loci – QTL) (Boden et al., 2015), требующий анализа большого количества растений при поиске ассоциаций между фенотипом и наборами генетических маркеров. Ранее были идентифицированы некоторые основные QTL и гены, ассоциированные с доместикацией и обусловливающие морфологию зерновок пшеницы, ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и риса (*Oryza sativa* L.) (Jantasuriyarat et al., 2004; Nalam et al., 2007). Это локус Q (признак «спельтоидность» – spelt factor), локализованный на длинном плече хромосомы 5A, локус Tg (признак «жесткая чешуя» – tenacious glume), локализованный на коротком плече хромосомы 2D, и локус Sog (признак «мягкая чешуя» – soft glume), локализованный на хромосоме 2A (Sood et al., 2009; Amagai et al., 2017). Многие вопросы, касающиеся генетики признаков, обусловливающих структуру колоса, таких как число, размер и форма зерен, включая их вариабельность и функциональное влияние на фенотип, для большинства видов пшеницы в настоящее время не изучены.

Для идентификации генов, которые могут быть ассоциированы с признаками зерновки и колоса, важным направлением является анализ вариаций указанных признаков в специально собранных коллекциях растений (Гончаров, 2012; Youssef et al., 2017). Например, в работе (Boden et al., 2015) для идентификации локусов, ассоциированных со структурой колоса, было проанализировано более 13 тыс. колосьев. Сложность подобных исследований обусловлена необходимостью получения больших массивов фенотипических данных, включающих в себя промеры тысяч растений. Такой анализ обычно проводится экспертом визуально, что весьма трудоемко, особенно если требуется исследовать детали строения колоса или формы зерновок. Альтернативой этому трудоемкому анализу является использование новых технологий высокопроизводительного фенотипирования, основанных на методе компьютерного анализа цифровых изображений (Strange et al., 2015). Такие технологии обеспечивают высокую степень автоматизации сбора информации о фенотипе, ее хранение в базах данных, интеграцию с данными о генотипе и параметрах окружающей среды (Генаев и др., 2012), создают основу для интеллектуального анализа полученной информации.

В основе технологий высокопроизводительного фенотипирования лежит разработка протоколов получения цифровых изображений, которые служат исходными данными при применении методов автоматического фенотипирования (Afonnikov et al., 2016). При разработке автоматических методов фенотипирования важной задачей является экспертная оценка фенотипических характеристик растений для их дальнейшего использования в обучении и верификации компьютерных алгоритмов. Эта задача особенно актуальна при фенотипирования колоса, поскольку множество морфологических признаков колоса принято оценивать качественно, а не количественно. Например, по данным портала http://www.cropontology.org/ большинство признаков колоса пшеницы не имеют количественной оценки. К таким признакам относятся форма, в том числе плотность колоса, цвет колоса (колосковых чешуй), опушение колосковых чешуй, тип остистости, цвет остей, форма колоса, ломкоколосость и др. В связи с этим применение подходов цифрового анализа изображений для описания формы зерна и колоса, а также их сопоставление с оценками признаков колоса, выполненных экспертами-селекционерами, представляется актуальной задачей, которая позволит существенно ускорить процесс получения данных за счет автоматизации и увеличить точность оценки фенотипических параметров зерна и колоса, устранив субъективизм и неточность измерений, присущих человеку.

В настоящей работе рассматривается компьютерная информационная система SpikeDroidDB, которая позволяет

Table 1. Description of ear phenotypes

Attribute	Data type	Brief description	Ontology term CropOntology.org
Spike number	int	Spike number in the plant, number one being assigned to the main ear	
Spike length	real	Spike length, cm	CO_321:0000056
Spike front width	real	Spike front width, cm	
Spike side width	real	Spike side width , cm	
Spikelet count	int	Number of spikelets	CO_321:0000058
Density index	real	Spikelet density D = [(A–1) × 10]/B, where (A–1) is the number of spikelets in the spike without including the top spikelet; B, rachis length, cm	CO_321:0000055
Spike color	set	Spike color: red, black, or white	
Hairiness on spike scales	bool	Pubescence on spike scales: present or absent (binary character)	
Hairiness on the axis of the spike	bool	Rachis pubescence: present or absent (binary character)	
Hairiness at the site of attachment of the spikelet to the awn	bool	Pubescence at the joint the spikelet and the rachis: present or absent (binary character)	
Awn type	set	Awnedness: awnless, awned (awns longer or as long as the spike), short-awned (awns shorter than the spike), half-awned (upward awns are longer than downward)	CO_321:0000027
Awn color	set	Awn color: red, white, black, purple, amber, or mixed	CO_321:0000960
Spike threshability	bool	Spike fragility	CO_321:0000659
Shape type	set	Spike shape: speltoid, normal, or compact	

хранить цифровые изображения колоса, аннотировать их фенотипические характеристики (всего 14 признаков), предоставляет гибкую систему запросов для доступа к данным. В системе SpikeDroidDB для растений взаимосвязанным образом описаны генотип, фенотип, место и условия выращивания. Предложено несколько стандартизованных проколов получения цифровых изображений колоса. С использованием SpikeDroidDB произведена оцифровка и аннотация коллекции колосьев гибридов F_2 от скрещивания австралийского сорта мягкой пшеницы Triple Dirk с образцом KU506 китайской пшеницы *Triticum yunnanense*. Проведен анализ изменчивости колосьев по форме, длине и ширине.

Материалы и методы

Модель данных

Характеристики колоса, которые мы использовали для описания его фенотипа, приведены в табл. 1. Логическая модель данных включает таблицу «растение», связанную с тремя блоками информации – коллекцией, окружающей средой и фенотипом колоса. Текущая версия базы данных содержит пять таблиц и четыре отношения между ними (рис. 1).

Таблица Plant (растение) включает описание сорта (образца) растения или линии, ссылки на родительские растения, поколение и посевной номер каждого проанализированного растения. Растение связано с таблицами Collection (коллекция), Environment (место произрастания) и Spike (описание колоса). Для коллекции указывается ее держатель и аффилиация (описание). Окружающая среда в текущей версии базы данных (БД) описывается местом произрастания, содержит геоданные и дату вегетации. Фенотип колоса описывается набором из 14 признаков, представленных в табл. 1. Мы проанализировали онтологию пшеницы портала CropOntology.org и выполнили привязку признаков, содержащихся в нашей базе данных, с признаками онтологии CropOntology.org в тех случаях, где это представлялось возможным.

Методика съемки колосьев пшеницы

В системе SpikeDroidDB с каждым колосом можно соотнести несколько изображений. Для каждого изображения указывается протокол, с помощью которого оно было получено. Для съемки мы использовали два протокола получения цифровых изображений зрелых колосьев. Нами был выбран синий фон, как наиболее контрастный к цвету колосьев и позволяющий легко отделить объект от фона. Для оценки масштаба и калибровки цвета использовали маркер X-Rite Mini ColorChecker Classic (http://xritephoto.com/colorchecker-targets), который находился в области кадра. Съемка колосьев проводилась в двух вариантах: в первом колос располагается вертикально перед синим фоном, второй вариант съемки предусматривает горизонтальное положение колосьев на стекле над синим фоном.

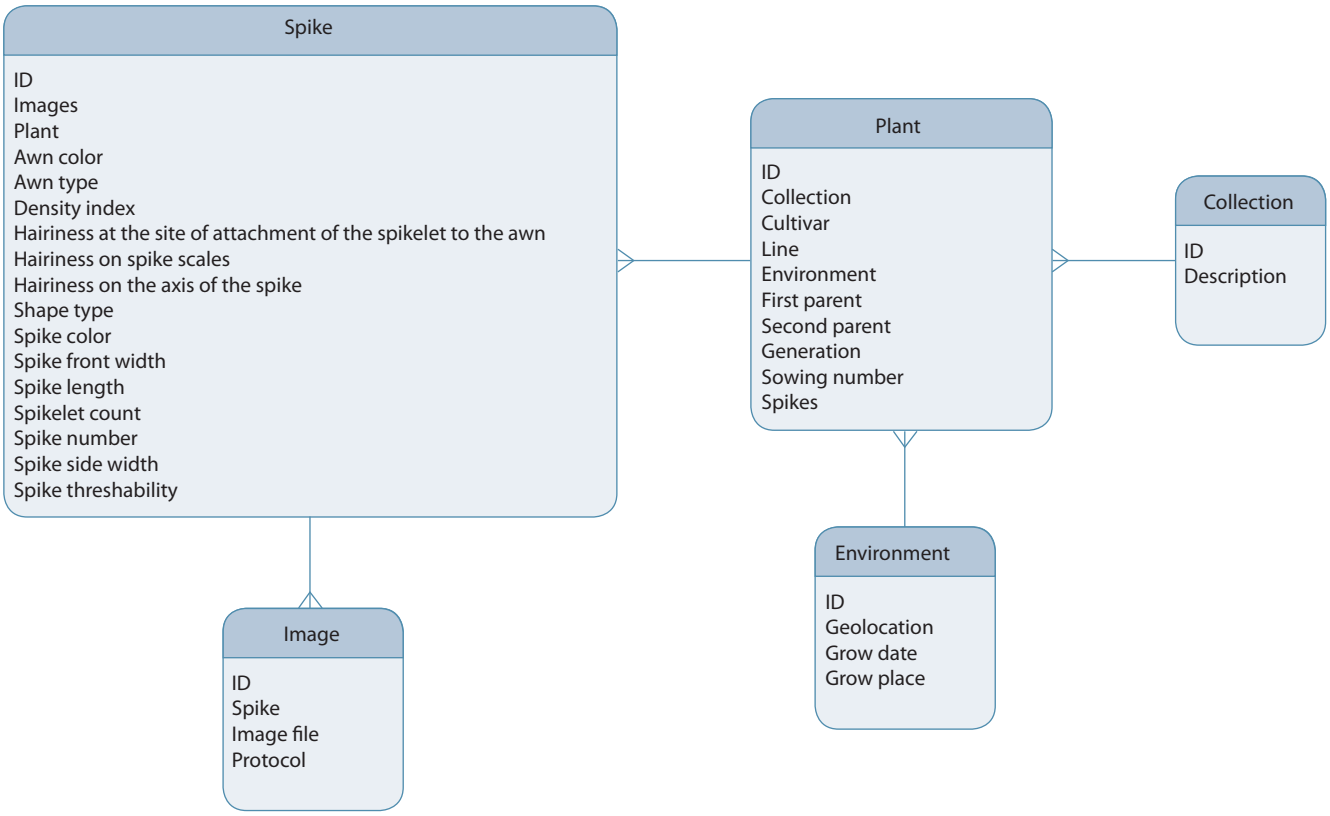


Fig. 1. Relational data model in SpikeDroidDB database.

Протокол 1. Колос находится вертикально перед синим фоном. Опорой колоса и маркера ColorChecker служат прищепки, которые помещаются на штатив. С помощью данного метода, вращая колос относительно его оси, можно производить съемку колоса в четырех или более проекциях. Использовались два импульсных источника света Falcon TE-300 (мощность вспышки выставлена в положение 2.5), в качестве модификаторов света были взяты софтбоксы Falcon 60 × 60 см; камера Canon 350D, объектив EF-S 18–55 мм f/3.5-5.6. Параметры съемки: выдержка 1/160, диафрагма 11, ISO 100, фокусное расстояние 55 мм, съемка в RAW-формат; баланс белого устанавливался при проявке RAW-файла по белому фону ColorChecker. Расстояние от объекта до фона 60 см, до источников света 100 см, до фотоаппарата 120 см. Фотоаппарат, закрепленный на штативе, объект и источники света были расположены на одной высоте, комфортной для работы фотографа. Схема размещения камеры и источников света относительно объекта и изображение, полученное в результате выполнения протокола, приведены на рис. 2.

Протокол 2. Колос лежит на стекле просветного столика, который располагается на столе с поверхностью синего цвета (фон). Фотокамера фиксируется на стойке типа «журавль» над стеклом. С помощью этого метода можно производить съемку лицевой проекции колоса. Для освещения использовали два импульсных источника света Falcon TE-300 (мощность вспышки выставлена в положение 1.0 и 1.4), в качестве модификаторов – софтбоксы Falcon 60 × 60 см; камера Canon 600D, объектив EF-S 28–135 мм f/3.5–5.6. Параметры съемки: выдержка 1/160, диафрагма 10, ISO 200, фокусное расстояние 112 мм, съемка в RAW-формат; баланс белого устанавливался при проявке RAW-файла по белому фону ColorChecker. Расстояние от фотоаппарата до объекта 70 см, от источников света до объекта 60 см, высота стола 60 см, высота просветного столика со стеклом (расстояние от объекта до синего фона) 20 см. Схема размещения камеры и источников света относительно объекта и изображение, полученное в результате выполнения протокола, приведены на рис. 3.

Протокол 2, в отличие от протокола 1, позволяет избавиться от прищепок для фиксации колоса. В дополнение к этому, благодаря расположению стекла на определенной высоте над поверхностью фона, удается избежать теней под объектом. Однако протокол 2 не позволяет фиксировать колос под произвольным углом вращения вокруг своей оси при съемке.

Технологии реализации системы SpikeDroidDB

Система SpikeDroidDB была разработана на основе системы управления контентом Drupal 8 (https://www.drupal.org/8). В качестве хранилища данных используется реляционная база под управлением MySql СУБД, которая развернута на сервере баз данных ЦКП «Биоинформатика» под управлением CentOS Linux.

Для разработки SpikeDroidDB мы использовали следующие модули Drupal 8: Conditional fields – позволяет задавать правила появления/сокрытия полей в зависимости от установленных условий; Display suit – расширяет возможности представлений материалов контента Drupal;

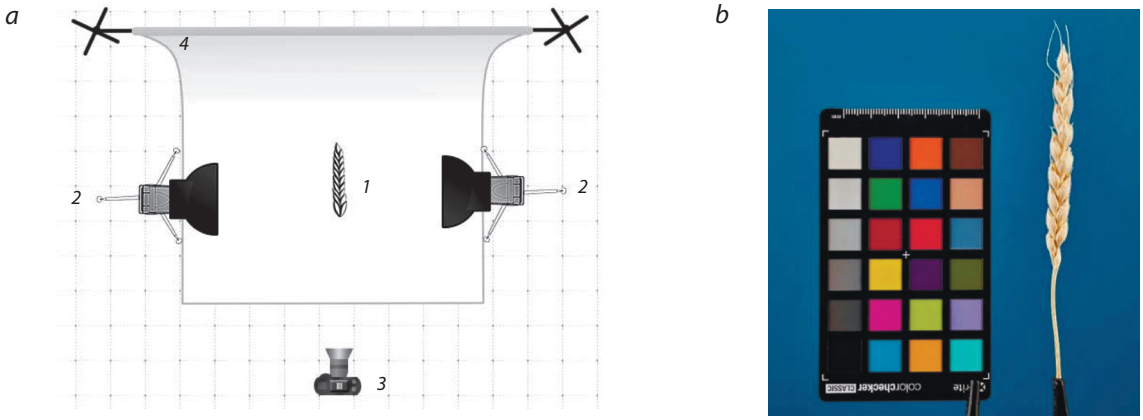


Fig. 2. Method of wheat ear photography in which the ear is placed vertically against a blue background.

(*a*) Location of the camera and lamps relative to the subject: *1*, ear; *2*, lamps; *3*, camera; *4*, paper background. (*b*) An image obtained by this method.

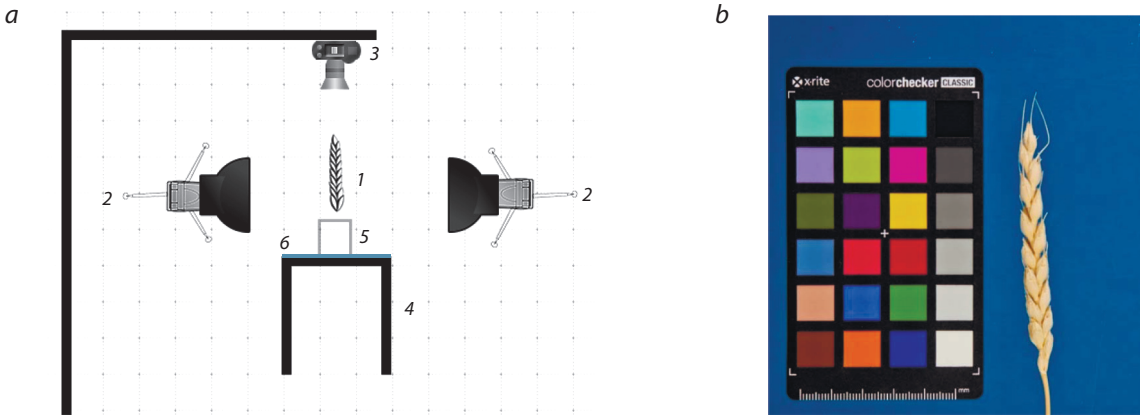


Fig. 3. Method of wheat ear photography in which the ear is placed vertically against a blue background.

(*a*) Location of the camera and lamps relative to the subject: *1*, ear; *2*, lamps; *3*, camera fixed on a stand; *4*, stage; *5*, light table; *6*, background. (*b*) An image obtained by this method.

Field_group – дает возможность группировать поля для управления ими как единым целым; Geolocation – добавляет новый тип полей-геолокаций, что позволяет использовать Google Places API; Charts – модуль для создания диаграмм и графиков.

Web-интерфейс системы SpikeDroidDB разработан при помощи технологии адаптивной верстки, что обеспечивает возможность работы системы с различных типов устройств: мобильных телефонов, персональных или планшетных компьютеров.

Растительный материал

В работе использованы межвидовые гибриды гексаплоидных пшениц. Форму колоса изучали у растений F_2 гибридов от скрещивания австралийского сорта мягкой пшеницы Triple Dirk с образцом KU506 китайской пшеницы *Triticum yunnanense* (син. *Triticum spelta* ssp. *yunnanense* (King ex S.L. Chen) N.P. Gontsch.). Растения выращивали при индивидуальной изоляции в гидропонной теплице при стандартных условиях влажности, температуры и освещения. Анализ структуры колоса (длина, ширина, остистость–безостость) проводили согласно стандартной методике. Плотность колоса определяли по формуле D = [(A–1) × 10]/B, где (A–1) – число колосков в колосе без верхушечного колоска; B – длина (см) стержня колоса (Фляксбергер, 1935).

Результаты и обсуждение

Модуль интерфейса системы SpikeDroidDB

Главная страница системы SpikeDroidDB расположена по адресу http://spikedroid.biores.cytogen.ru/. Она содержит краткую информацию о базе данных, ссылки для входа в систему или регистрации и ссылки на основные блоки информации в базе данных. Пользователь может получить доступ к базе, зарегистрировавшись на сайте. Зарегистрированный пользователь имеет возможность добавлять и аннотировать собственные растения. Для того чтобы просмотреть список растений, информация о которых доступна в базе, необходимо с главной страницы перейти по ссылке Plants. После этого осуществляется переход на страницу списка растений (рис. 4).

Plants

Sowing number: First parent:

Second parent: Generation: F

Apply

Sowing number	First parent	Second parent	Spikes	Generation	Environment	Collection	QR code
8798	TDB	KU506	0432012415	F2	Novosibirsk	Wheat ear collection of Goncharov N.P.	
8861	TDB	KU506	2542995528	F2	Novosibirsk	Wheat ear collection of Goncharov N.P.	
6450			4966434440	F1	Novosibirsk	Wheat ear collection of Goncharov N.P.	

Fig. 4. Visualization of the list of plants in the information system SpikeDroidDB.

На этой странице представлены сведения о растениях в виде таблицы, в колонках которой отображаются следующие параметры: посевной номер, данные о родителях, ссылка на информацию о колосьях, поколение, сведения о месте произрастания и коллекции растений. В крайней правой колонке для каждого растения приведена ссылка на его QR-код. QR-код является матричным (двумерным) штрих-кодом, который может быть сканирован камерой мобильного устройства. В нашей базе он присваивается каждому растению (см. рис. 4), может быть распечатан на бумаге и размещен на конверте с образцами колосьев. QR-код представляет собой закодированную интернет-ссылку на запись БД, соответствующую растению, и может быть прочитан с помощью мобильного устройства (Генаев и др., 2012). С помощью QR-кода интерфейс SpikeDroidDB на мобильном устройстве позволяет быстро пройти по ссылке к записи образца, хранящегося в конверте, и внести информацию об измеренных фенотипических параметрах растений в ходе эксперимента непосредственно в базу данных, минуя записи в полевых и лабораторных журналах.

На странице описания растения (рис. 5) отображается информация о генотипе растения, данные о месте

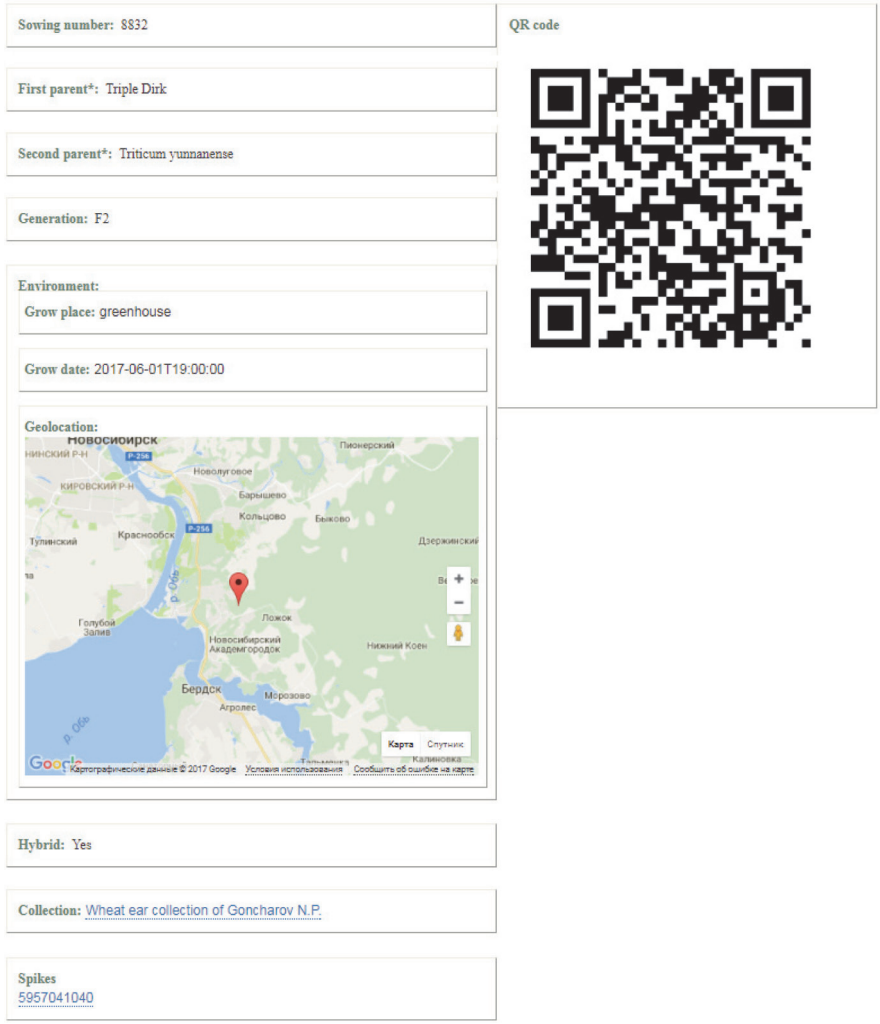


Fig. 5. Description of a plant in the information system SpikeDroidDB.

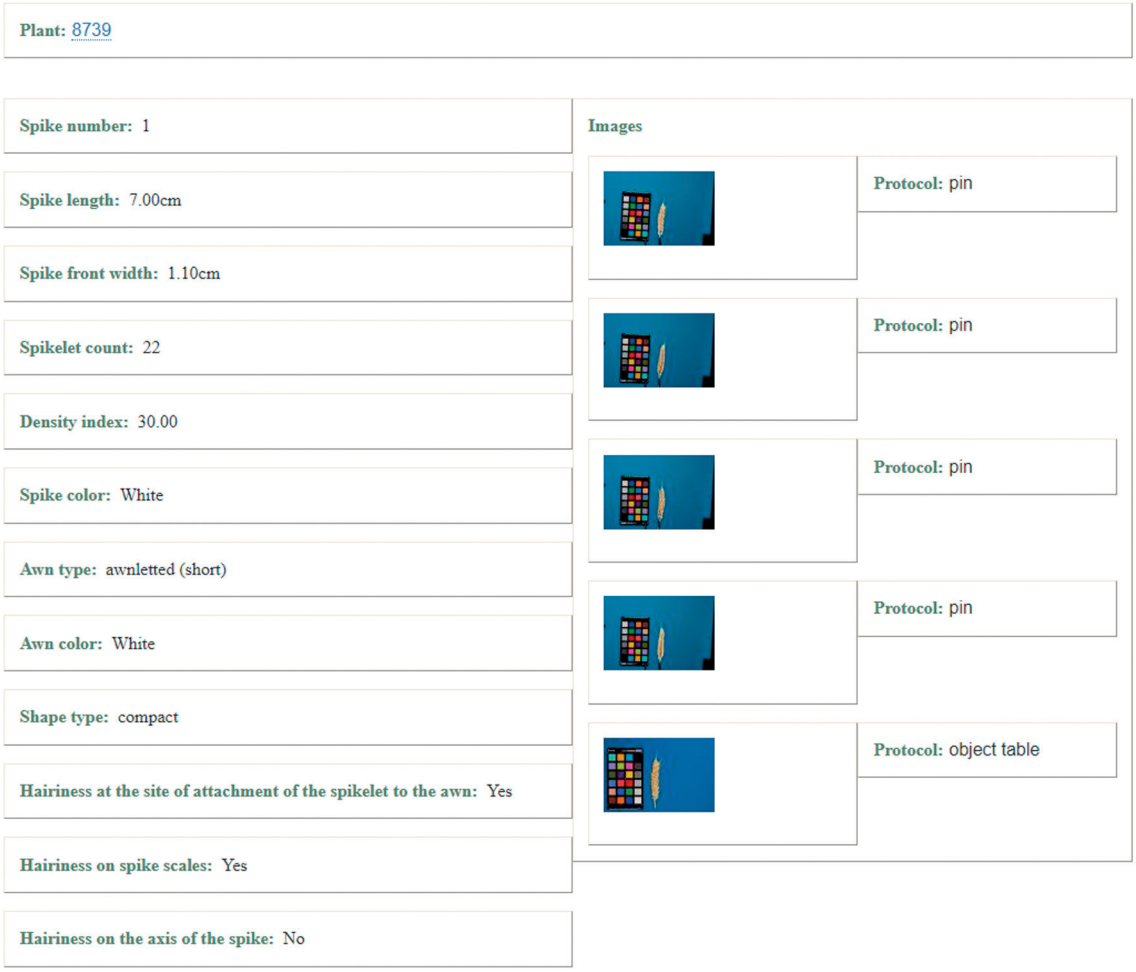


Fig. 6. Description of an ear phenotype in the information system SpikeDroidDB.

произрастания (показаны с помощью метки на карте). Приводятся ссылки на описание фенотипа колоса и коллекции и QR-код для доступа к странице растения. В будущем мы планируем расширить описание окружающей среды, добавив фенологические данные и данные об условиях выращивания растений.

На странице описания фенотипа колоса отображаются характеристики колоса (рис. 6). Список всех возможных характеристик перечислен выше (см. табл. 1). С каждым колосом можно соотнести набор изображений. Для каждого изображения указывается протокол, с помощью которого оно было получено.

Информационное содержание SpikeDroidDB

Текущая версия базы данных содержит описание коллекции колосьев гибридов F_2 от скрещивания австралийского сорта мягкой пшеницы Triple Dirk с образцом KU506 китайской пшеницы *Triticum yunnanense* и их родительских форм. Коллекция включает в себя 104 растения, для которых получено 230 изображений колосьев. Аннотирование колосьев осуществлялось экспертом по списку морфологических характеристик, приведенных в табл. 1.

Результаты разделения колосьев по некоторым признакам представлены в табл. 2. Видно, что доля растений с компактным колосом во втором поколении существенно меньше (6 %), чем двух других типов колосьев (34 % для нормального и 60 % для спельтоидного колоса). Проанализировав данные табл. 2, можно определить тип наследования имеющихся в БД признаков. При этом можно сделать вывод, что компактная форма колоса контролируется дигенно двумя рецессивными генами ($\chi^2_{1:15} = 0.04$), безостость и опушение на месте прикрепления колоса к оси – моногенно по доминантному типу ($\chi^2_{3:1}$ равны 0.21 и 0.82 соответственно), опушение на оси колоса контролируется двумя доминантными генами ($\chi^2_{15:1} = 3.32$).

На рис. 7 показано рассеяние колосьев гибридов F_2 различной формы по длине и ширине. Ширина спельтоидных колосьев, как правило, составляет менее 1 см, а компактных, наоборот, превышает 1 см. Нормальный тип колоса демонстрирует высокое разнообразие как по длине (от 6 до 11 см), так и по ширине (от 0.7 до 1.5 см).

Гистограмма распределения колосьев по плотности *D* (см. Материалы и методы) для F_2 гибридов от скрещивания австралийского сорта мягкой пшеницы Triple Dirk с образцом KU506 китайской пшеницы *T. yunnanense* представлена на рис. 8. Средние значения этого признака для F_2 гибридов составили 22.43 дм$^{-1}$, для родителей Triple Dirk и KU506 – 20.40 и 29.66 дм$^{-1}$ соответственно.

Table 2. Sorting of ears of F2 hybrids from the crossing of the Australian soft wheat variety Triple Dirk to the KU506 accession of Chinese wheat *T. yunnanense* by various characters

Character	Character value	Number of spikes
Spike shape	Compact	6
	Normal	35
	Speltoid	63
Awn condition	Awnless	80
	Short-awned	24
Hairiness on spike scales	Present	68
	Absent	36
Hairiness on the axis of the spike	Present	93
	Absent	11
Hairiness at the site of attachment of the spikelet to the axis	Present	74
	Absent	30

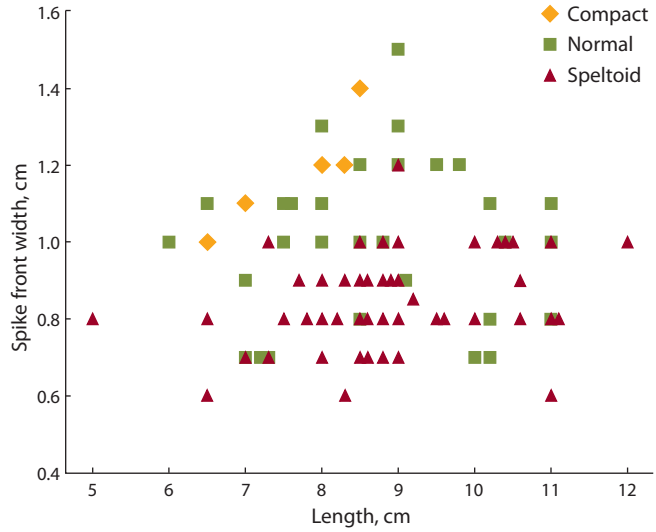


Fig. 7. Ear width– length scatterplot of F_2 hybrids from the crossing of the Australian soft wheat variety Triple Dirk to the KU506 accession of Chinese wheat *T. yunnanense*. The legend shows symbolic designations of ear types.

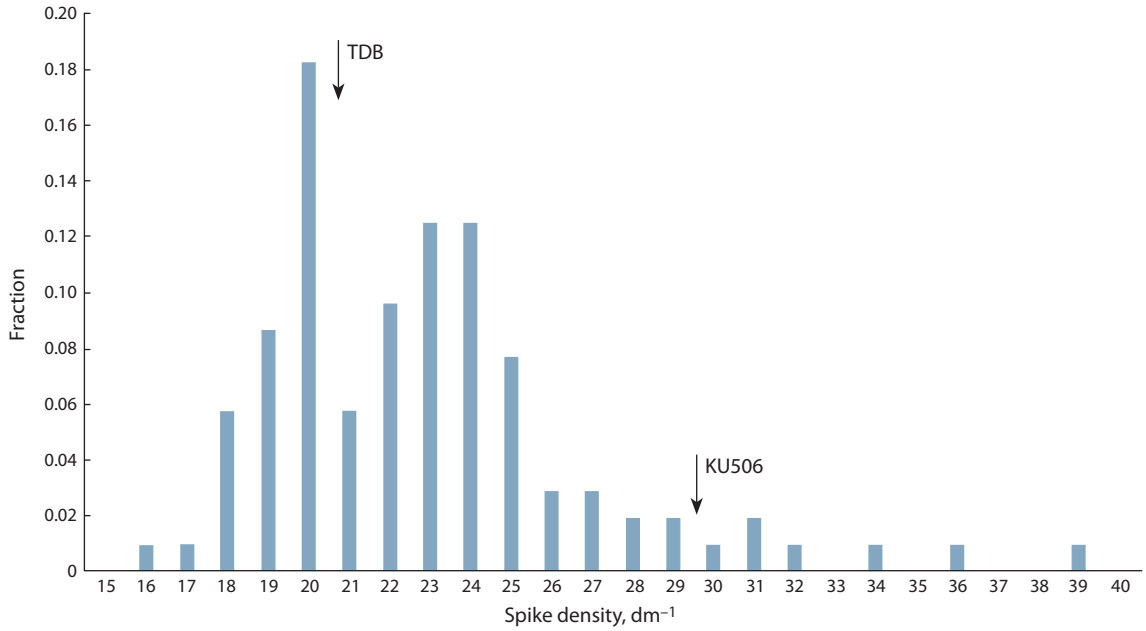


Fig. 8. Ear density (D) distribution of ears of F_2 hybrids from the crossing of the Australian soft wheat variety Triple Dirk to the KU506 accession of Chinese wheat *T. yunnanense*.

Arrows indicate the mean values of this trait for parental genotypes.

На гистограмме хорошо заметны два больших пика, один из которых соответствует низкой плотности колоса (20 дм$^{-1}$), а другой – более высокой (23.5 дм$^{-1}$). Это свидетельствует о расщеплении популяции F_2 по плотности колоса на две группы.

Заключение

Настоящая работа демонстрирует полезность компьютерных подходов для сбора, хранения, идентификации и классификации информации, связанной с признаками структуры колоса пшеницы, которые интересуют исследователей при работе с зерновыми злаками, что, как известно, очень трудоемко делать «вручную». Предлагаемая методика, реализованная в виде информационной системы SpikeDroidDB, несомненно, будет полезным инструментом как при всестороннем анализе коммерческих сортов, определенных образцов и селекционного материала разного уровня селектируемости, так и при проведении генетического анализа в гибридных популяциях. Гибридная комбинация, используемая в этом исследовании в качестве модельной, позволила оценить возможности предлагаемой системы и отработать оптимальные режи-

мы фотосъемки. Ее дальнейшие испытания должны быть проведены с акцентом на сбор новых данных без «ручного труда» исследователей, обогащение базы данных новой точной информацией и возможность ее использования более широким кругом исследователей.

Acknowledgments

The development of the SpikeDroidDB database structure and interface and of protocols for obtaining digital images of ears were supported by the Russian Science Foundation, project 17-74-10148. The database was implemented on the equipment of the Bioinformatics Shared Access Center with the support of State Budgeted Project 0324-2018-0017.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Afonnikov D.A., Genaev M.A., Doroshkov A.V., Komyshev E.G., Pshenichnikova T.A. Methods of high-throughput plant phenotyping for large-scale breeding and genetic experiments. Russ. J. Genet. 2016;52(7):688-701. DOI 10.1134/S1022795416070024.

Amagai Y., Burdenyuk-Tarasevych L.A., Goncharov N.P., Watanabe N. Microsatellite mapping of the loci for false glume and semi-compact spike in *Triticum* L. Genet. Resour. Crop Evol. 2017;64:2105-2115. DOI 10.1007/s10722-017-0500-x.

Boden S.A., Cavanagh C., Cullis B.R., Ramm K., Greenwood J., Finnegan E.J., Trevaskis B., Swain S.M. *Ppd-1* is a key regulator of inflorescence architecture and paired spikelet development in wheat. Nature Plants. 2015;1:14016. DOI 10.1038/nplants.2014.16.

Dobrovolskaya O., Pont C., Sibout R., Martnek P., Badaeva E., Murat F., Chosson A., Watanabe N., Prat E., Gautier N., Gautier V., Poncet C., Orlov Yu., Krasnikov A., Berges H., Salona E., Laikova L., Salse J. FRIZZY PANICLE drives supernumerary spikelets in bread wheat. Plant Physiol. 2015;167(1):189-199. DOI 10.1104/pp.114.250043.

Fljaksberger K.A. Wheats – Genus *Triticum* L. pr. p. Kulturnaya flora SSSR. T. 1. Khlebnye zlaki. [Cultural flora of the USSR. Vol 1. Cereals.]. Moscow; Leningrad: Sel'hozgiz Publ., 1935;19-434. (in Russian)

Genaev M.A., Doroshkov A.V., Pshenichnikova T.A., Morozova E.V., Simonov A.V., Afonnikov D.A. Informational support of the breeding experiment in wheat in the WheatPGE system. Matematicheskaya biologiya i bioinformatika = Mathematical Biology and Bioinformatics. 2012;7(2):410-424. (in Russian)

Goncharov N.P. Sravnitelnaya genetika pshenits i ikh sorodichey [Comparative genetics of wheat and their relatives]. Novosibirsk: "Geo" Publ., 2012;523. (in Russian)

Jantasuriyarat C., Vales M.I., Watson C., Riera-Lizarazu O. Identification and mapping of genetic loci affecting the free-threshing habit and spike compactness in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 2004;108(2):261-273. DOI 10.1007/s00122-003-1432-8.

Konopatskaia I., Vavilova V., Blinov A., Goncharov N.P. Spike morphology genes in wheat species (*Triticum* L.). Proc. Latv. Acad. Sci. Sect. B. 2016;70(6):345-355. DOI 10.1515/prolas-2016-0053.

Nalam V.J., Vales M.I., Watson C., Johnson E.B., Riera-Lizarazu O. Map-based analysis of genetic loci on chromosome 2D that affect glume tenacity and threshability, components of the free-threshing habit in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 2007;116(1):135-145. DOI 10.1007/s00122-007-0653-7.

Sood S., Kuraparthy V., Bai G., Gill B.S. The major threshability genes soft glume (*sog*) and tenacious glume (*Tg*), of diploid and polyploid wheat, trace their origin to independent mutations at non-orthologous loci. Theor. Appl. Genet. 2009;119(2):341-351. DOI 10.1007/s00122-009-1043-0.

Sreenivasulu N., Schnurbusch T. A genetic playground for enhancing grain number in cereals. Trends Plant Sci. 2012;17(2):91-101. DOI 10.1016/j.tplants.2011.11.003.

Strange H., Zwiggelaar R., Sturrock C., Mooney S.J., Doonan J.H. Automatic estimation of wheat grain morphometry from computed tomography data. Funct. Plant Biol. 2015;42(5):452-459. DOI 10.1071/FP14068.

Youssef H.M., Mascher M., Ayoub M.A., Stein N., Kilian B., Schnurbusch T. Natural diversity of inflorescence architecture traces cryptic domestication genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). Genet. Resour. Crop Evol. 2017;64(5):843-853. DOI 10.1007/s10722-017-0504-6.

Об эквивалентности использования запаздывающих аргументов и уравнений переноса при моделировании динамических систем

В.А. Лихошвай ✉, Т.М. Хлебодарова

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

Разработка и совершенствование методов математического моделирования биологических систем – актуальное направление математической биологии. В статье рассмотрена система общего вида дифференциальных уравнений первого порядка с постоянными запаздывающими аргументами, широко используемая в качестве математического аппарата для описания и анализа динамики функционирования биологических систем практически на всех уровнях их организации. К основной особенности данного класса моделей относится то, что некоторые процессы, явно протекающие в биосистемах (например, стадии элонгации синтеза ДНК, РНК, белков), описываются в скрытой форме и в модели проявлены только через запаздывающие аргументы. В настоящей работе мы предлагаем алгоритм переписывания систем с постоянными запаздывающими аргументами в эквивалентной форме, представляющей систему дифференциальных уравнений в частных производных с уравнениями переноса. Алгоритм переписывания универсален, поскольку не накладывает каких-либо специальных условий на вид правых частей систем с запаздывающими аргументами. Предложенный алгоритм является многовариантным, т. е. позволяет по одной системе дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами выписывать несколько специальных систем дифференциальных уравнений в частных производных, которые на множестве решений эквивалентны исходной системе с запаздывающим аргументом. Полученные результаты демонстрируют, что постоянные запаздывающие аргументы и уравнения переноса с постоянными коэффициентами являются равноценными математическими аппаратами для описания всех типов динамических процессов переноса энергии и/или вещества в биологических, химических и физических системах. В то же время системы уравнений с частными производными позволяют описывать в явном виде, в форме уравнений переноса, те процессы, которые скрыты в запаздывающем аргументе. Это весьма важное свойство, если речь идет о моделировании молекулярно-генетических систем, в которых процессы синтеза ДНК, РНК и белков протекают с неравномерной скоростью и в определенных задачах требуют учета, что легко можно сделать в моделях, построенных с использованием математического аппарата частных производных.

Ключевые слова: обыкновенные дифференциальные уравнения; запаздывающий аргумент; уравнения в частных производных; уравнения переноса; моделирование; динамические системы; математическая биология.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. Об эквивалентности использования запаздывающих аргументов и уравнений переноса при моделировании динамических систем. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):141-144. DOI 10.18699/VJ18.341

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. On the equivalence of delayed arguments and transfer equations for modeling dynamic systems. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):141-144. DOI 10.18699/VJ18.341 (in Russian)

Received 11.09.2017
Accepted for publication 03.11.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: likho@bionet.nsc.ru

On the equivalence of delayed arguments and transfer equations for modeling dynamic systems

V.A. Likhoshvai ✉, T.M. Khlebodarova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Development and improvement of mathematical methods used in modeling biological systems represents a topical issue of mathematical biology. In this paper, we considered a general form of a system of first-order delayed differential equations, traditionally used for describing the function of biological systems of different hierarchical levels. The main feature of this class of models is that some inherent processes (for example, elongation of DNA, RNA, and protein synthesis) are described in a subtle form and can be explicitly specified only through delayed arguments. In this paper, we propose an algorithm for rewriting systems with constant delayed arguments in an equivalent form that represents a system of partial differential equations with transfer equations. The algorithm is universal, since it does not impose any special conditions on the form of the right-hand parts of systems with delayed arguments. The proposed method is a multivariant algorithm. That is, based on one system of differential equations with delayed arguments, the algorithm allows writing out a number of special systems of partial differential equations, which are equivalent to the original system with delayed argument in the entire solution set. The results obtained indicate that delayed arguments and transfer equations are equivalent mathematical tools for describing all types of dynamic processes of energy and/or matter transfer in biological, chemical, and physical systems, indicating a deep-level similarity between properties of dynamic systems, regardless of their origin. At the same time, those processes that are subtle when retarded argument is used can be explicitly described in the form of transfer equations using systems of partial differential equations. This property is extremely important for the modeling of molecular genetic systems in which processes of DNA, RNA, and protein synthesis proceed at variable rates and need to be considered in certain problems, what can easily be done in models constructed using the mathematical tool of partial derivatives.

Key words: ordinary differential equations; delayed argument; partial differential equations; transfer equations; modeling; dynamical systems; mathematical biology.

Биохимическая природа биологических процессов позволяет моделировать динамику их функционирования системами дифференциальных уравнений первого порядка с запаздывающими аргументами (Лихошвай и др., 2003, 2004; Демиденко, Лихошвай, 2005; Likhoshvai et al., 2013). Этот подход широко используется при моделировании молекулярно-генетических процессов (Romond et al., 1999; Monk, 2003; Когай и др., 2015; Likhoshvai et al., 2015, 2016; Suzuki et al., 2016; Khlebodarova et al., 2017; Kogai et al., 2017), включая динамику клеточных циклов (Busenberg, Tang, 1994; Srividhya, Gopinathan, 2006; McIsaac et al., 2011; Gérard, Goldbeter, 2012; Yang, Ferrell, 2013; Gelens et al., 2015), а также инфекционные (Nelson et al., 2000; Nelson, Perelson, 2002), популяционные (Lu et al., 2017) и другие процессы (см. обзор (Bocharov, Rihan, 2000)). В общем случае такие системы имеют вид

$$\begin{cases} \dfrac{d}{dt}x_i(t) = f_i\left(t, X(t), G_i(X(t))|_{T_i}\right), \ i = 1, \ldots, n, \\ X(t) = (x_1(t), \ldots, x_n(t)), \\ G_i(X(t))|_{T_i} = \left(g_{i,1}(x_1(t-\tau_{i,1})), \ldots, g_{i,n}(x_n(t-\tau_{i,n}))\right), \\ T_i = (\tau_{i,1}, \ldots, \tau_{i,n}). \end{cases} \quad (1)$$

В системе уравнений (1) $X(t)$ представляет вектор динамических переменных, характеризующий состояние целевого биологического объекта в текущий момент времени t; f_i и $g_{i,j}$ – управляющие сигналы, задающие закон изменения i-й переменной. Параметры $\tau_{i,j}$ описывают постоянные запаздывания по времени действия j-й переменной на i-й управляющий сигнал.

В настоящей работе предложен алгоритм эквивалентного представления постоянных запаздывающих аргументов τ уравнениями переноса в моделях динамических систем.

Алгоритм замены запаздывающих аргументов на уравнения переноса

Пусть $x_i(t)$ являются решением системы (1) с начальными функциями:

$$x_i(t-\tau_i) = \phi_i(t), \ 0 \le t \le \tau_i, \qquad \tau_i = \max(\tau_{1,i}, \ldots, \tau_{n,i}), \ i = 1, \ldots, n. \quad (2)$$

Выпишем систему

$$\begin{cases} \dfrac{\partial}{\partial t} z_{i,j}(t, s_{i,j}) + \dfrac{\partial}{\partial s_{i,j}} z_{i,j}(t, s_{i,j}) = 0, \\ 0 \le s_{i,j} \le \tau_i, \ i, j = 1, \ldots, n, \\ \dfrac{d}{dt}x_i(t) = f_i\left(t, X(t), z_{i,1}(t, \tau_{i,1}), \ldots, z_{i,n}(t, \tau_{i,n})\right), \ i = 1, \ldots, n. \end{cases} \quad (3)$$

В ней первые n^2 уравнений представляют классические уравнения переноса, в которых i-я переменная переноса изменяется на интервале $[0, \tau_i]$, $i = 1, \ldots, n$, (n^2+1)-е, …, (n^2+n)-е уравнения выписываются на основе системы (1).

Зададим краевые условия

$$z_{i,j}(t, 0) = g_{i,j}(x_j(t)), \ i, j = 1, \ldots, n \quad (4)$$

и начальные данные

$$x_i(0) = \phi_i(\tau_i), \ z_{i,j}(0, s_{i,j}) = g_{i,j}(\phi_i(\tau_{i,j} - s_{i,j})), \qquad 0 \le s_{i,j} \le \tau_{i,j}, \ i, j = 1, \ldots, n. \quad (5)$$

Зададим вектор-функцию

$$\begin{cases} z_{i,j}(t, s_{i,j}) = g_{i,j}(x_j(t - s_{i,j})), \ t - s_{i,j} \ge 0, \\ t \ge 0, \ 0 \le s_{i,j} \le \tau_{i,j}, \ i, j = 1, \ldots, n, \\ z_{i,j}(t, s_{i,j}) = g_{i,j}\left(\phi_j(\tau_{i,j} + (t - s_{i,j}))\right), \ -\tau_{i,j} \le t - s_{i,j} \le 0. \end{cases} \quad (6)$$

Прямой подстановкой убеждаемся, что функции (6) являются решением первых n^2 уравнений переноса из (3), а совместно с функциями $x_i(t)$, $i = 1, \ldots, n$, являющимися решениями задачи Коши (1)–(2), функции (6) удовлетворяют (n^2+1)-му, …, (n^2+n)-му уравнениям из (3). Также без труда устанавливается, что $z_{i,j}(t, s_{i,j})$, $x_i(t)$, $i, j = 1, \ldots, n$, удовлетворяют краевым и начальным условиям (4) и (5) и, следовательно, являются решением задачи Коши (3)–(5).

Аналогично устанавливается, что если $z_{i,j}(t, s_{i,j})$, $x_i(t)$, $i, j = 1, \ldots, n$, являются решением задачи Коши (3)–(5), то $x_i(t)$, $i = 1, \ldots, n$, являются решением задачи Коши (1)–(2).

Этим устанавливается эквивалентность использования запаздывающих аргументов и уравнений переноса при моделировании динамических процессов.

Многовариантность алгоритма

Представленный выше алгоритм перехода от системы с запаздывающими аргументами (1) к эквивалентной системе с уравнениями переноса (2) универсален, так как не накладывает каких-либо специальных условий на вид правой части системы (1).

Особенностью данного алгоритма является многовариантность выписывания задач Коши (3)–(5) на основании заданной задачи Коши (1)–(2). Продемонстрируем это свойство на конкретной модели матричного синтеза нерегулярных полимеров (белка, РНК, ДНК).

Его простейшей моделью является уравнение

$$\frac{dx}{dt} = V(x(t-\tau)) - \beta x, \quad (7)$$

которое мы взяли из работы (Лихошвай и др., 2004).

Здесь x обозначает концентрацию конечного (целевого) продукта синтеза; V – функция, управляющая скоростью инициации синтеза; τ – время, затрачиваемое на синтез целевого продукта; β – константа скорости его утилизации.

Пусть функция $x(t)$ является решением (7) на полуоси $t \ge 0$ с начальной функцией

$$x(s-\tau) = \phi(s), \ 0 \le s \le \tau. \quad (8)$$

Перепишем систему (3) с учетом (7):

$$\begin{cases} \dfrac{\partial}{\partial t} z(t, s) + \dfrac{\partial}{\partial s} z(t, s) = 0, \ 0 \le s \le \tau, \\ \dfrac{dx(t)}{dt} = f(z(t, \tau)) - \beta x(t). \end{cases} \quad (9)$$

Положим $f(x) \equiv x$, $g(x) \equiv v(x)$. Тогда имеем следующую задачу Коши:

$$\begin{cases} \dfrac{\partial}{\partial t} z(t,s) + \dfrac{\partial}{\partial s} z(t,s) = 0, \ 0 \le s \le \tau, \\ \dfrac{dx(t)}{dt} = z(t, \tau) - \beta x(t), \end{cases}$$
$$z(t,0) = v(x(t)), x(0) = \phi(\tau), z(0,s) = v(\phi(\tau - s)), 0 \le s \le \tau, \quad (10)$$
$$\begin{cases} z_0(t,s) = v(x(t-s)), \ t - s \ge 0, \\ z_0(t,s) = v(\phi(\tau + t - s)), \ -\tau \le t - s \le 0, \ 0 \le s \le \tau, \ t \ge 0, \end{cases}$$

эквивалентную задаче (7)–(8).

Теперь положим $f(x) \equiv v(x)$, $g(x) \equiv x$. Тогда задача Коши записывается в виде

$$\begin{cases} \frac{\partial}{\partial t} z(t,s) + \frac{\partial}{\partial s} z(t,s) = 0,\ 0 \le s \le \tau, \\ \frac{dx(t)}{dt} = v(z(t,\tau)) - \beta x(t), \end{cases}$$
$$z(t,0) = x(t),\ x(0) = \phi(\tau),\ z(0,s) = \phi(\tau - s),\ 0 \le s \le \tau, \qquad (11)$$
$$\begin{cases} z_0(t,s) = x(t-s),\ t-s \ge 0, \\ z_0(t,s) = \phi(\tau + t - s),\ -\tau \le t-s \le 0,\ 0 \le s \le \tau,\ t \ge 0. \end{cases}$$

Она также эквивалентна задаче (7)–(8). Очевидно, допускаются и иные системы вида (3), эквивалентные системе (1).

Выбор наиболее подходящего варианта представления системы (3) для моделирования конкретного динамического объекта требует уже учета его специфики. Для примера обратимся вновь к задаче (7)–(8) и эквивалентным задачам (10) и (11). Уравнение (7) используем для моделирования синтеза белка, являющегося авторегулятором эффективности инициации транскрипции гена, который кодирует его структуру. Тогда функция V описывает регуляторный механизм, действующий в точке инициации транскрипции на промоторе гена, а запаздывающий аргумент описывает время, необходимое для синтеза инициированной молекулы, приобретения ею активной формы и доставки ее к точке воздействия. В этом случае представление (10) адекватно учитывает специфику моделируемого объекта, состоящую в том, что управляющее воздействие производится в момент инициации синтеза, что и учтено в структуре краевого условия системы (10). Переменная $z(t, s)$ является функцией плотности концентрации промежуточных продуктов синтеза, имеющих условную длину s/τ и присутствующих в среде в момент времени t, а $\int_{s_1}^{s_2} z(t,s)ds$ имеет смысл концентрации промежуточных продуктов синтеза, условная длина которых (s/τ) заключена в интервале $[s_1/\tau, s_2/\tau]$. При подходящем подборе границ s_1 и s_2 это может быть концентрация синтезируемой молекулы РНК или полипептида определенной длины. Напротив, система (11) подобными свойствами не обладает. Рассмотренный пример позволяет сформулировать следующий полезный прием для выбора более адекватного представления системы (1)–(2) в виде системы (3)–(5). Для этого необходимо, чтобы моменты приложения управляющих функций в начально-краевой задаче (3)–(5) совпадали с точками их приложения в задаче Коши (1)–(2).

Обсуждение и заключение

Операторы дивергенции, входящие в уравнения переноса, являются традиционными членами дифференциальных уравнений математической физики. Они, например, использованы Максвеллом при построении электромагнитной теории и входят в уравнение Фоккера–Планка, которое впервые было применено для статистического описания броуновского движения частиц в воде, а в настоящее время широко используется при моделировании не только физических и химических процессов, но и биологических, например популяционной плотности нейронов, внутриклеточного транспорта с помощью моторных белков и др. (Risken, 1996; Harrison et al., 2005; Bhat, Gopalakrishnan, 2016). Операторы дивергенции входят также в уравнение Колмогорова–Чепмена для вероятностей переходов в марковских процессах, которое применяется, в том числе, и для моделирования биологических процессов (Dayananda et al., 2004; Salapaka et al., 2012).

Запаздывающие аргументы введены в практику использования в математике в первой половине прошлого столетия (Мышкис, 1949; Эльсгольц, Норкин, 1971). Они являются традиционным аппаратом при моделировании процессов переноса, примером которых в биологических системах, на внутриклеточном уровне, служат матричные процессы (репликация, транскрипция, трансляция), в результате которых синтезируются нерегулярные полимеры – ДНК, РНК и белки, и такие процессы, как транспорт молекул, синтез метаболитов, сигнальные пути передачи информации и др. В настоящее время запаздывающие аргументы активно применяются в математических моделях вышеописанных процессов (Лихошвай и др., 2004; Srividhya, Gopinathan, 2006; McIsaac et al., 2011; Gérard, Goldbeter, 2012; Yang, Ferrell, 2013; Gelens et al., 2015; Likhoshvai et al., 2015, 2016; Suzuki et al., 2016; Khlebodarova et al., 2017; Kogai et al., 2017).

Полученные результаты показывают, что запаздывающие аргументы и уравнения переноса являются эквивалентными математическими аппаратами для описания всех типов динамических процессов переноса энергии и/или вещества в биологических, химических и физических системах, указывая на глубинное подобие свойств динамических систем независимо от природы их происхождения. В то же время системы уравнений с частными производными обладают следующим важным свойством: процессы, которые описываются в моделях с запаздывающими аргументами в скрытой форме, в виде запаздывающего аргумента, в моделях с частными производными описываются в явном виде в форме уравнений переноса. На наш взгляд, это весьма важное свойство, если речь идет о молекулярно-генетических системах, так как в общем случае такие процессы, как элонгация синтеза ДНК, РНК и белков, протекают с неравномерной скоростью и в определенных задачах требуют персонального учета, что можно легко сделать в моделях, построенных с использованием математического аппарата частных производных.

Acknowledgments

The authors are grateful to Academician S.K. Godunov and Corresponding Members of the RAS A.M Fedotov and E.Ya. Frisman for their bringing our attention to the problem of the conceptual similarity of retarded arguments and unidimensional divergence operators and motivating us to perform this study.

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0008 and the Russian Foundation for Basic Research, project 16-01-00237a.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bhat D., Gopalakrishnan M. Transport of organelles by elastically coupled motor proteins. Eur. Phys. J. E. 2016;39(7):71. DOI 10.1140/epje/i2016-16071-0.

Bocharov G.A., Rihan F.A. Numerical modelling in biosciences using delay differential equations. J. Comput. Appl. Math. 2000;125(1-2):183-199.

Busenberg S., Tang B. Mathematical models of the early embryonic cell cycle: the role of MPF activation and cyclin degradation. J. Math. Biol. 1994;32:573-596.

Dayananda P.W., Kemper J.T., Shvartsman M.M. A stochastic model for prostate-specific antigen levels. Math. Biosci. 2004;190(2):113-126.

Demidenko G.V., Likhoshvai V.A. On differential equations with retarded argument. Siberian Mathematical Journal. 2005;46(3):417-430.

El'sgol'ts L.E., Norkin S.B. Vvedenie v teoriyu differentsial'nykh uravneniy s otklonyayushchimsya argumentom [Introduction to the Theory of Differential Equations with Deviating Argument]. Moscow: Nauka Publ., 1971;296. (in Russian)

Gelens L., Huang K.C., Ferrell J.E., Jr. How does the *Xenopus laevis* embryonic cell cycle avoid spatial chaos? Cell Rep. 2015;12(5):892-900. DOI 10.1016/j.celrep.2015.06.070.

Gérard C., Goldbeter A. Entrainment of the mammalian cell cycle by the circadian clock: modeling two coupled cellular rhythms. PLoS Comput. Biol. 2012;8(5):e1002516. DOI 10.1371/journal.pcbi.1002516.

Harrison L.M., David O., Friston K.J. Stochastic models of neuronal dynamics. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2005;360(1457):1075-1091.

Khlebodarova T.M., Kogai V.V., Fadeev S.I., Likhoshvai V.A. Chaos and hyperchaos in simple gene network with negative feedback and time delays. J. Bioinform. Comput. Biol. 2017;15(2):1650042. DOI 10.1142/S0219720016500426.

Kogai V.V., Khlebodarova T.M., Fadeev S.I., Likhoshvai V.A. Complex dynamics in alternative mRNA splicing systems: mathematical model. Vychislitelnye tekhnologii = Computational Technologies. 2015;20(1):38-52. (in Russian)

Kogai V.V., Likhoshvai V.A., Fadeev S.I., Khlebodarova T.M. Multiple scenarios of transition to chaos in the alternative splicing model. Int. J. Bifurcat. Chaos. 2017;27(2):1730006. DOI 10.1142/S0218127417300063.

Likhoshvai V.A., Fadeev S.I., Demidenko G.V., Matushkin Yu.G. Modeling of multistage synthesis of a substance without branching by an equation with a retarded argument. Sibirskiy zhurnal industrialnoy matematiki = Siberian Journal of Industrial Mathematics. 2004;7(1):73-94. (in Russian)

Likhoshvai V.A., Fadeev S.I., Kogai V.V., Khlebodarova T.M. On the chaos in gene networks. J. Bioinform. Comput. Biol. 2013;11(1):1340009. DOI 10.1142/S021972001340009.

Likhoshvai V.A., Kogai V.V., Fadeev S.I., Khlebodarova T.M. Alternative splicing can lead to chaos. J. Bioinform. Comput. Biol. 2015;13:1540003. DOI 10.1142/S021972001540003X.

Likhoshvai V.A., Kogai V.V., Fadeev S.I., Khlebodarova T.M. Chaos and hyperchaos in a model of ribosome autocatalytic synthesis. Sci. Rep. 2016;6:38870. DOI 10.1038/srep38870.

Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G., Fadeev S.I. Problems of the theory of gene networks functioning. Sibirskiy zhurnal industrialnoy matematiki = Siberian Journal of Industrial Mathematics. 2003;6:64-80. (in Russian)

Lu H., Song H., Zhu H. A series of population models for *Hyphantria cunea* with delay and seasonality. Math. Biosci. 2017;292:57-66. DOI 10.1016/j.mbs.2017.07.010.

McIsaac R.S., Huang K.C., Sengupta A., Wingreen N.S. Does the potential for chaos constrain the embryonic cell-cycle oscillator? PLoS Comput. Biol. 2011;7:e1002109.

Monk N.A.M. Oscillatory expression of Hes1, p53, and NF-κB driven by transcriptional time delays. Curr. Biol. 2003;13(16):1409-1413.

Myshkis A.D. General theory of delay differential equations. Uspekhi matematicheskikh nauk = Advances in Mathematical Sciences. 1949;4(5(33)):99-141. (in Russian)

Nelson P.W., Murray J.D., Perelson A.S. A model of HIV-1 pathogenesis that includes an intracellular delay. Math. Biosci. 2000;163(2):201-215.

Nelson P.W., Perelson A.S. Mathematical analysis of delay differential equation models of HIV-1 infection. Math. Biosci. 2002;179:73-94.

Risken H. The Fokker–Planck equation. Berlin: Springer, 1996.

Romond P.C., Rustici M., Gonze D., Goldbeter A. Alternating oscillations and chaos in a model of two coupled biochemical oscillators driving successive phases of the cell cycle. Ann. NY Acad. Sci. 1999;879:180-193.

Salapaka S., Rowchowdhury S., Salapaka M. Modeling and role of feedback controlled stochastic ratchets in cellular transport. Proc. of the 51st IEEE Conf. on Decision and Control. 2012;6426263:374-379.

Srividhya J., Gopinathan M.S. A simple time delay model for eukaryotic cell cycle. J. Theor. Biol. 2006;241:617-627.

Suzuki Y., Lu M., Ben-Jacob E., Onuchic J.N. Periodic, quasi-periodic and chaotic dynamics in simple gene elements with time delays. Sci. Rep. 2016;6:21037. DOI 10.1038/srep21037.

Yang Q., Ferrell J.E., Jr. The Cdk1-APC/C cell cycle oscillator circuit functions as a time-delayed, ultrasensitive switch. Nat. Cell Biol. 2013;15:519-525.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):145-152
DOI 10.18699/VJ18.342

Экспериментальное изучение влияния редких полиморфизмов ТАТА-боксов промоторов генов *HBB*, *HBD* и *F9* человека на кинетику взаимодействия с ТАТА-связывающим белком

Е.Б. Шарыпова[1], И.А. Драчкова[1], Е.В. Кашина[1], Д.А. Рассказов[1], П.М. Пономаренко[2], М.П. Пономаренко[1], Н.А. Колчанов[1, 3], Л.К. Савинкова[1] ✉

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Университет Ла-Верна, Ла-Верна, Калифорния, США
[3] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Гены человека *HBB*, *HBD* и *F9* относятся к системе кроветворения. Недостаток или избыток продуктов этих генов является причиной наследственных талассемий разной тяжести и гемофилии В Лейдена. Ранее нами было показано, что ряд аннотированных однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) ТАТА-боксов этих генов, ассоциированных с возникновением ß-, δ-талассемий и гемофилии В Лейдена влияет на взаимодействие с ТАТА-связывающим белком (TBP), изменение взаимодействия пропорционально изменению количества продуктов этих генов. В настоящей работе исследуется влияние редких неаннотированных SNPs ТАТА-боксов этих генов на взаимодействие ТАТА-связывающего белка. Для изучения кинетических характеристик образования комплексов TBP/TATA *in vitro* используются двуцепочечные олигодезоксинуклеотиды, идентичные ТАТА-содержащим участкам промоторов генов *HBB*, *HBD* и *F9* (нормальным и минорным аллелям), и рекомбинантный TBP человека. Показано, что замена –25A > C (rs281864525) и делеция –25AA (rs63750953) ТАТА-бокса гена ß-глобина одинаково влияют на аффинность TBP/TATA, которая падает в обоих случаях в три раза, но значительно различается влияние этих SNPs на скорость образования комплексов TBP/TATA: –25A > C приводит к снижению скорости в пять раз, а делеция (–25AA) – к снижению скорости более чем в семь раз. Различное влияние замен оказывается и на прочность комплексов TBP/TATA. Если в случае –25A > C прочность комплексов увеличивается в 1.8 раза, то при делеции –25AA прочность комплексов возрастает в 2.4 раза, несмотря на уменьшение сродства ТАТА-связывающего белка к ТАТА-боксу. Сравнение изменения экспериментальных значений сродства (K_D) TBP/TATA нормальных и минорных аллелей с прогнозируемыми показало, что данные хорошо коррелируют друг с другом: коэффициент линейной корреляции $r = 0.94$ ($\alpha < 0.0001$). Комплексный подход к изучению редких полиморфизмов может привести к определению наиболее чувствительных маркеров орфанных заболеваний, что внесет вклад в разработку надежных и быстрых методов их диагностирования и лечения.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм; гены кроветворения; редкие полиморфизмы; орфанные заболевания; промотор; ТАТА-бокс.

An experimental study of the effect of rare polymorphisms of human *HBB*, *HBD* and *F9* promoter TATA boxes on the kinetics of interaction with the TATA-binding protein

E.B. Sharypova[1], I.A. Drachkova[1], E.V. Kashina[1], D.A. Rasskazov[1], P.M. Ponomarenko[2], M.P. Ponomarenko[1], N.A. Kolchanov[1, 3], L.K. Savinkova[1] ✉

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] University of La Verne, La Verne, California, USA
[3] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Human genes *HBB*, *HBD* and *F9* belong to the hematopoiesis system. The deficiency or excess of these genes' products is the cause of hereditary thalassemias of various severity and haemophilia B Leyden. Previously, it was shown that a number of annotated single-nucleotide polymorphisms of TATA boxes of these genes associated with the occurrence of ß- and δ-thalassemia affect the interaction with the TATA-binding protein, the interaction changing proportionally with the change in the number of gene products. In the present work, we investigate the effect of rare not annotated single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of TATA boxes of these genes with an unknown manifestation on the TATA-binding protein interaction. To study the kinetic characteristics of TBP/TATA complex formation *in vitro*, double-stranded oligodeoxynucleotides identical to the TATA-containing portions of the promoters of the *HBB*, *HBD* and *F9* genes ("normal" and minor alleles) and recombinant human TBP were used. It was shown that the TATA-box SNP of –25A > C (rs281864525) and the deletion of the –25AA (rs63750953) TATA-box of the β-globin gene have the same effect on the TBP/TATA affinity, which decreases 3-folds in both cases. However, the effect of these substitutions on the rate of the TBP/TATA complex formation is significantly different: SNP –25A > C decreases the rate 5-fold, and the deletion decreases the rate more than 7-fold. The influence of substitutions on the strength of the TBP/TATA complexes has a different effect. If in the case of SNP –25A > C the strength of the complexes increases 1.8-fold, then in the case of the –25AA deletion, the strength of the complexes increases 2.4-fold, even though the affinity of the TATA-binding protein to the TATA box decreases. A comparison of experimental values of affinity (K_D) of the TBP/TATA

Received 31.07.2017
Accepted for publication 03.11.2017
© AUTHORS, 2018
E.B. Sharypova and I.A. Drachkova equal contribution to manuscript preparation.

✉ e-mail: savinkl@mail.ru

complexes of "normal" and minor alleles with the predicted has shown that data correlate well with each other. The coefficient of linear correlation $r = 0.94$ ($\alpha < 0.0001$). A comprehensive approach to the study of rare polymorphisms may lead to the identification of the most sensitive markers of orphan diseases, which will contribute to the development of reliable and rapid methods for their diagnosis and treatment.

Key words: single nucleotide polymorphism; hematopoies genes; rare polymorphisms; orphan diseases; promoter; TATA-box.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шарыпова Е.Б., Драчкова И.А., Кашина Е.В., Рассказов Д.А., Пономаренко П.М., Пономаренко М.П., Колчанов Н.А., Савинкова Л.К. Экспериментальное изучение влияния редких полиморфизмов ТАТА-боксов промоторов генов *HBB*, *HBD* и *F9* человека на кинетику взаимодействия с ТАТА-связывающим белком. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):145-152. DOI 10.18699/VJ18.342

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sharypova E.B., Drachkova I.A., Kashina E.V., Rasskazov D.A., Ponomarenko P.M., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A., Savinkova L.K. An experimental study of the effect of rare polymorphisms of human *HBB*, *HBD* and *F9* promoter TATA boxes on the kinetics of interaction with the TATA-binding protein. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):145-152. DOI 10.18699/VJ18.342 (in Russian)

Новая база данных однонуклеотидных вариантов всего генома человека (dbWGFP) содержит более 8 млрд замен, среди которых только 15 % расположены в кодирующих районах, большинство же представляют SNPs регуляторных районов (Wu et al., 2016). Около 29 % всех выявленных SNPs встречаются с частотой менее 1 % и относятся к редким (MacArthur et al., 2014). В группу редких (орфанных) заболеваний включают талассемии, мукополисахаридозы (нарушение обмена гликозаминогликанов), гемофилию В Лейдена, амиотрофический латеральный склероз, врожденные мышечные дистрофии, врожденный гиперинсулинизм, дефицит факторов свертывания крови и др. Достоверная информация о встречающихся с низкой частотой SNPs, делающих вклад в патогенез орфанных заболеваний, необходима для того, чтобы своевременно начать лечение, предотвратить развитие тяжелых осложнений и реакцию на используемые лекарства и отделить SNPs, делающие вклад в патогенез, от ложноположительных. Например, в работе (Bell et al., 2011) приводится результат анализа 406 опубликованных SNPs, ассоциированных с тяжелыми заболеваниями, которые обнаружили в 104 секвенированных геномах человека. Оказалось, что либо 27 % обнаруженных SNPs (у 122 человек) относятся к общим полиморфизмам, либо вообще не хватает доказательств их патогенности.

Парадокс орфанных заболеваний заключается в том, что несмотря на то, что каждое из них встречается редко, в совокупности все «редкие» больные составляют огромную группу. Например, в Европе болезни считаются редкими, если они затрагивают менее пяти человек из 10000; в Бразилии это определение аналогично определению Всемирной организации здравоохранения, поскольку оно затрагивает менее 65 из 100000 человек, а на Тайване редкое заболевание определяется как заболевание, встречающееся менее чем у 1 из 10000 лиц (Dharssi et al., 2017). Особенно важно то, что 75 % редких заболеваний наблюдается у детей, и 30 % из них умирают в течение первых пяти лет жизни (MacArthur et al., 2014). Редкие варианты часто характеризуют этнические группы, входят в состав разных гаплотипов.

Несмотря на впечатляющие результаты GWAS, пока описаны функции небольшого количества SNPs (Cavalli et al., 2016), причастных к регуляции генов. Общая характеристика заключается в том, что функционально значимые SNPs локализованы в сайтах связывания транскрипционных факторов и аллели отличаются по их способности связывать транскрипционные факторы и регулировать гены (Keinan, Clark, 2012). Редкие варианты не обнаруживаются в основном при полногеномных исследованиях (GWAS), так как они отфильтровываются на промежуточных этапах контроля для снижения количества ложноположительных SNPs.

Развитие современных методов и подходов секвенирования геномов приближает время, когда результаты GWAS будут основаны на полном секвенировании индивидуальных геномов и позволят оценивать вклад редких регуляторных вариантов в общее заболевание. Но для доказательства их функционального влияния могут потребоваться сложные функциональные тесты и компьютерное моделирование (Kheradpour et al., 2013). Точность прогнозов, сделанных на основании компьютерного моделирования, очень мала (Dooms, 2017). Актуальность теста во многом зависит от базовой биологической структуры при оценке связи между группой редких генетических вариантов и болезнью. Каждый статистический тест для редких вариантов основан на относительно сложных предположениях, включающих математическое преобразование механизмов болезни. А в настоящее время еще мало известно об основных биологических механизмах, которые могут сильно различаться между заболеваниями (Persyn et al., 2017).

Таким образом, исследование редко встречающихся вариаций последовательностей регуляторной ДНК конкретных генов является актуальной задачей, поскольку понимание влияния генетической вариации на регуляцию экспрессии генов остается главной проблемой в расшифровке транскрипционного регуляторного кода.

Ранее мы изучали влияние аннотированных SNPs (связь которых с определенными заболеваниями показана молекулярно-биологически и клинически) ТАТА-боксов генов

HBB, *HBD*, *F9*, *MBL2*, *F3* и других, на кинетические и термодинамические характеристики образования комплексов TBP/TATA *in vitro*. Из литературных данных известно, что эти SNPs вызывают моногенные заболевания человека, такие как талассемии различной тяжести, гемофилию В Лейдена, иммунодефицит, амиотрофический латеральный склероз и др. (Savinkova et al., 2013; Drachkova et al., 2014). С помощью уравнения трехшагового связывания (Пономаренко и др., 2008) для предсказания аффинности взаимодействия TBP с TATA-боксом, построенного на основании наших экспериментальных данных, нами проанализированы *in silico* последовательности TATA-боксов здоровых индивидуумов и SNP-содержащие TATA-боксы, ассоциированные с повышенным риском возникновения наследственных заболеваний человека. Сделанные прогнозы изменения аффинности TBP/TATA мы экспериментально верифицировали с использованием метода задержки ДНК в геле в максимально стандартизированных условиях и получили довольно высокий коэффициент линейной корреляции для соотношения прогноз/эксперимент: $r = 0.822$ при $\alpha < 10^{-7}$ (Savinkova et al., 2013). Мы провели экспериментальное исследование кинетических параметров взаимодействия TBP с TATA-боксами и впервые показали, что при взаимодействии TBP с SNP-содержащими TATA-боксами скорости образования комплексов TBP/TATA уменьшаются в 8–36 раз по сравнению со здоровыми индивидуумами (Drachkova et al., 2014), скорости диссоциации комплексов TBP/TATA уменьшаются в меньшей степени: в 2–6 раз. Полученные нами результаты обнаружили также хорошее совпадение между влиянием SNPs на взаимодействие TBP/TATA в условиях *in vitro* с литературными данными по изменению экспрессии соответствующих генов у пациентов *in vivo* и по тяжести заболеваний, ассоциированных с данными SNPs (Драчкова и др., 2010).

Задача исследования, частью которого является настоящая работа, заключается в изучении влияния редких неаннотированных SNPs TATA-боксов генов человека, участвующих в кроветворении, на скорости образования и распада комплексов TBP/TATA *in vitro* и определении влияния на экспрессию репортерного гена *ex vivo* с целью выявления среди них потенциально функционально значимых SNPs. Нами формируется библиотека для определения неаннотированных редких SNPs, которые будут проанализированы с использованием обновления SNP_TATA_Z-tester на основе разработанного нами Web-сервиса SNP_TATA_Comparator (Ponomarenko et al., 2015), отобраны потенциально функционально значимые SNPs для экспериментальной верификации *in vitro* и *ex vivo*. В настоящей работе представлены результаты экспериментального определения *in vitro* влияния неаннотированных редких SNPs TATA-боксов, отобранных *in silico*, на кинетические характеристики образования комплексов TBP/TATA. Следующим этапом будет определение действия этих верифицированных редких SNPs TATA-боксов на экспрессию в культуре клеток репортерного гена *Luc*. На основании всех полученных результатов будут сделаны выводы об их возможном потенциале функциональной значимости и предположение о фенотипическом проявлении.

Материалы и методы

Получение рекомбинантного TBP. В работе использовали рекомбинантный TBP человека (TBP), экспрессированный в клетках *E. coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hTBP (любезно предоставленной проф. B. Puhg, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsilvania, США), выделение которого описано ранее (Драчкова и др., 2010).

Получение меченных ^{32}P олигодезоксинуклеотидов. Использовали олигодезоксирибонуклеотиды (ODN, длиной 26 п. о., синтезированные и дополнительно очищенные электрофорезом в ПААГ (Biosset, г. Новосибирск). Для получения меченых двуцепочечных ODN обе цепи метили ^{32}P-ATP с помощью T4-полинуклеотидкиназы (SibEnzime, Novosibirsk), отжигали при 95 °C (в эквимолярном соотношении) и медленно (не менее 3 ч) охлаждали до комнатной температуры. Получение меченых и немеченых двуцепочечных ODN подробно описано в работе (Драчкова и др., 2010). В данной работе использовали ODN, идентичные WT и SNP-содержащим TATA-боксам промоторов генов человека, последовательности которых приведены ниже.

Ген *HBB*:
WT – 5′-cagggctgggCATAAAA**A**gtcagggca-3′;
SNP – –25A/C – 5′-cagggctgggCATAAA**C**gtcagggca-3′;
Del –25 AA – 5′-cagggctgggCATAAgtcagggcaga-3′.
Ген *HBD*:
WT – 5′-acaggaccagCA**T**AAAAggcagggca-3′;
SNP – –30T/C – 5′-acaggaccagCA**C**AAAAggcagggca-3′.
Ген *F9*:
WT – 5′-tttggTACAA**C**Taatcgaccttacca-3′;
SNP – –41C/A – 5′-tttggTACAAA**A**Taatcgaccttacca-3′.

Для выбора редких SNPs используется обновление SNP_TATA_Z-tester (рис. 1) на основе ранее разработанного нами Web-сервиса SNP_TATA_Comparator (Ponomarenko et al., 2015). Обновление касается только интерфейса ввода данных и не затрагивает предсказания величин сродства TBP/TATA.

Экспериментальное определение кинетических характеристик образования комплексов TBP с олигодезоксинуклеотидами. Эксперименты по изучению кинетических характеристик связывания TBP с ODN выполняли при постоянной концентрации TBP и изменении концентрации ODN во времени до установления равновесия при 25 °C (рис. 2 и 3) в буфере связывания следующего состава: 20 мМ Hepes-KOH (pH = 7.6), 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 1 мМ DTT, 100 мкг/мкл BSA, 0.01 % NP-40, 5 % глицерин. Для отделения комплексов TBP/ODN от несвязавшегося ODN использовали метод задержки ДНК в геле (EMSA). Электрофорез проводили в 5 % ПААГ на Трис-глициновом буфере (pH 8.3) при температуре 10 °C и напряженности поля 25 В/см в течение 40 мин (Drachkova et al., 2014). Все эксперименты выполняли в максимально стандартизованных условиях.

Статистический анализ данных. Сравнение прогнозируемых и экспериментальных значений аффинности комплексов TBP/TATA нормальных и минорных аллелей проводили с использованием пакета программ Statistica (Statsoft™, США).

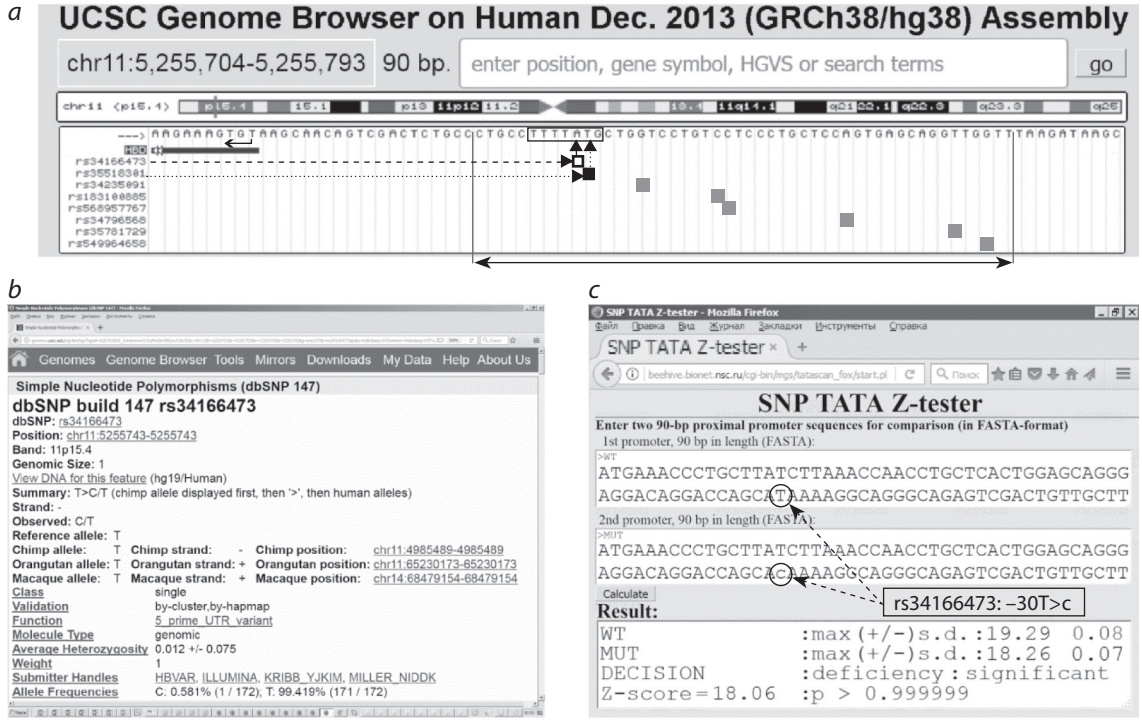


Fig. 1. Prediction of the candidate SNP marker rs34166473 (□, dashed arrow) in the [–70; –20] (◄►) region relative to the transcription start (designated as ⟶) of the human HBD gene for the hemoglobin δ chain with the SNP_TATA_Z-tester service pack of our earlier Web service SNP_TATA_Comparator (Ponomarenko et al., 2015).

(*a*) Visualization of the promoter analyzed with the UCSC Genome Browser Web service (Haeussler et al., 2015). ■, the known clinical SNP marker rs35518301 for δ thalassemia and malaria resistance associated with deficiency of the hemoglobin δ chain (Frischknecht, Dutly, 2005). The marker is located next to rs34166473. (*b*) Description of rs34166473 in dbSNP (Sherry et al., 2001). (*c*) SNP_TATA_Z-tester. SNP: ■, unannotated SNPs estimated to be insignificant for the TBP affinity to the human HBD promoter (data not shown). Line DECISION of the Result window: the rs34166473 marker at issue can also cause δ chain deficiency; therefore, it may be a candidate SNP marker similarly to the known rs35518301.

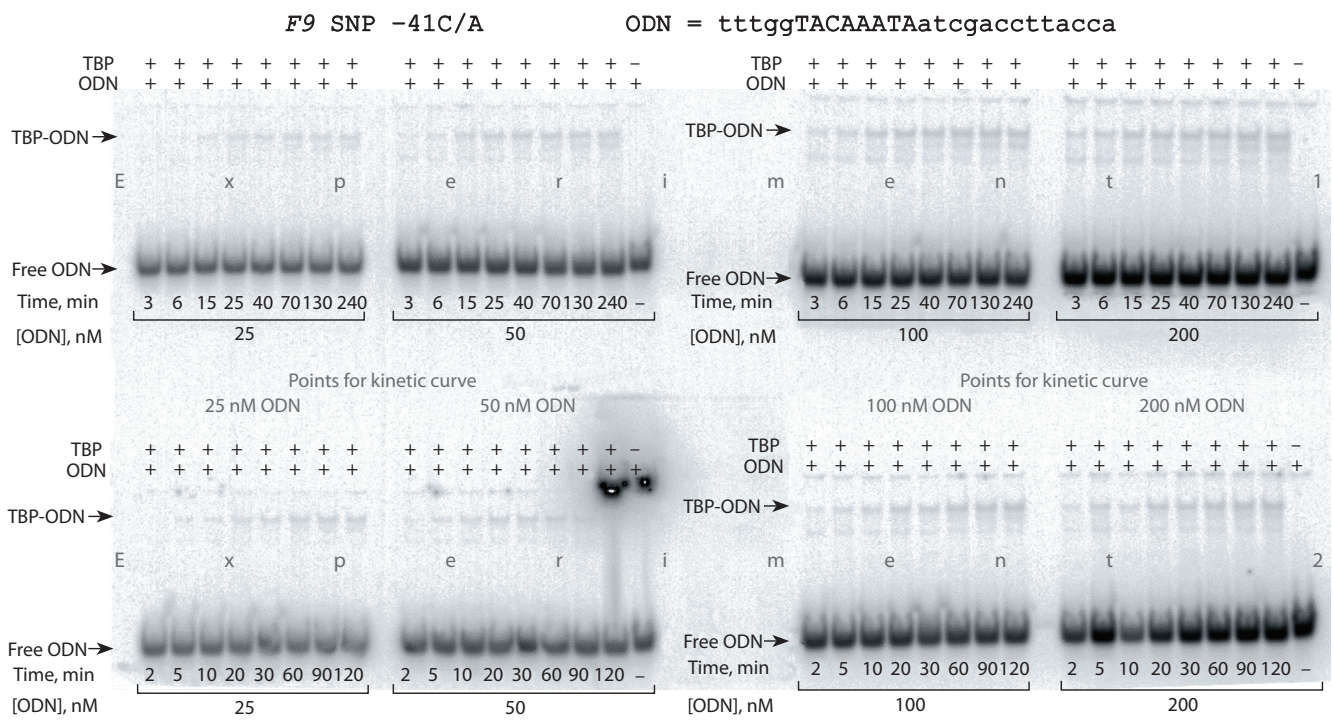


Fig. 2. Electrophoretic images obtained in the construction of kinetic curves of TBP binding to the ODN identical to the TATA box of the *F9* promoter (minor allele). TBP–ODN complexes were separated from unbound ODN by the gel retardation method (EMSA).

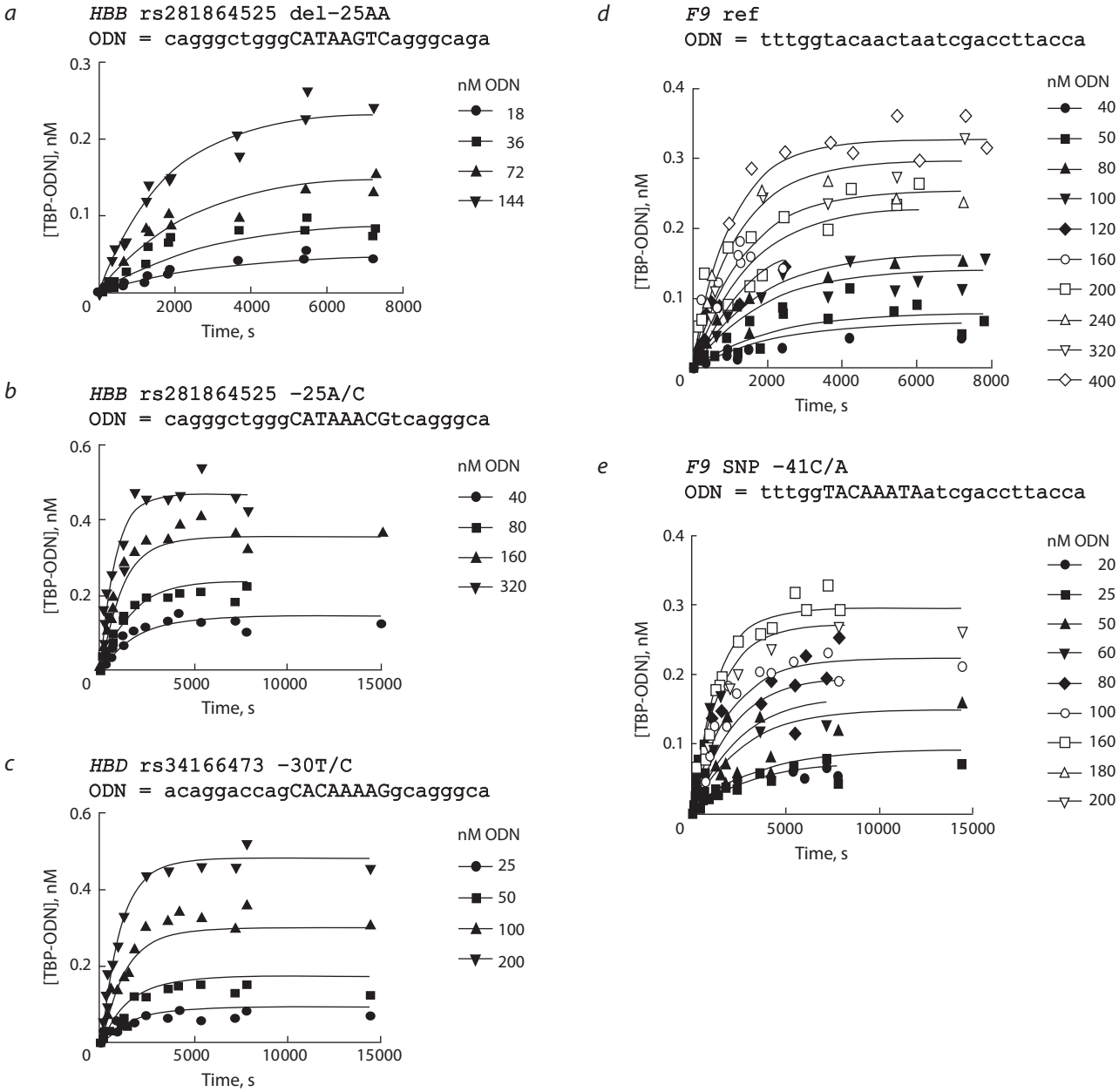


Fig. 3. Kinetic isotherms of TBP binding to ODNs identical to the TATA boxes of *HBB*, *HBD*, and *F9* promoters. The binding isotherms and k_a and k_d values were derived from electrophoretic images (Fig. 2) with GraphPad Prism 5 software.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты экспериментов по определению констант ассоциации и диссоциации, характеризующих скорости образования и распада комплексов TBP с ТАТА-боксами промоторов генов *HBB*, *HBD* и *F9*, содержащими редкие неаннотированные SNPs (rs281864525, rs63750953, rs341664473 и rs750827465). Для сравнения в таблицу включены также ранее определенные (Drachkova et al., 2014) значения кинетических характеристик влияния SNPs (rs33931746, rs33931746) на взаимодействие TBP/TATA, для которых показана связь с заболеваниями ß- и δ-талассемиями.

Ген *HBB*. Как известно, гемоглобин взрослого человека состоит из двух α- и двух β-цепей (α2β2). Порядок расположения генов совпадает с порядком их экспрессии в процессе онтогенеза: сначала в кластере β-глобинов расположен ген эмбриональной ε-цепи, за ним – два гена фетальных γ-цепей, и затем гены δ- и β-цепей взрослого организма (Schechter, 2008). Регуляция транскрипции этого семейства генов, ведущая к их экспрессии, зависимой от стадии в онтогенезе, осуществляется через проксимальные и дистальные регуляторные элементы ДНК (Levings et al., 2001). Один из наиболее важных дистальных регуляторных элементов – локус контрольной области (LCR) (Bank et al., 2005), расположенный на расстоянии от 6 до 22 т. п. н. левее ε-глобинового гена. У взрослого организма уровень экспрессии *HBB* гораздо выше, чем *HBD*. На долю α2β2 приходится 97 % общего гемоглобина человека, а на α2δ2, которые содержат δ-цепи, кодируемые геном *HBD*, – менее 3 % (Schechter, 2008). По аминокис-

Kinetic (k_a, and k_d) and thermodynamic K_D) parameters of the TBP–TATA interaction determined by the gel retardation assay

Gene	SNP	Prediction		Experiment						
		$-\ln(K_D)$	Δ, ln-ед.	$-\ln(K_D)$	K_D, nM	Δ, ln-un	k_a, $(M^{-1}c^{-1})\times10^3$	k_d, $(c^{-1})\times10^{-4}$	$t_{1/2}$, min	−ΔG, kcal/mol
HBB	WT	19.20	0.0	16.81	50 ± 0.7	0.0	14 ± 1	7.1 ± 0.7	16 ± 2	10 ± 1
	–28A > G (rs33931746)	18.34	–0.9	14.40	560 ± 80	–2.4	1.2 ± 0.1	6.6 ± 0.9	18 ± 2	8.5 ± 0.9
	–28A > C (rs33931746)	18.63	–0.6	14.51	500 ± 100	–2.3	0.4 ± 0.1	2.0 ± 0.3	58 ± 9	8.6 ± 1.4
	–25A > C (rs281864525)	18.73	–0.5	15.71	150 ± 20	–1.1	2.7 ± 0.3	4.1 ± 0.5	28 ± 2	8.5 ± 0.8
	Del –25AA (rs63750953)	18.61	–0.6	15.71	150 ± 40	–1.1	1.9 ± 0.4	3.0 ± 0.5	38 ± 3	8.5 ± 0.8
HBD	WT	19.29	0.0	17.14	36 ± 4	0.0	23 ± 3	8.0 ± 2	14 ± 4	10 ± 1
	–31A > G (rs35518301)	18.65	–0.6	16.12	100 ± 20	–1.0	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.4	60 ± 10	9.5 ± 0.9
	–30T > C (rs34166473)	18.27	–1.0	15.02	300 ± 60	–2.12	1.8 ± 0.2	5.5 ± 0.5	21 ± 2	8.1 ± 0.8
F9	WT	18.86	0.0	15.05	580 ± 20	0.0	2.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1	8.3 ± 1	8.5 ± 0.6
	–34C > A (rs750827465)	19.32	0.5	16.22	90 ± 20	1.2	2.7 ± 0.3	2.4 ± 0.4	48 ± 4	8.8 ± 0.9

The frequency of the minor rs281864525 allele is 0.007%. The frequencies of other alleles ≤ 0.1 % by definition. k ±, standard deviation; $K_D = k_d/k_a$; Δ, difference between TBP affinities to the ODNs containing and not containing the SNP expressed in log units; $\Delta = -\ln[K_{D,TATAMut}] - (-\ln[K_{D,TATA}])$.

лотной последовательности δ-цепи высоко гомологичны β-цепям (93 %): отличаются только 10 из 147 аминокислот (Steinberg, Adams, 1991).

Мутации в кодирующей и регуляторной областях гена β-глобина приводят к наследственным нарушениям синтеза гемоглобина – β-талассемиям различной тяжести и серповидно-клеточной анемии (Galanello, Origa, 2010). Ранее роль гемоглобина δ считали несущественной, но авторы работы (Moleirinho et al., 2013) в результате комплексного анализа, основанного на эмпирических и гаплотипных исследованиях, пришли к выводу о его важной роли в регуляции кластера этих генов.

На примере SNP –25A > C и делеции –25AA TATA-бокса промотора гена β-гемоглобина (*HBB*) хорошо видны различия в механизмах реализации изменений в последовательности ДНК. Аффинность TBP/TATA изменяется в одинаковой мере в обоих случаях: для аллеля «дикого типа» K_D = 50 нМ, для обоих минорных аллелей K_D = 150 нМ, но прочность комплексов отличается для SNP –25A > C в 1.7 раза, а для делеции –25AA – в 2.3 раза (время полураспада: $t_{1/2}$ = 28 мин и $t_{1/2}$ = 38 мин соответственно). Скорость образования комплексов для SNP –25A > C уменьшается более чем в пять раз по сравнению с анцестральным аллелем: $k_a = (1.4\pm0.1)10^4\ M^{-1}c^{-1}$ для WT, а для минорного (C) – $k_a = (2.7\pm0.3)10^3\ M^{-1}c^{-1}$. Для SNP –28A > C и –28A > G ранее было показано уменьшение скорости образования комплексов TBP/TATA в 34 и 12 раз соответственно и снижение сродства практически до неспецифического уровня (500 и 560 нМ) (Drachkova et al., 2014), что вызывало у носителей тяжелые формы β-талассемии.

Ген *HBD*. Для минорного аллеля C (–30T > C) гена гемоглобина (*HBD*) аффинность уменьшается более чем в восемь раз (K_D = 36 нМ для анцестрального аллеля и K_D = 300 нМ для минорного аллеля). Скорость распада комплексов, k_d, снижается в 1.5 раза для минорного аллеля по сравнению с «диким типом» и, соответственно, увеличивается в 1.5 раза время полураспада комплексов TBP/TATA (14 мин и 21 мин соответственно), т. е. увеличивается прочность комплексов, несмотря на то, что их аффинность уменьшилась почти до неспецифического уровня. Возможно, это является одним из факторов, компенсирующих *in vivo* низкую аффинность TBP/TATA.

Ген *F9*. Известно, что у пациентов с тяжелым течением гемофилии В Лейдена в детстве наблюдается низкий уровень фактора свертывания крови (F9) (Picketts et al., 1994), который после полового созревания увеличивается и приходит в норму. Установлено, что тяжелое течение заболевания вызывается группой однонуклеотидных замен, расположенных вокруг старта транскрипции гена (Kurachi, Davie, 1982). Как видно из таблицы, для минорного аллеля A (–34C > A) гена фактора коагуляции (*F9*) скорость образования комплексов увеличилась более чем в два раза по сравнению с аллелем «дикого типа» ($k_a = (2.7\pm0.3)10^3\ M^{-1}c^{-1}$ и $k_a = (1.3\pm0.2)10^3\ M^{-1}c^{-1}$ соответственно), уменьшились скорость распада комплексов в 1.6 раза и время их жизни. Все эти изменения согласуются с увеличением аффинности TBP/TATA для минорного аллеля (K_D = 90 нМ) в 3.2 раза в результате SNP –34C > A, улучшающего последовательность TATA-бокса по сравнению с анцестральным (K_D = 290 нМ). Об этом же свидетельствует небольшое увеличение свободной энергии Гиббса (см. таблицу), освободившейся в результате улучшения последовательности TATA-бокса. В результате этой замены можно ожидать увеличения количества фактора коагуляции, о чем более определенно можно будет говорить после экспериментов *ex vivo*.

Сравнение экспериментальных значений сродства (K_D) комплексов TBP/TATA «нормальных» и минорных аллелей с прогнозируемыми с помощью обновления SNP_TATA_Z-tester на основе ранее разработанного Web-сервиса SNP_TATA_Comparator (Ponomarenko et al., 2015), показало, что данные хорошо коррелируют друг с другом. Коэффициент линейной корреляции r = 0.94 ($\alpha < 0.0001$).

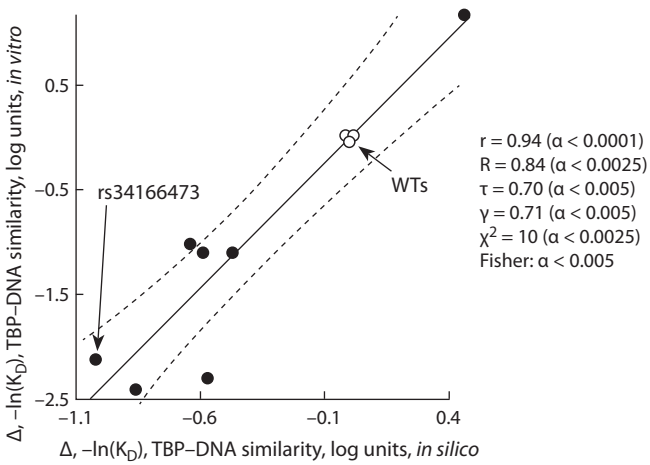


Fig. 4. Significant correlation between deviations (●, Δ) of –ln(KD) TBP–DNA affinities from the standard value (○, WT) predicted with the SNP_TATA_Z-tester Web service (X-axis) and the same deviations measured by the gel retardation assay (Y-axis).

Dashed curves indicate borders of the 95% confidence interval for the regression line. Fisher, r, γ, χ^2, R, τ, and α: exact Fisher's test for 2×2 tables; coefficients of the linear, generalized Goodman and Kruskal correlation, chi-square dichotomous test, Spearman–Kendal rank correlations, and their statistical significance as estimated with the Statistica software (Statsoft™, United States); rs34166473, an exemplary SNP marker for δ thalassemia predicted in this work.

На рис. 4 представлены результаты сравнения прогнозируемых и экспериментально измеренных *in vitro* значений аффинности TBP/TATA.

Таким образом, мы определили кинетические характеристики взаимодействия TBP с TATA-боксами, содержащими редкие неаннотированные SNPs, которые могут быть потенциально функционально значимыми и ассоциированы с повышенным риском возникновения заболеваний крови. Это предположение основывается на том, что ранее нами было экспериментально показано снижение сродства TBP к ODN, несущим полиморфизмы в TATA-боксе, ассоциированные с аутоиммунными, сердечно-сосудистыми заболеваниями, амиотрофическим латеральным склерозом и другими заболеваниями. Снижение количества мРНК и белка *in vivo* у носителей этих заболеваний экспериментально показано другими авторами (Драчкова и др., 2010). В случае редких неаннотированных полиморфизмов будут осуществлены дополнительные исследования, чтобы подтвердить или опровергнуть выдвинутое предположение.

Заключение

Результаты работы показывают влияние редких однонуклеотидных полиморфизмов TATA-боксов промоторов генов гемоглобинов β и δ и фактора свертывания крови F9 (rs281864525, rs63750953, rs34166473 и rs750827465) на сродство и скорость образования и распада комплексов TBP/TATA. Полученные численные характеристики влияния каждого SNP на образование и диссоциацию комплексов TATA-бокса с TATA-связывающим белком свидетельствуют о потенциальной возможности редких SNPs влиять на различные фенотипические проявления. Комплексный подход к изучению редких полиморфизмов может привести к определению наиболее чувствительных маркеров орфанных заболеваний, что внесет вклад в разработку надежных и быстрых методов их диагностирования и лечения. Это будет также способствовать лучшему пониманию молекулярных механизмов самой начальной стадии процесса реализации генетической информации – взаимодействию TBP с TATA-боксом и влиянию на него изменений структуры промоторной ДНК.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0019. The development of the service pack of the Web service was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0017. Computerized data analysis was supported by the Russian Federation Ministry of Education and Science, Program for improving the competitiveness of leading Russian universities among leading research and educational centers in the world (Project 5-100) and Integration Project 0324-2018-0021.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bank A., O'Neill D., Lopez R., Pulte D., Ward M., Mantha S., Richardson C. Role of intergenic human γ-δ-globin sequences in human hemoglobin switching and reactivation of fetal hemoglobin in adult erythroid cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005;1054:48-54.

Bell C.J., Dinwiddie D.L., Miller N.A., Hateley S.L. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. Sci. Transl. Med. 2011;3:65ra4. DOI 10.1126/scitranslmed.3001756.

Cavalli M., Pan G., Nord H., Wallerman O., Arzt E.W., Berggren O., Elvers I., Eloranta M.-L., Rönnblom L., Toh K.L., Wadelius C. Allele-specific transcription factor binding to common and rare variants associated with disease and gene expression. Hum. Genet. 2016;135:485-497.

Dharssi S., Wong-Rieger D., Harold M., Terry S. Review of 11 national policies for rare diseases in the context of key patient needs. Orphanet J. Rare Dis. 2017;12:63.

Dooms M. From promising molecules to orphan drugs: Early clinical drug development. Intractable Rare Dis. Res. 2017;(1):29-34. DOI 10.5582/irdr.2016.01094.

Drachkova I.A., Arshinova T.V., Ponomarenko P.M., Merkulova T.I., Kolchanov N.A., Savinkova L.K. Effect of TATA box polymorphisms in the human β-globin gene promoter associated with β-thalassemia on the interaction of the TATA-binding protein. Vestnik VOGiS = Herald Vavilov Society for Geneticists Breeding Scientists. 2010;14(4):698-705. (in Russian)

Drachkova I., Savinkova L., Arshinova T., Ponomarenko M., Peltek S., Kolchanov N. The mechanism by which TATA-box polymorphisms associated with human hereditary diseases influence interactions with the TATA-binding protein. Hum. Mutat. 2014;35(5):601-608. DOI 10.1002/humu.22535.

Frischknecht H., Dutly F. Two new delta-globin mutations: Hb A2-Ninive [!delta133(H11)Val-Ala] and a delta(+)-thalassemia mutation [-31 (A→G)] in the TATA box of the delta-globin gene. Hemoglobin. 2005;29(2):151-154.

Galanello R., Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet J. Rare Dis. 2010;5:11.

Haeussler M., Raney B.J., Hinrichs A.S., Clawson H., Zweig A.S., Karolchik D., Casper J., Speir M.L., Haussler D., Kent W.J. Navigating protected genomics data with UCSC genome browser in a box. Bioinformatics. 2015;31(5):764-766. DOI 10.1093/bioinformatics/

btu712.

Keinan A., Clark A.G. Recent explosive human population growth has resulted in an excess of rare genetic variants. Science. 2012;336: 740-743.

Kheradpour P., Ernst J., Melnikov A., Rogov P., Wang L., Zhang X., Alston J., Mikkelsen T.S., Kellis M. Systematic dissection of regulatory motifs in 2000 predicted human enhancers using a massively parallel reporter assay. Genome Res. 2013;23(5):800-811. DOI 10.1101/gr.144899.112.

Kolchanov N.A., Ponomarenko P.M., Savinkova L.K., Drachkova I.A., Lysova M.V., Arshinova T.V., Ponomarenko M.P. A step-by-step model of TBP/TATA box binding allows predicting human hereditary diseases by single nucleotide polymorphism. Dokl. Biochem. Biophys. 2008;419:88-92.

Kurachi K., Davie E.W. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982;79(21):6461-6464.

Levings P.P., Bungert J. The human beta-globin locus control region. Eur. J. Biochem. 2002;269:1589-1599.

MacArthur D.G., Manolio T.A., Dimmock D.P., Rehm H.L., Shendure J., Abecasis G.R., Adams D.R., Altman R.B., Antonarakis S.E., Ashley E.A., Barrett J.C., Biesecker L.G., Conrad D.F., Cooper G.M., Cox N.J., Daly M.J., Gerstein M.B., Goldstein D.B., Hirschhorn J.N., Leal S.M., Pennacchio L.A., Stamatoyannopoulos J.A., Sunyaev S.R., Valle D., Voight B.F., Winckler W., Gunter C. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. Nature. 2014;508(7497):469-476. DOI 10.1038/nature13127.

Moleirinho A., Seixas S., Lopes A.M., Bento C., Prata M.J., Amorim A. Evolutionary constraints in the β-globin cluster: the signature of purifying selection at the δ-globin (*HBD*) locus and its role in developmental gene regulation. Genome Biol. Evol. 2013;5(3):559-571. DOI 10.1093/gbe/evt029.

Persyn E., Karakachoff M., Scouarnec S. Le, Clézio C. Le, Campion D., French Exome Consortium Schott J.-J., Redon R., Bellanger L., Dina C. DoEstRare: A statistical test to identify local enrichments in rare genomic variants associated with disease. PLoS ONE. 12(7). DOI 10.1371/journal.pone.0179364.

Picketts D.J., Mueller C.R., Lillicrap D. Transcriptional control of the factor IX gene: analysis of five cis-acting elements and the deleterious effects of naturally occurring hemophilia B Leyden mutations. Blood. 1994;84(9):2992-3000.

Ponomarenko M., Rasskazov D., Arkova O., Ponomarenko P., Suslov V., Savinkova L., Kolchanov N. How to use SNP_TATA_Comparator to find a significant change in gene expression caused by the regulatory SNP of this gene's promoter via a change in affinity of the TATA-binding protein for this promoter. Biomed. Res. Int. 2015; 2015:359835. DOI 10.1155/2015/359835.

Savinkova L., Drachkova I., Arshinova T., Ponomarenko P., Ponomarenko M., Kolchanov N. An experimental verification of the predicted effects of promoter TATA-box polymorphisms associated with human diseases on interactions between the TATA boxes and TATA-binding protein. PLoS ONE. 2013;8(2):22-23.

Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Blood. 2008;112(10):3927-3938. DOI 10.1182/blood-2008-04-078188.

Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E.M., Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res. 2001;29(1):308-311. DOI 10.1093/nar/29.1.308.

Steinberg M., Adams J.G. 3rd Hemoglobin A2: origin, evolution, and aftermath. Blood. 1991;78:2165-2177.

Wu J., Wu M., Li L., Liu Z., Zeng W., Jiang R. dbWGFP: a database and web server of human whole-genome single nucleotide variants and their functional predictions. Database (Oxford). 2016;pii: baw024. DOI 10.1093/database/baw024.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):153-160
DOI 10.18699/VJ18.343

Анализ взаимодействия генов нейронального апоптоза в ассоциативной генной сети болезни Паркинсона

М.А. Янкина[1], О.В. Сайк[2] ✉, П.С. Деменков[2], Э.К. Хуснутдинова[1, 3], Е.И. Рогаев[2, 4, 5, 6], И.Н. Лаврик[2, 7], В.А. Иванисенко[2]

[1] Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[3] Башкирский государственный университет, Уфа, Россия
[4] Медицинская школа Массачусетского университета в Вустере, Вустер, США
[5] Институт общей генетики Российской академии наук, Москва, Россия
[6] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия
[7] Магдебургский университет им. Отто фон Герике, Магдебург, Германия

В мире болезнью Паркинсона (БП) страдают 7–10 млн человек, в России – около 210 тыс. человек. Эта болезнь сопровождается дегенерацией дофаминергических нейронов, в связи с чем нейрональный апоптоз рассматривается как важнейший фактор данного заболевания. Одним из ключевых подходов в системной биологии служит анализ генных сетей. Ранее нами была разработана система ANDSystem, предназначенная для автоматического извлечения знаний из научных публикаций и реконструкции на этой основе ассоциативных генных сетей, описывающих молекулярно-генетические механизмы биологических процессов в норме и при патологии. Целью работы было применение системы ANDSystem для приоритизации генов нейронального апоптоза, характеризующей их вовлеченность в патологические механизмы, с учетом структуры ассоциативной генной сети БП. Анализ центральности генов нейронального апоптоза, ассоциированных с БП, по данным ANDSystem, в ассоциативной генной сети БП показал, что среднее значение их центральностей по степени, близости и посредничеству статистически значимо превышает таковое, рассчитанное по всем вершинам сети БП. Среди генов, обладающих наибольшими показателями центральности, оказались *APOE*, *CASP3* и *GAPDH*, играющие важную роль в нейрональном апоптозе. Приоритизация генов нейронального апоптоза, для которых в системе ANDSystem не было данных об их ассоциации с БП, проводилась с использованием стандартных методов (Endeavor и ToppGene), а также критериев центральности и специфичности их взаимодействий с ассоциативной генной сетью БП. Показано, что среди генов, обладающих наивысшим приоритетом (рассматривались 50, 70, 100 наиболее приоритетных), преимущественно представлены гены, вовлеченные в положительную и отрицательную регуляцию нейронального апоптоза, сигнальные пути MAPK и Eph-рецепторов и др., в частности *TP53*, *JUN*, *BCL2*, *PIK3CA* и *APP*.

Ключевые слова: нейрональный апоптоз; болезнь Паркинсона; ANDSystem; ассоциативные генные сети.

Analysis of the interactions of neuronal apoptosis genes in the associative gene network of Parkinson's disease

M.A. Yankina[1], O.V. Saik[2] ✉, P.S. Demenkov[2], E.K. Khusnutdinova[1, 3], E.I. Rogaev[2, 4, 5, 6], I.N. Lavrik[2, 7], V.A. Ivanisenko[2]

[1] Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Centre RAS, Ufa, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[3] Bashkir State University, Ufa, Russia
[4] University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA
[5] Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia
[6] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow, Russia
[7] Otto von Guericke University, Magdeburg, Germany

Parkinson's disease (PD) affects an estimated 7–10 million people worldwide and 210000 people in Russia. PD is accompanied by degeneration of dopaminergic neurons and because of that neuronal apoptosis is an important factor in this disease. Analysis of gene networks is one of the key approaches in systems biology. We previously developed the ANDSystem tool, designed to automatically extract knowledge from scientific publications and reconstruct on this basis associative gene networks describing the molecular genetic mechanisms of biological processes. The aim of this work was prioritization of neuronal apoptosis genes by their involvement in PD pathogenesis, taking into account the structure of the PD associative gene network using ANDSystem. Analysis of the centrality of neuronal apoptosis genes, associated with PD, revealed that mean values of degree, closeness and betweenness centralities statistically significantly exceed such values of all nodes of the PD network. The *APOE*, *CASP3* and *GAPDH* genes involved in neuronal apoptosis were among the most central genes. Prioritization of neuronal apoptosis genes for which there was no data in ANDSystem on their associations with PD was performed using standard methods (Endeavor and ToppGene) and the criteria of centrality and specificity of genes interactions with the PD gene network. Analysis revealed that genes involved in such processes as positive and negative regulation of neu-

Received 27.09.2017
Accepted for publication 23.11.2017
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: saik@bionet.nsc.ru

ronal apoptosis, MAPK and ephrin receptor signaling pathways, are mainly represented among candidate genes with the highest priority (top 50, 70, 100 genes were considered). In particular, *TP53*, *JUN*, *BCL2*, *PIK3CA* and *APP* were among candidate genes with the highest priority.

Key words: neuronal apoptosis; Parkinson's disease; ANDSystem; associative gene networks.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Янкина М.А., Сайк О.В., Деменков П.С., Хуснутдинова Э.К., Рогаев Е.И., Лаврик И.Н., Иванисенко В.А. Анализ взаимодействия генов нейронального апоптоза в ассоциативной генной сети болезни Паркинсона. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):153-160. DOI 10.18699/VJ18.343

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yankina M.A., Saik O.V., Demenkov P.S., Khusnutdinova E.K., Rogaev E.I., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Analysis of the interactions of neuronal apoptosis genes in the associative gene network of Parkinson's disease. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):153-160. DOI 10.18699/VJ18.343 (in Russian)

Болезнь Паркинсона (БП) характеризуется медленной прогрессирующей дегенерацией дофаминергических нейронов в черной субстанции. Патология проявляется в виде нарушений двигательных функций, включая тремор, гипокинезию, мышечную ригидность и постуральную неустойчивость. Болезнь часто сопровождается вегетативными и психическими расстройствами и неуклонно прогрессирует с неблагоприятным прогнозом (Reichmann et al., 2016). Это одно из наиболее распространенных нейродегенеративных расстройств, от которого в мире страдает от 7 до 10 млн человек (Staudt et al., 2016), в России это число составляет порядка 210 тыс. человек (Раздорская и др., 2016). В настоящее время не существует эффективных лекарств против данного заболевания (Jha et al., 2015). Известно, что программируемая смерть нейронов – один из ключевых факторов патогенеза нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Паркинсона (Mochizuki et al., 1996; Anglade et al., 1997; Kountouras et al., 2012; Nixon, Yang, 2012; Pal et al., 2016). В норме нейрональный апоптоз выполняет важнейшую физиологическую роль в нервной системе при нейрогенезе. При этом происходит апоптотическая гибель большого количества избыточных нейронов, таким образом поддерживается баланс клеток в развивающейся нервной системе (Franklin, 2011; Kristiansen, Ham, 2014). Важными факторами, регулирующими апоптоз, являются гены семейства Bcl-2. В него входят антиапоптотические (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bcl-w*, *Bcl-1*) и проапоптотические (*Bax*, *Bak*, *Bad*, *Bid*) гены. Запуск апоптоза во многом зависит от соотношения про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 (Li et al., 2017b). Известно, что у пациентов, страдающих БП, наблюдается сниженный уровень экспрессии антиапоптотических *Bcl-2* генов (Yalçınkaya et al., 2016), повышенный уровень экспрессии гена Bax, а также увеличение активности каспаз-3, -8 и -9 в дофаминергических нейронах (Dauer, Przedborski, 2003). Обнаружено, что у пациентов с БП уровень ФНО-α, способный индуцировать апоптоз через рецептор p55, повышен в глиальных клетках черной субстанции, а экспрессия рецептора ФНО-α p55 активирована в дофаминергических нейронах (Boka et al., 1994). Установление дополнительных генов, которые могут отвечать за нарушения в нейрональном апоптозе при болезни Паркинсона, является актуальной задачей. Данные исследования могут помочь в предсказании новых лекарственных мишеней, а также в поиске молекулярных маркеров заболевания.

Современные компьютерные подходы к анализу молекулярных механизмов сложных патофизиологических состояний и процессов основаны на реконструкции и анализе генных сетей, описывающих взаимосвязи между генами, белками, метаболитами и другими биологическими объектами, ассоциированными с патологией. Ранее нами была разработана система ANDSystem, предназначенная для автоматического извлечения знаний из научных публикаций и реконструкции на этой основе ассоциативных генных сетей, описывающих молекулярно-генетические механизмы биологических процессов и патологий (Demenkov et al., 2012; Ivanisenko et al., 2015). В частности, с использованием ANDSystem проводился анализ протеомных данных по исследованию *Helicobacter pylori* (Momynaliev et al., 2010); протеомного профиля мочи в норме и при действии факторов космического полета (Larina et al., 2015; Pastushkova et al., 2015); тканеспецифического эффекта нокаута генов и поиск потенциальных мишеней для лекарственных препаратов (Petrovskiy et al., 2015); генных сетей жизненного цикла вируса гепатита С (Popik et al., 2016); коморбидных отношений бронхиальной астмы и туберкулеза (Bragina et al., 2014), гестоза, диабета и ожирения (Glotov et al., 2015), глаукомы (Saik et al., 2017); поиск новых генов-кандидатов восприимчивости к туберкулезу (Bragina et al., 2016).

В настоящей работе решалась задача характеризации важности генов нейронального апоптоза в БП на основе применения стандартных методов приоритизации, а также методов ANDSystem, учитывающих структуру генной сети, включающей 630 генов/белков, ассоциированных с БП (ассоциативная генная сеть БП). Анализ информации о молекулярно-генетических взаимодействиях генов нейронального апоптоза с генами, ассоциированными с БП, позволил предложить новые гены-кандидаты для планирования экспериментов по генотипированию.

Материалы и методы

Список генов, вовлеченных в нейрональный апоптоз (GO:0051402), получен с помощью системы AmiGO 2 (Ashburner et al., 2000).

Реконструкция ассоциативных генных сетей, описывающих молекулярно-генетические взаимодействия между

генами и белками, осуществлялась с использованием системы ANDSystem (Demenkov et al., 2012; Ivanisenko et al., 2015).

Центральности вершин по степени (degree centrality), по близости (closeness centrality) и по посредничеству (betweenness centrality) в генной сети оценивались с помощью пакета networkx, реализованного на языке программирования Python (Hagberg et al., 2008). Центральность по степени характеризует число связей вершины с другими вершинами в графе. Центральность по близости описывает, насколько близко вершина расположена к остальным вершинам сети. Показатель центральности по посредничеству определяется числом наикратчайших путей между всеми парами вершин анализируемого графа, проходящих через заданную вершину. Статистическая значимость отличий средних значений центральностей генов нейронального апоптоза от таковых всех генов ассоциативной генной сети БП оценивалась согласно непараметрическому критерию Манна–Уитни. Для расчетов использовалась функция wilcox.test пакета Mann-Whitney-Wilcoxon Test, реализованного на языке программирования R (https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/wilcox.test.html). Для учета поправки на непрерывность задавалось значение параметра correct = TRUE.

Первый критерий приоритизации рассчитывался с помощью программы ToppGene (https://toppgene.cchmc.org/prioritization.jsp). Все настройки использовались по умолчанию. В качестве тестового набора подавался список генов нейронального апоптоза, в качестве обучающего – список генов БП, не вовлеченных в нейрональный апоптоз таким образом, чтобы списки не пересекались.

Второй критерий рассчитывали с помощью системы для приоритизации генов Endeavour version: 3.71 (https://endeavour.esat.kuleuven.be/Endeavour.aspx). Были применены настройки, заданные по умолчанию. Тестовый и тренировочный наборы генов использовались такие же, как и для первого критерия приоритизации.

Третьим критерием приоритизации был показатель центральности CTC (cross-talk centrality), рассчитываемый с помощью функции Intelligent Filtration программы ANDVisio. Центральность CTC вычислялась по формуле:

$$CTC_i = N_i/M, \quad (1)$$

где N_i – число связей i-го гена с участниками ассоциативной генной сети БП в глобальной сети (базе знаний) ANDSystem; M – число участников (вершин) ассоциативной генной сети БП.

Для расчета четвертого критерия приоритизации использовался показатель специфичности CTS (cross-talk specificity) функции Intelligent Filtration программы ANDVisio. Расчет специфичности CTS осуществлялся по формуле:

$$CTS_i = N_i/K_i, \quad (2)$$

где K_i – общее число связей i-го гена в глобальной сети (базе знаний) ANDSystem.

Показателем приоритета гена для комбинированных критериев, основанных на усреднении рангов, являлось среднее значение рангов для этого гена, полученных по индивидуальным критериям, входящим в рассматриваемые комбинации: CTC/CTS, CTC/ToppGene, CTC/Endeavour, CTC/CTS/ToppGene, CTC/CTS/Endeavour, CTC/Endeavour/ToppGene, CTC/CTS/Endeavour/ToppGene.

Показатель приоритета гена для комбинированных критериев, основанных на голосовании, рассчитывался как число индивидуальных критериев (CTC, CTS, ToppGene, Endeavour), согласно которым ген попадал в список 10, 20, 50 и 100 наиболее приоритетных генов.

Оценка качества критериев приоритизации проводилась с помощью анализа обогащенности отранжированных списков генов генами, ассоциированными с БП, по данным ANDSystem. Процедура включала в себя следующие шаги: на первом шаге для формирования обучающего набора генов из списка генов, ассоциированных с БП, были удалены гены нейронального апоптоза. Исключенные гены составили список контроля (Приложение 1[1]); на следующем шаге с использованием разработанных критериев проводилась приоритизация генов нейронального апоптоза, включая гены контроля. Анализ обогащенности проводился для 10, 20, 50 и 100 наиболее приоритетных генов, отранжированных на основе критериев приоритизации. Оценка статистической значимости обогащенности генами контроля списка топ-генов осуществлялась программой GeneProf (Halbritter et al., 2012) с использованием гипергеометрического распределения.

Перепредставленность GO биологических процессов в изучаемых наборах генов выявлялась с помощью системы DAVID 6.8 (Huang et al., 2009). Для корректировки на множественное сравнение использовалась поправка FDR.

Результаты и обсуждение

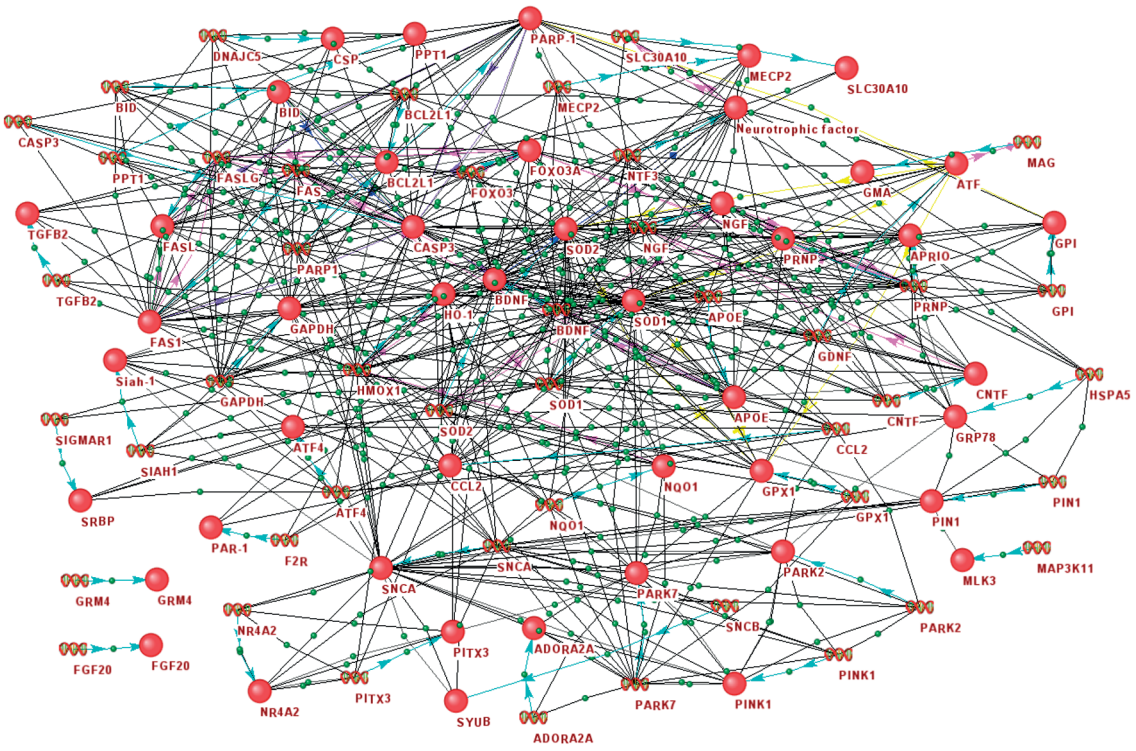
Ассоциативная генная сеть БП, реконструированная с помощью системы ANDSystem, включала 630 генов/белков, вовлеченных в болезнь Паркинсона, и 15924 связей. Основное количество связей было представлено связями типа «ассоциация» (12815), «белок-белок взаимодействия» (1761), «регуляция активности» (460), «регуляция экспрессии» (203), а остальные 685 связей относились к регуляции транспорта, регуляции деградации, каталитическим реакциям и т. д.

Для осуществления приоритизации генов по их потенциальной важности для патогенеза БП рассматривался список из 218 генов, экстрагированных из системы AmiGO 2, связанных с категорией «нейрональный апоптоз» (GO:0051402) Gene Ontology. Оказалось, что в списке генов, ассоциированных с БП, присутствует 45 генов из 218, вовлеченных в нейрональный апоптоз. Фрагмент ассоциативной генной сети БП, включающий гены нейронального апоптоза, показан на рисунке.

Среди генов, одновременно ассоциированных с БП и являющихся участниками нейронального апоптоза, преимущественно были представлены гены, вовлеченные в положительную и отрицательную регуляцию нейронального апоптоза (GO:0043525, p-value $< 10^{-7}$ и GO:0043524, p-value $< 10^{-36}$), а также ответ клетки на оксидативный стресс (GO:0034599, p-value $< 10^{-4}$) и др., согласно анализу перепредставленности DAVID.

Анализ центральности вершин в ассоциативной генной сети БП, соответствующих 45 генам нейронального

[1] Приложения 1 и 2 см. по адресу: http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx3.pdf



The associative gene network including neuronal apoptosis genes associated with Parkinson's disease.

Table 1. Mean values of parameters of node centralities in the PD associative gene network

Centrality parameter	Mean centrality		p-value*
	over all nodes	of nodes corresponding to genes for neuronal apoptosis	
Degree	0.0511	0.0668	0.0056
Closenessи	0.4407	0.4415	0.0216
Betweenness	483.4648	664.9022	0.0052

* Statistical significance of the difference between mean centralities calculated for all nodes of the PD associative network and nodes corresponding to genes for neuronal apoptosis in the network according to the Mann– Whitney test.

апоптоза, показал для них высокие значения индексов центральности по степени, близости и посредничеству. Значения индексов центральности вершин в ассоциативной генной сети БП, соответствующих генам, вовлеченным в некоторые другие биологические процессы, приведены в Приложении 2. Среднее значение центральности генов нейронального апоптоза, согласно критерию Манна–Уитни, значимо превышало среднее значение этого показателя, рассчитанное по всем генам ассоциативной генной сети БП (табл. 1), что указывает на ключевую роль данных генов в структуре генной сети.

Из табл. 1 видно, что среднее значение показателя центральности вершин по посредничеству, соответствующих генам нейронального апоптоза, наиболее значимо превышает средний показатель центральности, рассчитанный по всем вершинам сети. Этот показатель заслуживает отдельного внимания, поскольку характеризует связь вершин с наикратчайшими путями в сети, которые часто выступают в качестве путей передачи сигналов от одной вершины к другой (Gong, Zhang, 2007). Можно ожидать, что нарушения функции генов (например, в результате мутаций), соответствующих вершинам с высоким значением данного показателя, могут существенно влиять на пути передачи сигналов, транспортные пути, метаболические и другие пути, представляющие собой цепочки взаимосвязанных генов. В частности, гены, обладающие высокой центральностью по посредничеству, участвуют в различных путях передачи сигнала. Например, ген *APOE* вовлечен в пути передачи сигнала G-белками (Cheng et al., 2015), *CASP3* – в сигнальный путь тирозинкиназного рецептора нейротропина (Steinkamp et al., 2012), *GAPDH* – в сигнальный путь HIF-1 (Nagai et al., 2014). Следует отметить, что при нейрональном апоптозе наблюдается значительное увеличение уровня экспрессии этих генов (Chen et al., 1999; Elliott et al., 2007; D'Amelio et al., 2012). Таким образом, результаты анализа центральностей генов, одновременно ассоциированных с БП и вовлеченных в нейрональный апоптоз, указывают на их потенциально важное значение для функционирования ассоциативной генной сети БП, что хорошо согласуется с данными лите-

Table 2. Enrichment (p-value) with PD-associated genes in lists of genes with highest priorities according to different criteria

Criterion#	Top 10	Top-20	Top-50	Top-100
ToppGene	0.3406	0.2082	**0.0086***	**10^{-5}***
Endeavour	1	0.3975	0.1047	**0.0001***
CTC	0.0337*	**0.0088***	**0.0001***	**10^{-7}***
CTS	0.1275	0.0311*	**0.0086***	**0.0014***
CTC/CTS	**0.0062***	**0.002***	**10^{-4}***	**10^{-4}***
CTC/ToppGene	0.1275	0.0891	**0.0029***	**10^{-6}***
CTC/Endeavour	0.1275	0.0891	**0.0086***	**10^{-6}***
CTC/CTS/ToppGene	0.1275	0.0311*	**0.0002***	**10^{-9}***
CTC/CTS/Endeavour	0.0337*	0.0311*	**0.0009***	**10^{-5}***
CTC/Endeavour/ToppGene	0.3406	0.0891	**0.0086***	**10^{-5}***
CTC/CTS/Endeavour/ToppGene	0.1275	0.2082	**0.0029***	**10^{-6}***

Rank averaging criteria were used as combined criteria.
* The statistical significance threshold was taken to be $p < 0.05$. Values with $p < 0.01$ are shown in boldface.

ратуры о ключевой роли апоптоза в механизме БП (Schapira, Jenner, 2011).

Для приоритизации генов нейронального апоптоза, которые не входили в состав ассоциативной генной сети БП, в настоящей работе использовано четыре критерия: ToppGene и Endeavor, предложенные в исследованиях (Chen et al., 2007; Tranchevent et al., 2008), а также критерии, рассчитываемые с помощью методов ANDSystem, включающие центральность CTC (cross-talk centrality) и специфичность CTS (cross-talk specificity). В качестве дополнительных критериев рассмотрено семь различных комбинаций описанных выше критериев (см. Приложение 1).

Для определения качества используемых критериев проводилась оценка обогащенности отранжированного списка генов, генами, ассоциированными с БП, которые были исключены из обучающего набора (табл. 2). Обогащенность оценивалась для 10, 20, 50 и 100 генов-кандидатов с наивысшим приоритетом согласно рассматриваемому критерию. Оказалось, что для всех 11 рассмотренных критериев списки топ-100 наиболее приоритетных генов были статистически значимо обогащены генами, ассоциированными с БП (p-value < 0.05). При этом наилучшая статистическая значимость обогащения ($p < 10^{-9}$) наблюдалась для комбинированного критерия CTC/CTS/ToppGene. Для списка топ-50 генов статистическая значимость обогащения наблюдалась для всех рассмотренных критериев, кроме Endeavour. Статистическая значимость обогащения для топ-20 была достигнута при применении двух индивидуальных критериев (CTC и CTS), а также трех комбинированных критериев (CTC/CTS, CTC/CTS/ToppGene и CTC/CTS/Endeavour). Список топ-10 был статистически значимо обогащен генами, вовлеченными в БП, в случаях использования индивидуального критерия CTC, а также двух комбинированных критериев (CTC/CTS и CTC/CTS/Endeavour). Следует отметить, что комбинированные критерии, основанные на усреднении и голосовании, показали сходные результаты.

Интересно, что наибольшая статистическая достоверность обогащения для списков топ-10, 20 и 50 наблюдалась при использовании комбинированного критерия CTC/CTS. Показатели центральности CTC и специфичности CTS отражают характер взаимодействия анализируемых вершин в глобальной ассоциативной генной сети ANDSystem. Ассоциативная генная сеть ANDSystem имеет сложную структуру, основанную на более 20 типах взаимодействий между объектами, включая физические, химические, регуляторные и ассоциативные связи (Ivanisenko et al., 2015). Таким образом, проведенный выше анализ показал, что учет структуры генных сетей, описывающих взаимодействия генов из тестового набора с генами, ассоциированными с заболеванием, может существенно улучшить критерии приоритизации генов.

Для того чтобы выяснить, какие биологические процессы наиболее тесно связаны с набором 100 наиболее приоритетных генов, согласно критерию CTC, проведен анализ перепредставленности с использованием программы DAVID. Оказалось, что среди анализируемых наборов генов преимущественно представлены гены, вовлеченные в положительную и отрицательную регуляцию нейронального апоптоза (GO:0043525, p-value < 10^{-42} и GO:0043524, p-value < 10^{-97}), так же как и в случае 45 генов нейронального апоптоза, ассоциированных с БП. Особого внимания среди выявленных значимых биологических процессов заслуживают процессы, которые не были в числе сверхпредставленных для набора генов, одновременно ассоциированных с БП и вовлеченных в нейрональный апоптоз, включая сигнальные пути MAPK (GO:0000165, p-value < 10^{-5}) и каскад Eph-рецепторов (GO:0048013, p-value < 10^{-4}). Известно, что сигнальные пути MAPK играют важную роль в поддержании баланса между проапоптотическим и антиапоптотическим процессами, и их нарушение может вносить вклад в БП посредством активации микроглии, нейровоспаления, окислительного стресса и апоптоза (Jha et al., 2015). Каскад Eph-рецепторов вовлечен в регуляцию роста аксонов (Sutherland et al., 2009).

Table 3. Top 10 candidate genes with the lowest ranks according to the CTC prioritization criterion and their ranks according to four individual criteria

Gene	GeneId	Rank			
		Centrality CTC	Specificity CTS	ToppGene	Endeavour
TP53	7157	1	166	7	16
JUN	3725	2	143	58	1
BCL2	596	3	114	34	36
CASP3#	836	4	119	52	14
SOD1#	6647	5	120	18	15
PIK3CA	5290	6	109	21	19
APOE#	348	7	39	11	27
APP	351	8	76	8	6
CCL2#	6347	9	108	23	51
HMOX1#	3162	10	38	84	96
*GSK3A**	2931	126.5	1	97	85
*JAK2**	3717	32	83	1	11

Genes associated with Parkinson's disease according to ANDSystem data.
* Genes not entering the list of top 10 according to the CTC criterion but possessing the best ranks according to CTS and ToppGene.

Прямых данных об участии каскада Eph-рецепторов в патогенезе БП в литературе не приведено. Однако есть сведения о дифференциальной экспрессии участников данного процесса при БП (Sutherland et al., 2009).

Список топ-10 генов, отранжированных по критерию CTC с указанием рангов для этих генов, полученных также с использованием трех других индивидуальных критериев, показан в табл. 3 (результаты ранжирования генов по всем критериям, включая их комбинации, приведены в Приложении 2). При ранжировании согласно критерию CTC наибольшим приоритетом обладали гены *TP53*, *JUN*, *BCL2*, *CASP3*, *SOD1*, *PIK3CA*, *APOE*, *APP*, *CCL2* и *HMOX1* (см. табл. 3). Среди них пять генов (*APOE*, *CASP3*, *CCL2*, *SOD1* и *HMOX1*) были ассоциированы с БП, по данным ANDSystem. Например, известно, что продукт гена *APOE* в мозге регулирует транспорт липидов и участвует в обмене холестерина (Elliott et al., 2007). Мутации в этом гене связаны с развитием БП (Li et al., 2017a). Показано, что при апоптотической гибели нервных клеток линии SK-N-SH происходит увеличение уровня мРНК apoE, которое коррелировало с активацией каспазы-3 и с образованием апоптотических телец, а уровень белка ApoE увеличивался в восемь раз при апоптозе (Elliott et al., 2007).

Особого внимания заслуживает рассмотрение пяти генов (*TP53*, *JUN*, *BCL2*, *PIK3CA* и *APP*), попавших в табл. 3, для которых в ANDSystem не было информации об их ассоциациях с БП. Гены *TP53*, *JUN*, *BCL2* и *APP* достаточно активно обсуждаются в литературе в связи с БП (Rekha, Selvakumar, 2014; Li et al., 2016; Oh et al., 2016; Lu et al., 2017). Ген *TP53* кодирует белок-опухолевый супрессор, который регулирует многие процессы, в том числе клеточный цикл, апоптоз, старение клетки, репарацию ДНК и метаболизм. Мутации в этом гене ассоциированы с различными раковыми заболеваниями. Ген *JUN* кодирует белок c-Jun, который совместно с белком c-Fos образует транскрипционный фактор AP-1 и участвует в регуляции апоптоза, дифференцировки клеток, клеточного цикла, а также развитии опухолей. Ген *BCL2* кодирует митохондриальный интегральный мембранный белок, который блокирует апоптоз ряда клеток, в том числе нейрональных, за счет изменения проницаемости митохондриальной мембраны. Ген *APP* (amyloid beta precursor protein) кодирует рецептор клеточной поверхности и трансмембранный белок-предшественник, который расщепляется секретазами с образованием целого ряда пептидов. Мутации в этом гене имеют связь с аутосомно-доминантной формой болезни Альцгеймера и церебральным амилоидозом (Pera et al., 2013).

Особенный интерес представляет ген *PIK3CA*, ассоциации которого с БП в публикациях широко не описаны. Этот ген кодирует каталитическую субъединицу фосфатидилинозитол-3-киназы и участвует в регуляции AKT и mTOR сигнальных путей. Мутации в этом гене ассоциированы с раком шейки матки, раком груди и другими опухолевыми заболеваниями. Ген *PIK3CA* может рассматриваться как перспективный новый кандидат для планирования экспериментов по генотипированию.

Среди генов, не входящих в список из 10 наиболее приоритетных, но обладающих наименьшим рангом при рассмотрении отдельно взятых критериев, оказались *GSK3A* (специфичность CTS) и *JAK2* (ToppGene). Для критерия Endeavour обнаружено, что ген *JUN*, обладающий наилучшим рангом, был вторым в списке 10 наиболее приоритетных по критерию CTC. Ни для одного из этих генов в ANDSystem не было информации об ассоциации с болезнью Паркинсона, что свидетельствует о важности рассмотрения комбинации критериев.

Заключение

В настоящей работе с использованием стандартных методов приоритизации, а также критериев, основанных на анализе ассоциативных генных сетей, реконструкция

которых выполнялась с помощью ANDSystem, проведено изучение потенциальной важности генов нейронального апоптоза в ассоциативной генной сети болезни Паркинсона. Показано, что учет в критериях приоритизации информации о структуре ассоциативных генных сетей позволяет существенно улучшить обогащение ранжированного списка, генами, для которых известны данные об их ассоциации с БП. В частности, среди генов нейронального апоптоза, ассоциированных с БП, как наиболее значимые можно выделить *APOE*, *CASP3* и *GAPDH*. Известно, что уровень экспрессии этих генов значительно повышается при нейрональном апоптозе (Chen et al., 1999; Elliott et al., 2007; D'Amelio et al., 2012). Гены *PIK3CA*, *TP53*, *JUN*, *BCL2* и *APP* могут рассматриваться как потенциальные гены-кандидаты для дальнейшего экспериментального подтверждения их ассоциации с болезнью Паркинсона.

Acknowledgments

The reconstruction and analysis of the associative gene network of neuronal apoptosis were supported by the Russian Science Foundation, project 14-44-00011 «Programmed cell death induced via death receptors: identification of apoptosis-triggering molecular mechanisms by molecular simulation». The reconstruction of the associative gene network of Parkinson's disease was supported by the Government of the Russian Federation, project 14.B25.31.0033, Order no. 220 of April 9, 2010. The development of program scripts and algorithms for calculating centralities of graph nodes was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0017.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Anglade P., Vyas S., Javoy-Agid F., Herrero M.T., Michel P.P., Marquez J., Mouatt-Prigent A., Ruberg M., Hirsch E.C., Agid Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. Histol. Histopathol. 1997;12(1):25-32.

Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M., Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat. Genet. 2000;25(1):25-29.

Boka G., Anglade P., Wallach D., Javoy-Agid F., Agid Y., Hirsch E.C. lmmunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. Neurocci. Lett. 1994;172:151-154.

Bragina E.Y., Tiys E.S., Freidin M.B., Koneva L.A., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A., Kolchanov N.A., Puzyrev V.P. Insights into pathophysiology of dystropy through the analysis of gene networks: an example of bronchial asthma and tuberculosis. Immunogenetics. 2014;66(7-8):457-465. DOI 10.1007/s00251-014-0786-1.

Bragina E.Y., Tiys E.S., Rudko A.A., Ivanisenko V.A., Freidin M.B. Novel tuberculosis susceptibility candidate genes revealed by the reconstruction and analysis of associative networks. Infect. Genet. Evol. 2016;46:118-123. DOI 10.1016/j.meegid.2016.10.030.

Chen J., Xu H., Aronow B.J., Jegga A.G. Improved human disease candidate gene prioritization using mouse phenotype. BMC Bioinformatics. 2007;8:392. DOI 10.1186/1471-2105-8-392.

Chen R.W., Saunders P.A., Wei H., Li Z., Seth P., Chuang D.M. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53. J. Neurosci. 1999;19(21):9654-9662.

Cheng W.L., Wang P.X., Wang T., Zhang Y., Du C., Li H., Ji Y. Regulator of G-protein signalling 5 protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Br. J. Pharmacol. 2015;172(23):5676-5689. DOI 10.1111/bph.12991.

Dauer W., Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron. 2003;39(6):889-909. DOI 10.1016/S0896-6273(03)00568-3.

D'Amelio M., Sheng M., Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. Trends Neurosci. 2012;35(11):700-709. DOI 10.1016/j.tins.2012.06.004.

Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. In Silico Biol. 2012;11(3-4):149-161. DOI 10.3233/ISB-2012-0449.

Elliott D.A., Kim W.S., Jans D.A., Garner B. Apoptosis induces neuronal apolipoprotein-E synthesis and localization in apoptotic bodies. Neurosci. Lett. 2007;416(2):206-210. DOI 10.1016/j.neulet.2007.02.014.

Franklin J.L. Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. Antioxid. Redox Signal. 2011;14(8):1437-1448. DOI 10.1089/ ars.2010.3596.

Glotov A.S., Tiys E.S., Vashukova E.S., Pakin V.S., Demenkov P.S., Saik O.V., Ivanisenko T.V., Arzhanova O.N., Mozgovaya E.V., Zainulina M.S., Kolchanov N.A., Baranov V.S., Ivanisenko V.A. Molecular association of pathogenetic contributors to pre-eclampsia (pre-eclampsia associome). BMC Syst. Biol. 2015;9(Suppl. 2):S4. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S4.

Gong Y., Zhang Z. Alternative pathway approach for automating analysis and validation of cell perturbation networks and design of perturbation experiments. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007;1115(1):267-285.

Hagberg A., Swart P., Schult D. Exploring network structure, dynamics, and function using NetworkX. Los Alamos National Laboratory (LANL). 2008.

Halbritter F., Vaidya H.J., Tomlinson S.R. GeneProf: analysis of high-throughput sequencing experiments. Nat. Methods. 2012;9(1):7-8.

Huang da W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat. Protoc. 2009;4(1):44-57. DOI 10.1038/nprot.2008.211.

Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: An associative network discovery system for automated literature mining in the field of biology. BMC Syst. Biol. 2015;9(Suppl. 2):S2. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S2.

Jha S.K., Jha N.K., Kar R., Ambasta R.K., Kumar P. p38 MAPK and PI3K/AKT signalling cascades in Parkinson's disease. Int. J. Mol. Cell. Med. 2015;4(2):67-86.

Kountouras J., Zavos C., Polyzos S.A., Deretzi G., Vardaka E., Giartza-Taxidou E., Katsinelos P., Rapti E., Chatzopoulos D., Tzilves D., Stergiopoulos C., Christodoulou K. Helicobacter pylori infection and Parkinson's disease: apoptosis as an underlying common contributor. Eur. J. Neurol. 2012;19(6):e56. DOI 10.1111/j.1468-1331.2012.03695.x.

Kristiansen M., Ham J. Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model. Cell Death Differ. 2014;21(7):1025-1035. DOI 10.1038/cdd.2014.47.

Larina I.M., Pastushkova L.Kh., Tiys E.S., Kireev K.S., Kononikhin A.S., Starodubtseva N.L., Popov I.A., Custaud M.A., Dobrokhotov I.V., Nikolaev E.N., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Permanent proteins in the urine of healthy humans during the Mars-500 experiment. J. Bioinform. Comp. Biol. 2015;13(1):1540001. DOI 10.1142/S0219720015400016.

Li L., Liu M.S., Li G.Q., Tang J., Liao Y., Zheng Y., Guo T.-L., Kang X., Yuan M.T. Relationship between Apolipoprotein Superfamily and Parkinson's Disease. Chin. Med. J. 2017a;130(21):2616. DOI 10.4103/0366-6999.217092.

Li K., Zhang J., Ji C., Wang L. MiR-144-3p and its target gene β-amyloid precursor protein regulate 1-methyl-4-phenyl-1,2-3,6-tetrahydropyridine-induced mitochondrial dysfunction. Mol. Cells. 2016;39(7):543-549. DOI 10.14348/molcells.2016.0050.

Li X., Zhang Y., Wang Y., Xu J., Xin P., Meng Y., Wang Q., Kuang H. The mechanisms of traditional Chinese medicine underlying the

prevention and treatment of Parkinson's disease. Front. Pharmacol. 2017b;8:634. DOI 10.3389/fphar.2017.00634.

Lu T., Kim P., Luo Y. Tp53 gene mediates distinct dopaminergic neuronal damage in different dopaminergic neurotoxicant models. Neural. Regen. Res. 2017;12(9):1413-1417. DOI 10.4103/1673-5374.215243.

Mochizuki H., Goto K., Mori H., Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. J. Neurol. Sci. 1996;137(2):120-123.

Momynaliev K.T., Kashin S.V., Chelysheva V.V., Selezneva O.V., Demina I.A., Serebryakova M.V., Alexeev D., Ivanisenko V.A., Aman E., Govorun V.M. Functional divergence of Helicobacter pylori related to early gastric cancer. J. Proteome Res. 2010;9(1):254-267. DOI 10.1021/pr900586w.

Nagai J., Yamamoto A., Katagiri Y., Yumoto R., Takano M. Fatty acid-bearing albumin but not fatty acid-depleted albumin induces HIF-1 activation in human renal proximal tubular epithelial cell line HK-2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014;18;450(1):476-481. DOI 10.1016/j.bbrc.2014.05.146.

Nixon R.A., Yang D.S. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012;4(10). pii:a008839. DOI 10.1101/cshperspect.a008839.

Oh Y., Jeong K., Kim K., Lee Y.S., Jeong S., Kim S.S., Yoon K.S., Ha J., Kang I., Choe W. Cyclophilin B protects SH-SY5Y human neuroblastoma cells against MPP(+)-induced neurotoxicity via JNK pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2016;478(3):1396-1402. DOI 10.1016/j.bbrc.2016.08.135.

Pal R., Tiwari P.C., Nath R., Pant K.K. Role of neuroinflammation and latent transcription factors in pathogenesis of Parkinson's disease. Neurol. Res. 2016;38(12):1111-1122.

Pastushkova L.Kh., Kononikhin A.S., Tiys E.S., Nosovsky A.M., Dobrokhotov I.V., Ivanisenko V.A., Nikolaev E.N., Novoselova N.M., Custaud M.A., Larina I.M. Shifts in urine protein profile during dry immersion. Aviakosm. Ekolog. Med. 2015;49(4):15-19.

Pera M., Alcolea D., Sánchez-Valle R., Guardia-Laguarta C., Colom-Cadena M., Badiola N., Suárez-Calvet M., Lladó A., Barrera-Ocampo A.A., Sepulveda-Falla D., Blesa R., Molinuevo J.L., Clarimón J., Ferrer I., Gelpi E., Lleó A. Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease. Acta Neuropathol. 2013;125(2):201-213. DOI 10.1007/s00401-012-1062-9.

Petrovskiy E.D., Saik O.V., Tiys E.S., Lavrik I.N., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Prediction of tissue-specific effects of gene knockout on apoptosis in different anatomical structures of human brain. BMC Genomics. 2015;16(Suppl. 13):S3. DOI 10.1186/1471-2164-16-S13-S3.

Popik O.V., Petrovskiy E.D., Mishchenko E.L., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Mosaic gene network modelling identified new regulatory mechanisms in HCV infection. Virus Res. 2016;218:71-78. DOI 10.1016/j.virusres.2015.10.004.

Razdorskaya V.V., Voskresenskaya O.N., Yudina G.K. Parkinson's disease in Russia: prevalence and incidence (review). Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2016;12(3):379-384. (in Russian)

Reichmann H., Brandt M.D., Klingelhoefer L. The nonmotor features of Parkinson's disease: pathophysiology and management advances. Curr. Opin Neurol. 2016;29(4):467-473. DOI 10.1097/WCO.0000000000000348.

Rekha K.R., Selvakumar G.P. Gene expression regulation of Bcl2, Bax and cytochrome-C by geraniol on chronic MPTP/probenecid induced C57BL/6 mice model of Parkinson's disease. Chem. Biol. Interact. 2014;217:57-66. DOI 10.1016/j.cbi.2014.04.010.

Saik O.V., Konovalova N.A., Demenkov P.S., Ivanisenko N.V., Ivanisenko T.V., Ivanoshchuk D.E., Konovalova O.S., Podkolodnaya O.A., Lavrik I.N., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Molecular mechanisms of the interaction between the processes of the cell response to mechanical stress and neuronal apoptosis in primary open-angle glaucoma. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2017;7(5):558-564. DOI 10.1134/S2079059717050173.

Schapira A.H., Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Mov. Disord. 2011;26(6):1049-1055. DOI 10.1002/mds.23732.

Staudt M.D., Di Sebastiano A.R., Xu H., Jog M., Schmid S., Foster P., Hebb M.O. Advances in neurotrophic factor and cell-based therapies for Parkinson's disease: A mini-review. Gerontology. 2016;62(3):371-380. DOI 10.1159/000438701.

Steinkamp M., Schulte N., Spaniol U., Pflüger C., Hartmann C., Kirsch J., von Boyen G.B. Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation. Med. Sci. Monit. 201;18(4):BR117-BR122.

Sutherland G.T., Matigian N.A., Chalk A.M., Anderson M.J., Silburn P.A., Mackay-Sim A., Wells C.A., Mellick G.D. A cross-study transcriptional analysis of Parkinson's disease. PLoS ONE. 2009;4(3):e4955. DOI 10.1371/journal.pone.0004955.

Tranchevent L.C., Barriot R., Yu S., Van Vooren S., Van Loo P., Coessens B., De Moor B., Aerts S., Moreau Y. ENDEAVOUR update: a web resource for gene prioritization in multiple species. Nucleic Acids Res. 2008;36:W377-W384. DOI 10.1093/nar/gkn325.

Yalçınkaya N., Haytural H., Bilgiç B., Özdemir Ö., Hanağası H., Küçükali C.İ., Özbek Z., Akcan U., İdrisoğlu H.A., Gürvit H., Tüzün E. Expression changes of genes associated with apoptosis and survival processes in Parkinson's disease. Neurosci. Lett. 2016;615:72-77. DOI 10.1016/j.neulet.2016.01.029.