

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)

И.Н. Леонова – д-р биол. наук (Россия)

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

Л.И. Афтanas – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
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)
М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. 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)
Н.Н. Дыгало – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
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)
А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. 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. Rogozin – канд. биол. наук (США)
А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)
К.Г. Скрябин – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
К.В. Славин – д-р наук, проф. (США)
В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, профессор (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)
Е.В. Березиков – канд. биол. наук, проф. (Нидерланды)
С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (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)
Ю.М. Константинов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
О. Кребс – д-р биол. наук, проф. (Германия)
И.Н. Лаврик – канд. хим. наук (Германия)
Д. Ларкин – д-р биол. наук (Великобритания)
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)
Е. Песцова – д-р биол. наук (Германия)
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)
М.Г. Самсонова – д-р биол. наук (Россия)
Е. Турусбеков – канд. биол. наук (Казахстан)
М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)
Ю. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 8 times annually

Founders

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

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

I.N. Leonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

Executive Secretary

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

Editorial council

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
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
N.N. Dygalo, Corr. 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
E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
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
A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
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
E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
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
V.A. Stepanov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), 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
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), Netherlands
S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China
V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.A. Dolgikh, Dr. Sci. (Biology), Russia
T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany
D. Larkin, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
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
E. Pestsova, Dr. Sci. (Biology), Germany
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
M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia
Y. Shavrukov, Dr. Sci. (Biology), Australia
E. Turuspekov, Cand. Sci. (Biology), Kazakhstan

633

ОТ РЕДАКТОРА

Генетика растений

634

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

SSR-анализ геномной ДНК перспективных сортов мягкой озимой пшеницы узбекистанской селекции
А.Т. Адылова, Ж.К. Норбеков, Э.Э. Хуршут,
Е.В. Никитина, Ф.Н. Кушанов

640

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

SSR-локусы, потенциально ассоциированные с высоким содержанием амилопектина в эндосперме зерна кукурузы
С.И. Вакула, О.А. Орловская, Л.В. Хотылева,
А.В. Кильчевский

648

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Анализ полиморфизма генома представителей синтетического вида $\times$ *Trititrigia cziczinii* Tsvet. методом AFLP
А.А. Трифонова, К.В. Борис, Л.В. Дедова,
В.А. Мельник, Л.П. Иванова, Н.П. Кузьмина,
С.В. Завгородний, В.П. Упелниек

654

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Оценка генетического разнообразия некоторых сибирских и дальневосточных видов рода *Spiraea* (Rosaceae) на основе разработанных мультиплексных панелей из ядерных микросателлитных локусов
Т.А. Полякова, А.В. Шатохина, Г.Н. Бондаренко,
Д.В. Политов

660

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Полиморфизм генов биосинтеза этилена и экспансина у местных и стародавних сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.) из коллекции генетических ресурсов растений ВИР
И.Н. Шамшин, А.В. Шлявас, А.А. Трифонова,
К.В. Борис, А.М. Кудрявцев

667

ОБЗОР

Тионины растений: строение, биологические функции и перспективы использования в биотехнологии
Т.И. Одинцова, М.П. Слезина, Е.А. Истомина

Селекция растений на иммунитет и продуктивность

676

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Создание линий озимой пшеницы с несколькими генами устойчивости к *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* для использования в селекционных программах России
И.Ф. Лапочкина, О.А. Баранова, Н.Р. Гайнуллин,
Г.В. Волкова, Е.В. Гладкова, Е.О. Ковалева,
А.В. Осипова

685

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Характеристика сортов озимой пшеницы по устойчивости к фузариозу зерна
Т.Ю. Гагкаева, А.С. Орина, О.П. Гаврилова,
И.Б. Аблова, Л.А. Беспалова

693

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Последовательности, гомологичные участкам гена *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*, у сортов картофеля, созданных методами традиционной селекции
О.Ю. Антонова, Н.С. Клименко, З.З. Евдокимова,
Л.И. Костина, Т.А. Гавриленко

703

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

ДНК-диагностика гена *RPV3*, определяющего устойчивость винограда к возбудителю милдью
Е.Т. Ильницкая, М.В. Макаркина, С.В. Токмаков,
Л.Г. Наумова

708

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние погодных-климатических условий на содержание белка и масла в семенах сои на Северном Кавказе
Л.Ю. Новикова, И.В. Сеферова, А.Ю. Некрасов,
И.Н. Перчук, Т.В. Шеленга, М.Г. Самсонова,
М.А. Вишнякова

Генетика человека

- 716 **ОБЗОР**
Современные представления
о генетике агрессивного поведения
*Ю.Д. Давыдова, С.С. Литвинов, Р.Ф. Еникеева,
С.Б. Малых, Э.К. Хуснутдинова*
- 726 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Анализ мутаций в генах
CDC27, STBP2, HYDIN и KMT5A
при каротидных параганглиомах
*Е.Н. Лукьянова, А.В. Снежкина, Д.В. Калинин,
А.В. Покровский, А.Л. Головюк, О.А. Степанов,
Е.А. Пудова, Г.С. Размахаяев, М.В. Орлова,
А.П. Поляков, М.В. Киселева, А.Д. Каприн,
А.В. Кудрявцева*

Генетика животных

- 734 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетическая изменчивость
бурятской и алтайской пород
крупного рогатого скота, оцененная
на основе анализа полиморфизма
генов *GH1, GHR* и *PRL*
*И.В. Лазебная, А.В. Перчун, Б.Б. Лхасаранов,
О.Е. Лазебный, Ю.А. Столповский*
- 742 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Оценка современного состояния
генофонда холмогорской
и черно-пестрой пород
крупного рогатого скота на основе
полногеномного SNP-анализа
*А.В. Доцев, А.А. Сермягин, А.В. Шахин, И.А. Паронян,
К.В. Племяшов, Х. Рейер, К. Виммерс, Г. Брем,
Н.А. Зиновьева*

633

ОТ РЕДАКТОРА

Plant genetics

634

ORIGINAL ARTICLE

SSR analysis of the genomic DNA of perspective Uzbek hexaploid winter wheat varieties

A.T. Adylova, G.K. Norbekov, E.E. Khurshut, E.V. Nikitina, F.N. Kushanov

640

ORIGINAL ARTICLE

SSR loci potentially associated with high amylopectine content in maize kernel endosperm

S.I. Vakula, O.A. Orlovskaya, L.V. Khotyleva, A.V. Kilchevsky

648

ORIGINAL ARTICLE

Genome polymorphism of the synthetic species $\times$ *Trititrigia cziczinii* Tsvet. inferred from AFLP analysis

A.A. Trifonova, K.V. Boris, L.V. Dedova, V.A. Melnik, L.P. Ivanova, N.P. Kuzmina, S.V. Zavgorodniy, V.P. Upelnik

654

ORIGINAL ARTICLE

Assessment of genetic diversity of some Siberian and Far Eastern species of the genus *Spiraea* (Rosaceae) by newly developed multiplex panels of nuclear SSR loci

T.A. Poliakova, A.V. Shatokhina, G.N. Bondarenko, D.V. Politov

660

ORIGINAL ARTICLE

Ethylene and expansin biosynthesis related genes polymorphism in local apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars from VIR Collection of plant genetic resources

I.N. Shamshin, A.V. Shlyavas, A.A. Trifonova, K.V. Boris, A.M. Kudryavtsev

667

REVIEW

Plant thionins: structure, biological functions and potential use in biotechnology

T.I. Odintsova, M.P. Slezina, E.A. Istomina

Plant breeding for immunity and performance

676

ORIGINAL ARTICLE

The development of winter wheat lines with several genes for resistance to *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* for use in breeding programs in Russia

I.F. Lapochkina, O.A. Baranova, N.R. Gainullin, G.V. Volkova, E.V. Gladkova, E.O. Kovaleva, A.V. Osipova

685

ORIGINAL ARTICLE

Characterization of resistance of winter wheat varieties to *Fusarium* head blight

T.Yu. Gagkaeva, A.S. Orina, O.P. Gavrilova, I.B. Ablova, L.A. Bespalova

693

ORIGINAL ARTICLE

Finding *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*-like sequences in conventionally bred potato varieties

O.Y. Antonova, N.S. Klimenko, Z.Z. Evdokimova, L.I. Kostina, T.A. Gavrilenko

703

ORIGINAL ARTICLE

DNA-marker based identification of the *RPV3* gene determining downy mildew resistance in grapevines

E.T. Il'nitskaya, M.V. Makarkina, S.V. Tokmakov, L.G. Naumova

708

ORIGINAL ARTICLE

Impact of weather and climate on seed protein and oil content of soybean in the North Caucasus

L.Yu. Novikova, I.V. Seferova, A.Yu. Nekrasov, I.N. Perchuk, T.V. Shelenga, M.G. Samsonova, M.A. Vishnyakova

Human genetics

- 716 **REVIEW**
Recent advances in genetics
of aggressive behavior
*J.D. Davydova, S.S. Litvinov, R.F. Enikeeva, S.B. Malykh,
E.K. Khusnutdinova*
- 726 **ORIGINAL ARTICLE**
Analysis of mutations in *CDC27*,
CTBP2, *HYDIN* and *KMT5A* genes
in carotid paragangliomas
*E.N. Lukyanova, A.V. Snezhkina, D.V. Kalinin,
A.V. Pokrovsky, A.L. Golovyuk, O.A. Stepanov,
E.A. Pudova, G.S. Razmakhaev, M.V. Orlova,
A.P. Polyakov, M.V. Kiseleva, A.D. Kaprin,
A.V. Kudryavtseva*

Animal genetics

- 734 **ORIGINAL ARTICLE**
Analysis of *GH1*, *GHR* and *PRL*
gene polymorphisms for estimation
of the genetic diversity of Buryat
and Altai cattle breeds
*I.V. Lazebnaya, A.V. Perchun, B.B. Lhasaranov,
O.E. Lazebny, Yu.A. Stolpovskiy*
- 742 **ORIGINAL ARTICLE**
Evaluation of current gene pool
of Kholmogor and Black-and-white
cattle breeds based on whole genome
SNP analysis
*A.V. Dotsev, A.A. Sermyagin, A.V. Shakhin, I.A. Paronyan,
K.V. Plemyashov, H. Reyer, K. Wimmers, G. Brem,
N.A. Zinovieva*

Уважаемые коллеги, дорогие читатели! Предлагаем Вашему вниманию очередной выпуск «Вавиловского журнала генетики и селекции».

В традиционный раздел «Генетика растений» вошли пять оригинальных исследований и одна обзорная статья, в которой обсуждаются тионины растений, входящие в семейство антимикробных пептидов и являющиеся одним из важнейших компонентов защитной системы растений. Три экспериментальные статьи посвящены применению в генетических и селекционных исследованиях у растений SSR-маркеров, разработанных к микросателлитным локусам. По результатам изучения сортов мягкой пшеницы узбекистанской селекции с помощью SSR-праймеров были разработаны генетические формулы, которые могут использоваться в селекционных программах для подбора родительских пар. В задачи другого исследования входила оценка эффективности микросателлитных маркеров для идентификации образцов кукурузы, характеризующихся восковидной структурой эндосперма. Уникальные сочетания аллелей микросателлитных локусов оптимальны для маркер-ассоциированного отбора образцов кукурузы с высоким накоплением амилопектина. Для оценки генетической структуры и изменчивости растений близкородственных видов *Spiraea* ssp. из природных популяций Дальнего Востока и Сибири разработаны мультиплексные панели к нескольким микросателлитным локусам. Показано, что генетическая дифференциация, основанная на частотах аллелей SSR-локусов, соответствует географическому положению образцов. Метод маркирования с помощью маркеров другого типа – AFLP – был использован для изучения генетического разнообразия синтетического вида *Triticigria cziczinii*, полученного в результате гибридизации различных видов пшеницы и пырея. В последней экспериментальной статье данного раздела проанализировано аллельное разнообразие генов биосинтеза этилена и экспансина, вовлеченных в контроль лежкости плодов у местных и стародавних сортов яблони из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). С помощью молекулярных маркеров различного типа в местных и стародавних сортах выявлены редкие аллели данных генов, что может быть полезно при оценке селекционного потенциала сортов яблони.

Рубрика «Селекция растений на иммунитет и продуктивность» состоит из пяти экспери-

ментальных работ, в которых представлены результаты создания и изучения культурных растений с помощью классических методов селекции и с привлечением современных биотехнологических подходов. Так, в одной из работ рассмотрены полученные устойчивые линии озимой пшеницы, содержащие несколько генов устойчивости к стеблевой ржавчине и комплекс хозяйственно ценных признаков. В другом исследовании проведен молекулярный скрининг коллекции сортов картофеля отечественной и зарубежной селекции ген-специфическими маркерами, ассоциированными с устойчивостью к фитофторозу и мужской стерильностью. Методы молекулярного маркирования были использованы для идентификации в коллекции сортов винограда гена устойчивости к милдью – наиболее вредоносному грибному заболеванию этой культуры. Полученные результаты соотнесены с уровнем устойчивости сортов винограда и с их родословной. С помощью биоинформатических подходов проведен анализ результатов более чем тридцатилетней оценки содержания белка и масла в образцах сои из коллекции ВИР. Методом регрессионного анализа построены модели зависимости содержания параметров белка и масла от погодно-климатических условий на Северном Кавказе.

Следующий раздел «Генетика человека» включает две публикации. В обзорной статье рассматриваются генетические механизмы нормального и агрессивного (патологического) поведения человека. Экспериментальные данные, основанные на полногеномном анализе ассоциаций, позволили выявить гены-кандидаты развития агрессивного поведения, среди которых наиболее вероятными являются гены серотонинергической и дофаминергической систем, а также гены ферментов их метаболизма. Во второй статье представлены результаты изучения молекулярного патогенеза и анализ генов-кандидатов развития каратиноидной параганглиомы.

Последняя рубрика журнала содержит две оригинальные работы в области генетики животных, посвященные изучению широко распространенных и уникальных пород крупного рогатого скота отечественного происхождения. Эксперименты выполнены с использованием современных методов молекулярного маркирования и ассоциативного картирования. В одной из работ на основе анализа целевых генов гормона роста, его рецептора и пролактина выявлены особенности внутривидовой изменчивости российского аборигенного алтайского крупного рогатого скота и представителей бурятской породы. В другой на основе анализа SNP-профилей установлены генетические различия между популяциями холмогорского и черно-пестрого скота с разной степенью кровности по голштинской породе.

Обращаем внимание наших читателей, что оригинальные статьи по истории генетики, анонсы и итоги конференций, обзорные и дискуссионные статьи можно опубликовать в электронном издании «Письма в Вавиловский журнал» (<http://pismavavilov.ru/>). Рукописи принимаются по электронной почте: vavilov_journal@bionet.nsc.ru. Всем статьям присваивается индекс DOI.

SSR analysis of the genomic DNA of perspective Uzbek hexaploid winter wheat varieties

A.T. Adylova, G.K. Norbekov, E.E. Khurshut, E.V. Nikitina, F.N. Kushanov

Center of Genomics and Bioinformatics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

The objective of this study was to investigate the genetic diversity of hexaploid wheat varieties of Uzbekistan breeding using simple sequence repeat (SSR) markers. These varieties are adapted to local conditions, and can be considered as the most important supplier of genetic resources for cultivation in Uzbekistan and other countries. Microsatellite markers are now most widely used and effective classes of DNA markers for genotyping, certification and classification of plant varieties. In this paper, genotyping results of 32 hexaploid wheat domestic varieties using 144 microsatellite primer pairs are presented. Microsatellite primer pairs were chosen from literature data and 36 primer pairs (from 144) gave polymorphic well-reproducible PCR-fragments. The individual SSR spectra differing in number of amplicons were obtained for each variety. A total number of 141 alleles for 36 microsatellite loci were detected. The number of alleles per locus ranged from 2 to 6, the mean number of alleles per locus (N_a) was 3 alleles. For the studied genotypes group the effective number of alleles (ne) characterizing the loci by the allele frequency, varied from 1.7 to 4.8, the mean number of alleles per locus was 2.8. The expected heterozygosity (H_e) ranged from 0 to 0.792, averaging 0.626, in studied wheat population. The amplified fragment sizes ranged from 93 to 552 bp. The polymorphic index content (PIC) ranged from 0 to 0.758. A dendrogram was constructed using the alleles set of microsatellite loci, reflecting the phylogenetic differences of the studied hexaploid wheat varieties. It showed that Uzbekistan breeding varieties are divided into two main clusters, which may be evidence of their common origin. A genetic formula has been developed for each Uzbek wheat variety. It can be used for identification, certification of these varieties, as well as for the selection of parental pairs in the wheat breeding programs.

Key words: hexaploid winter wheat; PCR analysis; genetic diversity; microsatellite DNA loci; clusterization; barcoding.

SSR-анализ геномной ДНК перспективных сортов мягкой озимой пшеницы узбекистанской селекции

А.Т. Адылова, Ж.К. Норбеков, Э.Э. Хуршут,
Е.В. Никитина, Ф.Н. Кушанов

Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан

Целью работы было изучение генетического разнообразия сортов мягкой пшеницы узбекистанской селекции, так как они являются источником адаптированного к местным условиям обитания растительного материала и могут служить важнейшим поставщиком генетических ресурсов для селекционных работ по пшенице не только в Узбекистане, но и в других странах. В настоящее время микросателлитные маркеры (simple sequence repeats, SSR – простые повторяющиеся последовательности) – одни из наиболее широко используемых и эффективных классов ДНК-маркеров для генотипирования, паспортизации и классификации сортов растений. В работе представлены результаты генотипирования 32 сортов мягкой пшеницы отечественной селекции с использованием 144 микросателлитных праймерных пар, выбранных исходя из литературных данных, 36 пар из них дали полиморфные хорошо воспроизводимые ПЦР-фрагменты. Для каждого сорта были получены индивидуальные SSR-спектры, различающиеся числом ампликонов. По 36 микросателлитным локусам выявлен 141 аллель, их число на локус (N_a) составляло от 2 до 6 (3 в среднем). Для изученной группы генотипов эффективное число аллелей (ne), характеризующее локусы по частоте встречаемости аллелей, варьировало от 1.7 до 4.8, составляя в среднем 2.8. Величина ожидаемой гетерозиготности (H_e) в нашей популяции пшеницы была в среднем 0.626, меняясь от 0 до 0.792. Размеры амплифицированных продуктов находились в пределах от 93 до 552 п. н. Индекс полиморфного информационного содержания (PIC) варьировал от 0 до 0.758. На основании набора аллелей микросателлитных локусов была построена дендрограмма, отражающая филогенетические различия изученных сортов мягкой пшеницы, которая показала, что сорта узбекистанской селекции разделяются на два больших кластера, это свидетельствует о возможной общности их происхождения. Для каждого сорта пшеницы Узбекистана разработана генетическая формула, которая может быть использована для идентификации, паспортизации этих сортов, а также при подборе родительских пар в селекционных программах по пшенице.

Ключевые слова: мягкая озимая пшеница; ПЦР-анализ; генетическое разнообразие; микросателлитные локусы ДНК; кластеризация; паспортизация.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Adylova A.T., Norbekov G.K., Khurshut E.E., Nikitina E.V., Kushanov F.N. SSR analysis of the genomic DNA of perspective Uzbek hexaploid winter wheat varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):634-639. DOI 10.18699/VJ18.404

Received 26.03.2018
Accepted for publication 08.07.2018
© AUTHORS, 2018

Introduction of DNA markers into biological research opened new opportunities for studying genetic diversity of organisms (Gostimsky et al., 2005). In particular, SSR or microsatellite genome analysis of multiple plants showed that the microsatellite loci represented by multiple alleles and characterized by relatively high heterogeneity are a convenient tool for analyzing genomic DNA polymorphism.

Microsatellite locus polymorphism analysis makes it possible to obtain reproducible, informative profiles of known genome fragments and is therefore the most promising in terms of identification and certification of varieties and hybrids of cultivated plants (Sulimova, 2004).

Applicability of a marker for the stated purpose depends on the number of alleles the marker includes and their respective relative frequencies. Typically, the degree of polymorphism is quantitatively measured by two values or parameters, namely heterozygosity (H), for which unbiased evaluation algorithm and variation formula are well-known (Nei, Roychoudhury, 1974; Nei, Li, 1979), and polymorphism index content (PIC).

Heterozygosity is considered as an average portion of loci with two different alleles within one locus in an individual specimen. This parameter is generalized over the whole population or its part and is divided into observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity. To describe genetic diversity, expected heterozygosity is usually determined, since it is less sensitive to sample size, than the observed heterozygosity (Chesnokov, Artemyeva, 2015).

PIC is determined by the marker's ability to identify population polymorphism depending on the number of detectable alleles and their frequency distributions and therefore equivalent to genetic diversity. Maximum PIC for dominant markers is 0.5. The PIC value approaches one, if locus includes multiple alleles with approximately equal occurrence rates, and equals 0, if locus is monomorphic (Chesnokov, Artemyeva, 2015). Effective number of alleles (ne) is another parameter used to evaluate genetic diversity and is linked to heterozygosity by a simple relationship $ne = 1 / (1 - H_e)$, i.e. it is an inverse value to the percentage of homozygous loci in a specimen. It stands for the number of alleles encountered in the population with equal frequencies and ensuring the predetermined heterozygosity under random crossing (Ayala, Kiger, 1984).

The goal of the present paper is to investigate genetic structure of Uzbek hexaploid winter wheat using the aforementioned measures of genetic diversity. This problem makes for a topical research, since these varieties are a source of plant material adapted to local habitat and can be considered the most important supplier of genetic resources for wheat cultivation not only in Uzbekistan, but in other countries as well.

Materials and methods

The following 32 domestically cultivated soft wheat varieties were used in the study: Turkiston; Kelajak; Barhayot; Chillaki; Pahlavon; Farovon; Hazrati Bashir; Bardosh; Bobur; Omad; Gozgon; Matonat; Sanzar 8;

Elomon; Boysuntura; Andijon 2; Andijon 4; Dostlik; Yaksart; Muftalo; Asr; Durdona; Taraqqiyot; Kokbuloq; Bunyodkor; Hisorak; Jayhun; Uzbek; Oqmarvarid; Ifthor; Ustoz; Andijon 1; most of them included in the register of agricultural crops of Uzbekistan.

DNA isolation, amplification, electrophoresis, and visualization of amplification products were performed using standard techniques (Dellaporta et al., 1983). The study covered 51 microsatellite primer pairs (from Grain Genes Database, <http://wheat.pw.usda.gov>), which included 18 from WMC group (Röder et al., 1998), 12 from BARC group (Song et al., 2002), 10 from WMS group (Röder et al., 1998), 4 from CFD group (Guyomarc'h et al., 2002), 3 from GPW group (Sourdille et al., 2010), 2 from CFA group (Sourdille et al., 2010), and one pair from PSP (Devos et al., 1995) and GDM (Zhao et al., 2006) collections. Microsatellite locus alleles were identified and their sizes determined using Gel-Pro Analyzer 3.1 software. PIC value for each marker was calculated by the native script in R language (R Core Team, 2016), which the authors successfully used earlier (Khurshut et al., 2017). To perform statistical processing of the results and plot the diagrams required, R environment was used (R Core Team, 2016).

Results and discussion

DNA of 32 domestically cultivated soft wheat genotypes were probed using 144 microsatellite primer pairs selected by the authors as expectedly informative markers based on the analysis of the foreign literature, as well as earlier studies into germplasm genotyping of domestically cultivated hexaploid wheat. However in 144 microsatellite primer pairs selected, only 51 pairs were amplifiable.

As a result of SSR analysis of 32 wheat genotypes, specific and well-reproducible DNA fragments were obtained. Individual SSR spectra were identified for each variety with different amplicon numbers and sizes, as well as degree of manifestation in electrophoregrams (Fig. 1).

The following loci of small information value with $PIC < 0.3$ were excluded from further research based on screening results: BARC6, BARC96, BARC139, BARC159, BARC206, CFA2149, CFA2209, GPW3032, WMC177, WMC311, WMC356, WMC367, WMC727, WMS539, WMS577. Interestingly, the CFD239 primer pair provided a single PCR product for DNA of the studied soft wheat samples, which was manifested in zero PIC value (Table 1). However it was detected in 28 out of 32 wheat varieties, and this primer pair was preserved for further research. Thus, the set of loci was narrowed down to 36.

As a result of investigating 36 microsatellite loci, 141 alleles were identified. Their number per locus varied from 2 to 6, which produced an average of 3 alleles per locus. Maximum number of alleles, i.e. six, was identified in WMC526, CFD76, GDM33, and WMC104 loci. Five alleles were identified in eight loci, namely WMS349, PSP3000, WMC453, GPW2203, GPW2181, BARC74, WMS443, and WMS295, four alleles were identified in WMC626, WMC276, WMC445, WMC216, WMS513, WMC273, WMS291, and WMC432, and two-three alleles

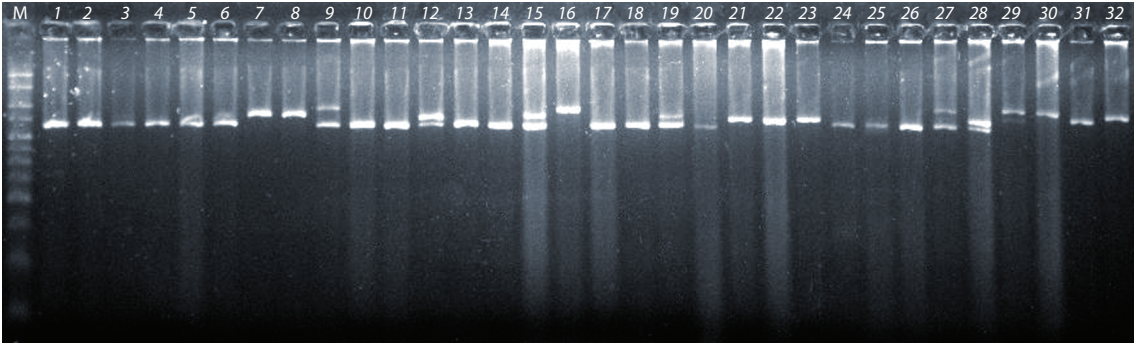


Fig. 1. Electrophoregram of the genomic DNA amplification products from Uzbek hexaploid wheat with primer PSP3000. DNA M-marker; 1-32 indicate DNA samples. (see Materials and methods).

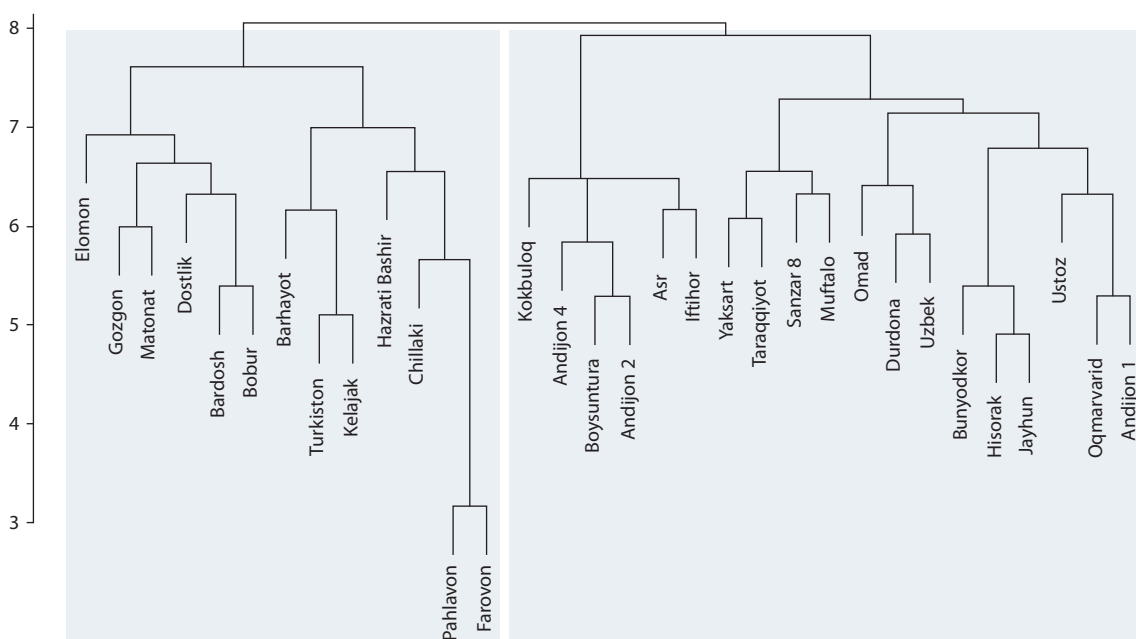
Table 1. Characterization of microsatellite DNA loci

No.	Locus	N_a	PIC	H_e	Amplicon size (bp)	Effective number of alleles	References
1	WMS349	5	0.758	0.792	131–152	4.8	Röder et al., 1998
2	WMC526	6	0.720	0.762	169–513	4.2	Somers et al., 2004
3	PSP3000	5	0.713	0.750	233–301	4.0	Devos et al.,1995
4	CFD76	6	0.694	0.737	155–260	3.8	Guyomarc'h et al., 2002
5	WMC626	4	0.681	0.732	212–271	3.7	Somers et al., 2004
6	WMC276	4	0.677	0.725	318–349	3.6	»
7	WMC445	4	0.666	0.717	251–283	3.5	»
8	GDM33	6	0.663	0.716	135–266	3.5	Zhao et al., 2006
9	WMC453	5	0.661	0.708	176–230	3.4	Somers et al., 2004
10	GPW2203	5	0.661	0.715	185–332	3.5	Sourdille et al., 2004
11	GPW2181	5	0.655	0.710	146–310	3.4	»
12	WMC216	4	0.639	0.695	93–146	3.2	Somers et al., 2004
13	BARC74	5	0.628	0.674	105–133	3.6	Lowe et al., 2011
14	WMC104	6	0.613	0.676	160–430	3.1	Somers et al., 2004
15	WMS513	4	0.605	0.668	127–164	3.0	Röder et al., 1998
16	WMC273	4	0.596	0.651	190–278	2.8	Somers et al., 2004
17	CFD23	3	0.585	0.659	253–283	2.9	Guyomarc'h et al., 2002
18	WMS630	3	0.581	0.655	173–203	2.8	Röder et al., 1998
19	WMS291	4	0.576	0.645	116–192	2.8	»
20	WMC198	3	0.576	0.651	210–283	2.8	Somers et al., 2004
21	WMC367	3	0.572	0.645	159–194	2.8	»
22	WMS495	3	0.567	0.641	134–166	2.7	Röder et al., 1998
23	BARC182	3	0.565	0.642	106–134	2.7	Somers et al., 2004
24	WMS512	3	0.562	0.639	195–204	2.7	Röder et al., 1998
25	WMC166	3	0.515	0.586	353–402	2.4	Somers et al., 2004
26	CFD267	3	0.504	0.589	263–313	2.4	Guyomarc'h et al., 2002
27	WMS443	5	0.499	0.580	127–237	2.3	Röder et al., 1998
28	BARC176	3	0.489	0.562	231–296	2.2	Somers et al., 2004
29	BARC175	3	0.477	0.569	224–246	2.3	»
30	WMC167	3	0.472	0.560	204–222	2.2	»
31	WMS295	5	0.467	0.550	232–552	2.2	Röder et al., 1998
32	BARC80	3	0.460	0.542	112–130	2.1	Somers et al., 2004
33	WMC432	4	0.456	0.498	197–257	1.9	»
34	BARC187	3	0.378	0.428	273–308	1.7	Lowe et al., 2011
35	BARC96	2	0.357	0.465	184–202	1.8	Song et al., 2002
36	CFD239	1	0.000	0.000	249	0.0	Guyomarc'h et al., 2002
Average		3	0.564	0.626		2.8	

Table 2. Genotype formulas of hexaploid winter wheat of Uzbekistan breeding

Variety	Formula
Hazrati Bashir	A ₅ B ₁ B ₂ B ₃ B ₆ C ₄ D ₃ D ₆ E ₁ F ₄ G ₁ H ₁ H ₂ H ₄ I ₃ I ₄ J ₁ J ₄ K ₁ K ₂ K ₄ L ₂ L ₄ M ₃ M ₄ N ₁ N ₂ O ₃ P ₂ P ₃
Andijon 1	A ₁ B ₁ B ₂ B ₃ B ₆ C ₃ D ₂ D ₅ E ₃ F ₃ G ₂ H ₁ H ₂ I ₁ I ₂ I ₃ J ₂ K ₁ K ₂ K ₄ L ₂ L ₄ M ₂ N ₁ N ₂ O ₃ P ₁ P ₂ P ₄
Dostlik	A ₂ B ₁ B ₂ B ₃ B ₆ C ₁ D ₃ D ₆ E ₄ F ₂ G ₄ H ₁ H ₂ H ₄ I ₂ I ₃ J ₁ J ₃ K ₁ K ₂ K ₃ L ₂ L ₄ M ₂ N ₁ N ₂ N ₃ N ₅ N ₆ O ₃ O ₄ P ₁ P ₂ P ₄
Bobur	A ₅ B ₁ B ₂ B ₃ C ₁ C ₅ D ₃ D ₆ E ₁ F ₃ H ₁ H ₂ H ₄ H ₆ J ₁ J ₃ J ₄ K ₁ K ₂ K ₄ L ₂ L ₄ M ₂ N ₁ N ₂ N ₅ O ₄ P ₁ P ₂

Note. Locus codes are as follows: A – WMS349; B – WMC526; C – PSP3000; D – CFD76; E – WMC626; F – WMC276; G – WMC445; H – GDM33; I – WMC453; J – GPW2203; K – GPW2181; L – WMC216; M – BARC74; N – WMC104; O – WMS513; P – WMC273. The Latin letters indicate primers; while subscripts define locus allele states they mark.

**Fig. 2.** Phylogenetic tree of the studied wheat varieties of Uzbekistan breeding based on 36 SSR markers.

were identified in the remaining loci (apart from CFD239) (Table 2).

Effective number of alleles is a parameter that characterizes loci in terms of allele frequencies, and it varied in the studied group of genotypes from 1.7 (BARC187) to 4.8 (WMS349), which produced an average of 2.8 alleles per locus. Average expected heterozygosity in the wheat population considered was 0.626, as the value varied from 0 (CFD239) to 0.792 (WMS349). Amplified product sizes ranged from 93 to 552 bp. To analyze the microsatellite DNA amplification data, PIC was used, which varied from 0 (for CFD239 marker) to 0.758 (WMS349), which produced an average of 0.564 (see Table 1).

The set of microsatellite locus alleles was used to plot a dendrogram reflecting phylogenetic links between the studied soft wheat varieties. Complete link hierarchical clustering divided these varieties into two main clusters (Fig. 2), while distribution and composition of tree-like clustering mostly matched the results of k-means technique (Fig. 3).

Uzbek wheat varieties, apart from several local varieties, i.e. Pahlavon and Farovon (cultivated based on the local Marjon variety), and the traditional Boysuntura and Oqmarvarid varieties, represent genotypes obtained from various global collections and adapted to local cultivation conditions. Varieties from the first cluster, namely Elomon, Gozgon, Matonat, Dostlik, Bardosh, Barhayot, Turkiston, and Kelajak, were cultivated at Kashkadarya Research Institute of Grain Breeding and Seed Production (Uzbekistan) based on samples from CIMMYT collection (International Maize and Wheat Improvement Center), drought resistance being a prevalent breeding trait.

Varieties from the second cluster, apart from the Oqmarvarid variety, were cultivated at Research Institute of Cereal and Grain Legume Crops (Andijan, Uzbekistan) in association with Krasnodar Agricultural Research Institute named after P.P. Lukyanenko. Right subgroup of the cluster included varieties selected based on crop yield (Yaksart, Taraqqiyot, Sanzar 8, Muftalo, Omad, Durdona, Uzbek, Bunyodkor, Hisorak, Jayhun, Ustoz и Andijon 1),

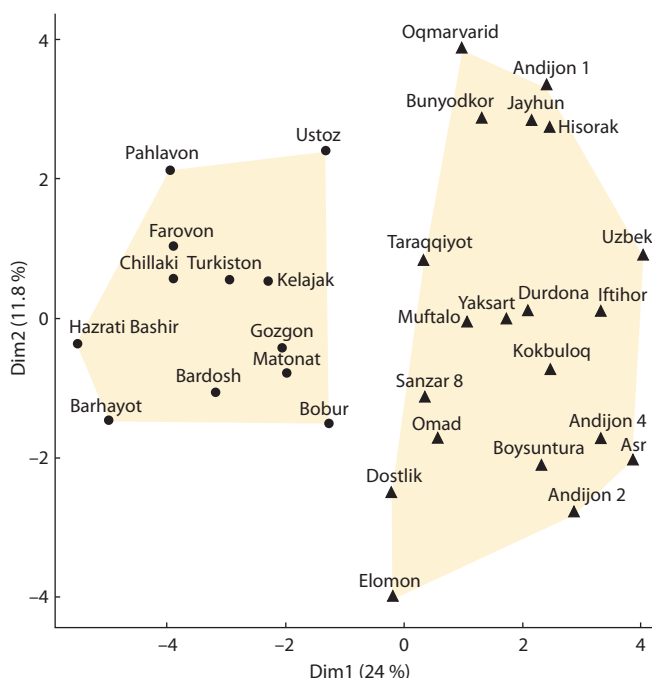


Fig. 3. k-means clustering method in studied wheat varieties of Uzbekistan breeding based on 36 SSR markers.

whereas the left one included varieties (Kokbulok, Andijon 4, Boysuntura, Andijon 2, Asr и Iftihor) released in Gallaorol Region (Uzbekistan) and suited for dryland farming (see Fig. 2).

The *PIC* values obtained as a result of genotyping turn out to be sufficient for identification and certification of varieties. A fragment of molecular passport developed for promising domestically cultivated winter soft wheat varieties based on 16 most effective and informative SSR markers with $PIC \geq 0.6$ is presented in Table 2.

The Hazrati Bashir and Andijon 1 varieties were picked as examples of genotypes at a maximum distance from each other in a multidimensional space, while the other two varieties, i.e. Bobur and Dostlik, are, on the contrary, genetically close (see Fig. 2 and 3).

It can be seen from Table 2 that certain sets of alleles, in particular, $B_1B_2B_3$, H_1H_2 , L_2L_4 , and N_1N_2 amplified by WMC526, GDM33, WMC216, and WMC104 primer pairs respectively, are detected in all four genotypes, notwithstanding the cluster they are grouped in. Since these loci are detected in most of the remaining varieties under study, they may seemingly be considered species-specific. On the other hand, there also are varieties, such as Bobur that do not include any alleles of WMC445 and WMC453 loci, which could possibly be a peculiarity of these genotypes.

Thus, we have performed screening and evaluation of genetic variety in 32 Uzbek winter soft wheat using 36 microsatellite SSR markers. These studies revealed the presence of a certain genetic variability both in terms of number of alleles per locus and genetic variety index. It was also shown

that the studied varieties are clustered in accordance with their environmental, geographic, and cultivation origin.

SSR profiles made it possible to derive a genetic formula for each Uzbek wheat variety, which may be used for identification and certification of these varieties, as well as for selecting parent pairs within wheat cultivation programs.

Acknowledgements

The work was carried out within the framework of Project T.8-16 “Comparative study of DNA polymorphism of various hexaploid wheat varieties of Uzbekistan breeding using microsatellite SSR markers”, supported by the Foundation for Fundamental Research Support of the Academy of Sciences of Uzbekistan.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ayala F., Kiger J. Modern Genetics. Menlo Park, Calif.: Benjamin/Cummings Publ. Co., 1984.
- Chesnokov Yu.V., Artemyeva A.M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2015;50(5):571-578. (in Russian)
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983;1(4):19-21.
- Devos K.M., Bryan G.J., Collins A.J., Stephenson P., Gale M.D. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995;90:247-252.
- Gostimsky S.A., Kokaeva Z.G., Konovalov F.A. Studying plant genome variation using molecular markers. *Russian Journal of Genetics*. 2005;41(4):378-388. DOI 10.1007/s11177-005-0101-1.
- Guymarc’h H.I., Sourdille P., Charmet G., Edwards J., Bernard M. Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2002;104(6-7):1164-1172.
- Khurshut E.E., Adilova A.T., Norbekov J.K., Kushanov F.N., Turaqulov Kh.S. Molecular analysis of winter wheat varieties in Uzbekistan. *Uzb. Biol. J.* 2017;(3):44-48.
- Lowe I., Jankuloski L., Chao S., Chen X., See D., Dubcovsky J. Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broadly virulent post-2000 North American races of stripe rust in hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123:143-157.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76:5269-5273. DOI 10.1073/pnas.76.10.5269.
- Nei M., Roychoudhury A.K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*. 1974;76:379-390.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2016. Available at <https://www.R-project.org>.
- Röder M.S., Korzun V., Wandehake K., Planschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*. 1998; 149:2007-2023.
- Somers D.J., Peter I., Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:1105-1114.
- Song Q.J., Fickus E.W., Cregan P.B. Characteristics of trinucleotide markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2002;104:286-293.
- Sourdille P., Gandon B., Chiquet V., Nicot N., Somers D., Murgueux A., Bernard M. Wheat génoplatte SSR mapping data

- release: a new set of markers and comprehensive genetic and physical mapping data. 2004. Available at: <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical>. Accessed on March 10, 2010.
- Sulimova G.E. DNA markers in genetic studies: types of markers, their properties, and applications. *Uspekhi Sovremennoy Biologii* = *Advances in Current Biology*. 2004;124(3):260-271. (in Russian)
- Zhao H.X., Liu X.M., Chen M.-S. H22, a major resistance gene to the Hessian fly (*Mayetiola destructor*), is mapped to the distal region of wheat chromosome 1DS. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113:1491-1496.

SSR-локусы, потенциально ассоциированные с высоким содержанием амилопектина в эндосперме зерна кукурузы

С.И. Вакула¹✉, О.А. Орловская¹, Л.В. Хотылева¹, А.В. Кильчевский²

¹ Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Национальная академия наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Зерно кукурузы (*Zea mays* L.) – наиболее широко используемый в мире источник натурального крахмала, что обусловлено как возможностью получения крахмала с различным соотношением амилоза/амилопектин, так и высокой продуктивностью культуры. В качестве компонента функционального питания перспективна кукуруза с «нетрадиционным» составом зерна (восковидная, маслянистая, сахарная, opak и другие фенотипические варианты). К формированию восковидного эндосперма с высоким содержанием амилопектина приводят мутации гена *waxy*, нарушающие структуру и функцию фермента биосинтеза амилозы. Рецессивная природа мутаций гена *waxy* не позволяет проводить фенотипический отбор гетерозиготных носителей в гибридной популяции. Высокая частота и гетерогенная природа мутаций, нарушающих биосинтез амилозы, затрудняют однозначную идентификацию молекулярной природы возникших генетических изменений. Известно, что внутри нетранслируемых участков гена *waxy* присутствуют микросателлитные повторы. Задача настоящего исследования – оценить эффективность использования микросателлитных последовательностей локуса *waxy* для идентификации и маркирования генотипов восковидной кукурузы. Для ее решения было проанализировано содержание крахмала, короткоцепочечных растворимых углеводов, амилозы, амилопектина в зерне 33 образцов кукурузы. Идентифицированы группы образцов со сходным углеводным составом эндосперма, в том числе 13 высокоамилопектиновых образцов, носителей мутаций гена *waxy* (*wx*), и 20 образцов с фенотипической нормой признака (*Wx*). Молекулярно-генетический скрининг образцов коллекции включал анализ полиморфизма микросателлитных локусов *phi022*, *phi027*, *phi061*, ассоциированных с последовательностью гена *waxy*. Аллельный состав отдельных локусов и их сочетаний соотнесен с накоплением запасных углеводов в эндосперме зерна. Дифференцировать группы образцов кукурузы с диким *Wx* и мутантным фенотипом *wx* позволил только анализ сочетания аллелей локусов *phi022* и *phi027* либо комплекса всех трех маркеров. Таким образом, для маркер-ассоциированного отбора образцов кукурузы с высоким накоплением амилопектина в эндосперме могут представлять интерес не отдельные аллели локусов *phi022*, *phi027*, *phi061*, а их уникальные сочетания.

Ключевые слова: кукуруза; запасные углеводы; крахмал; амилопектин; амилоза; ген *waxy*; микросателлитные маркеры.

SSR loci potentially associated with high amylopectine content in maize kernel endosperm

S.I. Vakula¹✉, O.A. Orlovskaya¹, L.V. Khotyleva¹, A.V. Kilchevsky²

¹ Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus

² The National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

As a component of functional nutrition, maize cultivars with “non-traditional” kernel composition (waxy, oil-bearing, sugar, opaque, etc. phenotypic variants) are promising. Mutations in the *waxy* gene, which break down the structure and function of the enzyme for amylose biosynthesis, lead to a waxy (with a high content of amylopectin) endosperm formation. High variability of the *waxy* gene limits the use of microsatellite loci in marker associated selection of waxy maize genotypes. The increased frequency of gene rearrangements within the *waxy* locus facilitated the origination of many high-amylopectin corn lines carrying different SSR allelic variants. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of using *waxy* locus microsatellite sequences for identification and labeling of waxy maize genotypes. To this end, a complex of biochemical (calorimetry, bichromate method), molecular-genetic (SSR-PCR, capillary gel electrophoresis with fluorescent detection of fragments) and statistical (descriptive statistics, cluster analysis, χ^2) analysis methods was used. Plant material used were 33 samples of corn kernels including mutant forms with a high content of amylose, amylopectin, short-chain starches, were kindly provided by VIR genetic collection (Russian Federation) and Maize Genetics Cooperation Stock Center (USA). The contents of starch, short-chain soluble carbohydrates, amylose, amylopectin in the grain of 33 maize samples were evaluated. Compositionally similar (to endosperm carbohydrates content) groups of samples were identified. They include 13 high-amylopectin samples carriers of *waxy* (*wx*) gene mutations and 20 samples with wild-type character (*Wx*). Molecular genetic screening of the collection included an analysis of the polymorphism of the microsatellite loci *phi022*, *phi027*, *phi061* associated with the *waxy* gene sequence. Allelic composition of individual loci and their combinations were analyzed in relation to the accumulation of reserve carbohydrates in the kernel endosperm. Only the analysis of the *phi022/phi027* combination or all three

markers in the complex allows differentiating the wild *Wx* and mutant *wx* phenotypes of maize. It was shown that not the individual allelic polymorphisms of the *phi022*, *phi027*, *phi061* loci are efficient for the marker-associated selection of high-amylopectin maize, but their unique combinations.

Key words: maize; reserve carbohydrates; starch; amylopectin; amylose; *waxy* gene; microsatellite markers.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Вакула С.И., Орловская О.А., Хотылева Л.В., Кильчевский А.В. SSR-локусы, потенциально ассоциированные с высоким содержанием амилопектина в эндосперме зерна кукурузы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):640-647. DOI 10.18699/VJ18.405

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Vakula S.I., Orlovskaya O.A., Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V. SSR loci potentially associated with high amylopectine content in maize kernel endosperm. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):640-647. DOI 10.18699/VJ18.405 (in Russian)

Крахмал является одним из основных компонентов рациона человека и кормов сельскохозяйственных животных (Pan, 2000). Важный источник пищевого крахмала – зерно кукурузы (*Zea mays* L.), что обусловлено высокими мировыми сборами культуры (<http://apps.fao.org>) и широким генетическим разнообразием процессов биосинтеза углеводов в эндосперме (Wilson et al., 2004).

В состав природного крахмала входят две структурные фракции: линейная амилоза (α -(1→4)-глюкан) и разветвленный амилопектин (α -(1→4; 1→6) глюкан) (Tan et al., 2009). Соотношение амилозы и амилопектина определяет химические свойства и востребованность вариантов крахмала для различных отраслей промышленности. В среднем крахмал кукурузы содержит 15–25 % амилозы и 75–86 % амилопектина. Высокоамилозный крахмал, получаемый из мутантных по гену *amylose extender* кукурузных зерен, устойчив к воздействию пищеварительных ферментов и служит перспективным источником диетических волокон (Nugent, 2005). Особая структура эндосперма, высокая пищевая ценность, низкие температуры желатинизации и клейстеризации запасного крахмала способствовали росту спроса на восковидную кукурузу (Lambert, 2001; Jobling, 2004). «Восковидный эндосperm» зерна кукурузы – моногенный признак, обусловленный рецессивной мутацией гена *waxy* (*wxwx*), кодирующего фермент гранул-связующую гликозил-трансферазу (ГСГТ) (Alexander, Creech, 1977; Li, 2003). Лocus *Wx* экспрессируется в эндосперме развивающихся зерен и пыльцевом зерне. Мутации, нарушающие функции ГСГТ, резко подавляют синтез амилозы и способствуют увеличению содержания амилопектина в крахмале до 99 %.

Помимо высокой хозяйственной ценности, растения, мутантные по локусу *wx*, – прекрасная модельная система для изучения механизмов генетической изменчивости, в частности перемещения мобильных элементов, генетического дрейфа, молекулярной эволюции и стабильности генома. Последовательность дикого варианта гена *waxy* расшифрована (Klosgen et al., 1986). Недавно опубликованы результаты секвенирования локуса у ряда местных сортов и культурных линий кукурузы (Tian et al., 2008; Fan et al., 2009; Bao et al., 2012). Последовательность гена (3718 п. н.) представлена 13 интронами (81–139 п. н.) и 14 экзонами (64–392 п. н.), размер транскрибируемого белка составляет 605 аминокислотных остатков (Klosgen et al., 1986). На молекулярном уровне описано более 50 мута-

ций *waxy* (Huang et al., 2010). Структурный анализ этих аллелей показал, что в возникновении спонтанных мутаций локуса большую роль играют инсерции и делеции, вызванные перемещениями мобильных элементов генома (Wessler, Vagaron, 1985).

Рецессивная природа мутации гена *waxy* не позволяет проводить фенотипический отбор гетерозиготных носителей в гибридной популяции. Высокая частота и гетерогенная природа мутаций, нарушающих биосинтез амилозы, затрудняет однозначную идентификацию молекулярной природы возникших генетических изменений. Согласно базе данных Maize Genetics and Genomics Database (Lawrence et al., 2008), с геном *waxy* ассоциированы короткие тандемные повторы *phi022*, *phi027* и *phi061*. Эти внутригенные SSR-маркеры могут быть использованы для проведения маркер-ассоциированного отбора носителей мутаций *wx* (Yang, 2013). Однако в литературе мало данных о соответствии между размерными вариантами локусов *phi022*, *phi027*, *phi061* и ферментативной активностью ГСГТ (Dang, 2010). Таким образом, целью исследования являлась оценка эффективности использования микросателлитных последовательностей *waxy*-локуса для идентификации и маркирования генотипов восковидной кукурузы.

Материалы и методы

Растительный материал – зерно 33 образцов кукурузы различного генетического и экологического происхождения. Из фондов ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), (г. Санкт-Петербург, Россия) были любезно предоставлены одиннадцать самоопыленных линий восковидной кукурузы российской селекции (АД42, АД174, АД37, АД187-8-1, АД25, АД27, АД96, АД117, АД17, АД1-4480, АД48-40); четыре североамериканских образца кукурузы с повышенным содержанием амилозы в эндосперме (Высокоамилозная (K-15542), Bear High amylose, With Carotin, Mo31ae). Десять образцов сахарной кукурузы (Country Gentlemen, 5010, Golden Bantam, Black Mexican, Golden Bantam-2, Early June, Burbank Early, Black Mexican-2, Howling Mob, Golden Evergreen) относятся к уникальной части коллекции ВИР, собранной экспедицией Н.И. Вавилова в 1921–1922 гг. (США и Канада). Восемь образцов кукурузы (517B *ae1*^{oh43}, 517B *ae1*^{w64A}, 909D *clsh1wx1*, 510B *Ae1*-5180:Mu1,

M541 aelwx1, 915A wx1^w64A, 915A wx1^oh43, 912A sh1^oh43), несущих мутации в генах биосинтеза запасных углеводов зерна, любезно предоставлены фондовым центром семян Maize Genetics Cooperation Stock Center (Иллинойс, США).

Концентрацию растворимых редуцирующих сахаров и гидролизного крахмала в эндосперме зерна кукурузы оценивали с использованием бихроматного метода по ГОСТ 5903-89 п.6.2. (2004). Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре в кюветках с толщиной слоя 1 см при пяти длинах волн: 630, 640, 650, 660 и 670 нм. Для каждой пробы (три биологические и три химические повторности на образец) измерения повторяли три раза. Экстракцию и гидролиз кукурузного крахмала проводили согласно методам, описанным в ГОСТ 10845-98 (2001). Содержание амилопектина в обезжиренной муке эндосперма зерна кукурузы измеряли калориметрически по реакции с йодом. Для извлечения крахмала из муки использовали метод, предложенный С.А. Knutson (1986). Для каждого образца муки анализ проводили в трехкратной биологической и четырехкратной химической повторностях. Содержание фракции амилопектина оценивали относительно стандарта (Amylopectin from maize, 10120-SIGMA) при длине световой волны 620 и 535 нм, что соответствует максимуму поглощения комплексов амилоза- I_2 и амилопектин- I_2 (Hovorkamp-Hermelink et al., 1988). Содержание амилозы в образце рассчитывали как 100 % (общее содержание двух фракций крахмала) минус содержание амилопектина.

Информация об использованных в работе микросателлитных маркерах *phi022*, *phi027* и *phi061* получена из базы данных Maize Genetics and Genomics Database (Lawrence et al., 2008). Состав реакционной смеси и условия проведения полимеразной цепной реакции описаны в статье (Yu et al., 2012). Продукты амплификации разделяли с использованием капиллярного гель-электрофореза на анализаторе ABI PRISM 3500. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения GeneMapper Software 5.

Статистическую обработку данных проводили в программах MS Excel, Statistica 10.0. В работе применены алгоритмы кластерного анализа по методу *k*-средних, непараметрического корреляционного анализа, описательной статистики количественных признаков, таблицы сопряженности с оценкой достоверности распределения по критерию χ^2 . Для оценки генетического разнообразия коллекции кукурузы использовали программное обеспечение GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006), реализующее следующие алгоритмы расчета:

$$F_x = (2N_{xx} + N_{xy}) / 2N, \quad (1)$$

где F_x – частота встречаемости аллеля x кодоминантного локуса; N_{xx} – количество гомозигот по аллелю x , N_{xy} – количество гетерозигот, содержащих аллель x ; N – число образцов;

$$N_e = 1 / \sum F_i^2, \quad (2)$$

где N_e – эффективное число аллелей локуса; F_i – частота i -го аллеля локуса;

$$H_o = N_{xy} / N, \quad (3)$$

где H_o – наблюдаемая гетерозиготность локуса; N_{xy} – количество гетерозигот, N – число образцов;

$$PIC = 1 - \sum (F_i)^2, \quad (4)$$

где PIC – индекс полиморфизма локуса; F_i – частота i -го аллеля локуса.

Результаты и обсуждение

Комплекс калориметрических методов анализа позволил оценить содержание в эндосперме зерна кукурузы короткоцепочечных растворимых углеводов (КРУ), крахмала и его фракций (амилопектин и амилоза). Из 33 проанализированных генотипов минимальное накопление крахмала (39.60 %) отмечено в эндосперме сахарной кукурузы Howling Mob, максимальное (94.58 %) – в зернах АД27. Сахаристость эндосперма варьировала от 0.1 % (517B ael^w64A) до 30 % у образца Burbank Early. У некоторых образцов коллекции (АД17, АД1-4480, 915A wx1^w64A, 909) доля амилопектина в крахмале превышала 99 %. Наиболее высокая концентрация амилозы (более 25 %) установлена в эндосперме сортов Bear High amilose и With Carotin. Высокие коэффициенты вариации отмечены для признаков «содержание КРУ» ($\bar{X} = 9.39$ %; $V = 82.75$ %), «доля амилозы в крахмале» ($\bar{X} = 12.62$ %; $V = 74.01$ %). Общее содержание крахмала в эндосперме ($\bar{X} = 67.55$ %; $V = 22.84$ %) и концентрация в нем амилопектина ($\bar{X} = 87.38$ %; $V = 10.69$ %) характеризуются более узким диапазоном изменчивости в изученной коллекции кукурузы.

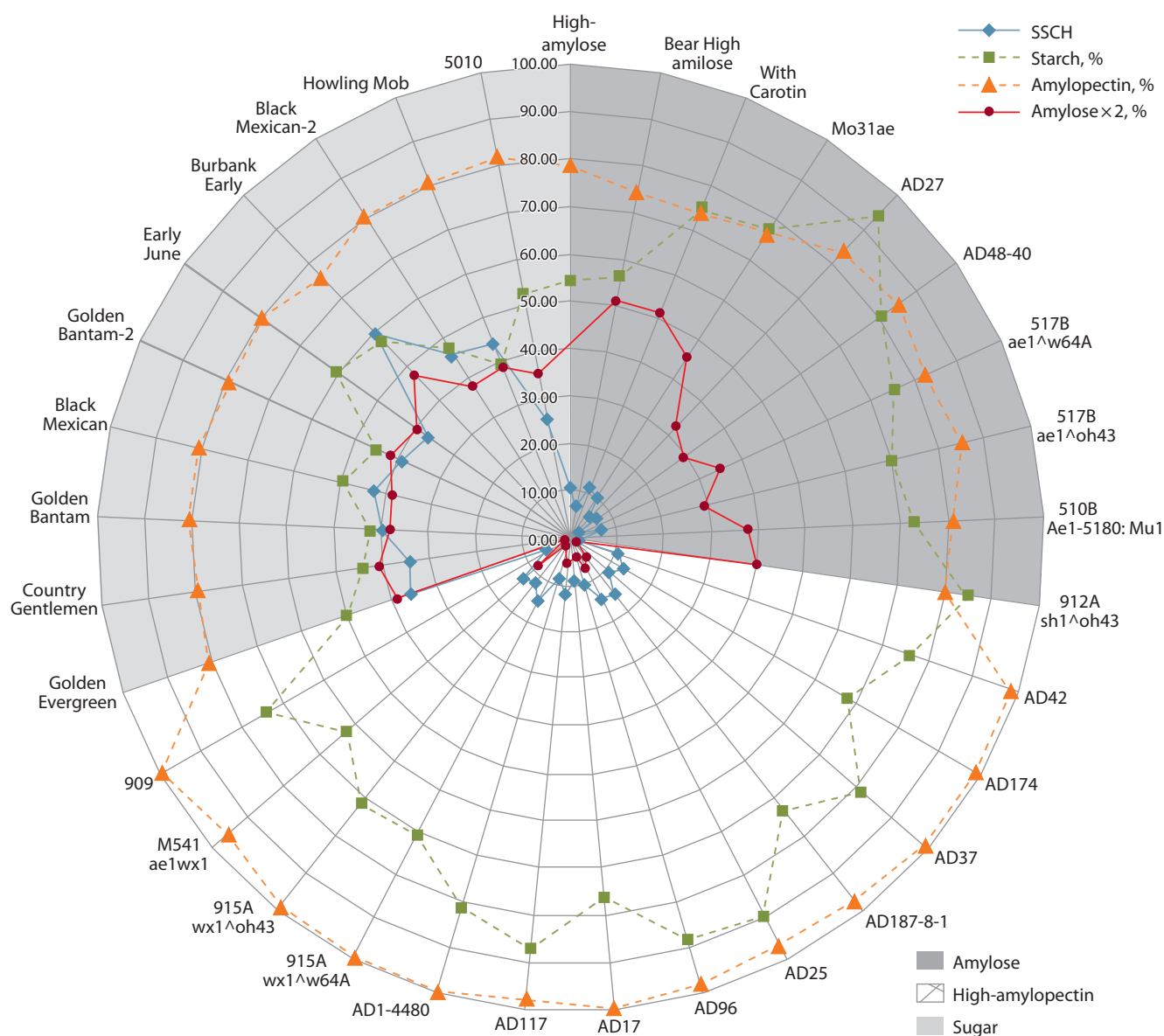
Для оценки связи между накоплением различных классов запасных углеводов в эндосперме кукурузы использовали непараметрический корреляционный анализ Спирмена. Обратная зависимость ($r^s = -0.66$) между уровнем короткоцепочечных растворимых углеводов и накоплением крахмала в эндосперме зерна, вероятно, обусловлена перераспределением метаболитов (УДФ-глюкозы) в сторону синтеза фитогликогена и декстранов у растений, мутантных по генам сахаросинтаз (образцы сахарной кукурузы). Концентрация амилопектина в эндосперме кукурузы положительно коррелирует с общим содержанием крахмала ($r^s = 0.45$). Таким образом, нон-сенс/миссенс мутации гена *waxy*, приводящие к изменению размера и структуры зерен крахмала, не оказывают негативного влияния на уровень накопления запасных полисахаридов в зерне. Так, в работе (Cui et al., 2014) в эндосперме мутантов *waxy* средний диаметр гранул крахмала превышал показатели образцов попкорна, зубовидной и сладкой кукурузы. По данным X. Yu с коллегами (2015), мучнистая фракция эндосперма традиционных и восковидных образцов кукурузы содержит более крупные, сферические по форме гранулы крахмала, окруженные большим количеством алейроновых зерен; в стекловидных участках эндосперма таких сортов зерна крахмала приобретают полигональную форму. Сорта сахарной кукурузы, изученные авторами, отличались более низким средним содержанием крахмала, округлыми, небольшими крахмальными зернами, высокой долей амилозы и растворимых сахаров в составе эндосперма.

Образцы коллекции классифицированы согласно уровню накопления запасных углеводов в эндосперме семян с использованием кластерного анализа по методу *k*-средних. Выделено три *k*-кластера образцов, достоверно различающихся по среднему значению содержания КРУ, крахмала, амилозы и амилопектина в семенах (табл. 1).

Table 1. *k*-Means clustering of maize accessions varying in the accumulation of storage carbohydrates in seed endosperm (two iterations with maximization of distances between cluster centers)

Character, %	Mean in the <i>k</i> -cluster			Fisher's F-test	<i>p</i>
	1	2	3		
Short-chain soluble carbohydrates	3.37	5.71	20.19	112.38	$1.2 \cdot 10^{-14}$
Starch	74.23	76.77	48.86	29.42	$8.5 \cdot 10^{-8}$
Amylopectin	80.32	98.39	80.13	203.37	$3.6 \cdot 10^{-18}$
Amylose	19.68	1.61	19.87	203.37	$3.6 \cdot 10^{-18}$

k-Clusters: 1, amylose; 2, high-amylopectin; 3, sugar.

**Fig. 1.** Storage protein contents in maize endosperm. SSCH, short-chain soluble carbohydrates.

Первый *k*-кластер (на рис. 1 – сектор между образцами высокоамилозная – 912A *sh1*^{oh43}, далее – Амилозный) объединяет 10 образцов, накапливающих низкие уровни КРУ, более 55 % запасного крахмала, с концентрацией в нем амилозы не менее 14.5 %. Согласно данным, представ-

ленным ВИР и Maize Genetics Cooperation Stock Center, образцы этого кластера несут мутации в генах семейства *amylose extender* (*ae*). Известно, что содержание амилозы у линий кукурузы с мутантным аллелем *ae* может достигать 50 % и более (Bear et al., 1958). Однако, по нашим данным,

Table 2. Polymorphism indices in SSR loci of the *Waxy* gene

Locus	N_a	F	N_e	H_o	PIC
<i>phi022</i>	<i>phi022</i> ₁₃₄	0.91	1.2	0.06	0.17
	<i>phi022</i> ₁₄₀	0.09			
<i>phi027</i>	<i>phi027</i> ₁₄₈	0.27	2.95	0.27	0.66
	<i>phi027</i> ₁₅₃	0.38			
	<i>phi027</i> ₁₆₃	0.35			
<i>phi061</i>	<i>phi061</i> ₈₆	0.27	1.66	0.24	0.40
	<i>phi061</i> ₉₄	0.73			

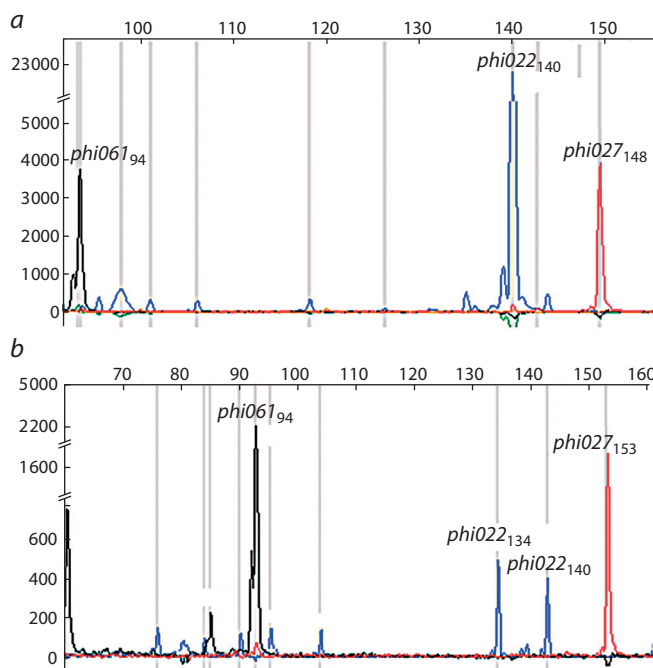
Notes. N_a , detected alleles; F , allele frequency; N_e , effective number of alleles in the locus, H_o , observed heterozygosity; PIC , polymorphic information content.

содержание амилозы в образцах кукурузы этого кластера не превышает 25.6 %. Вероятно, оценка содержания амилозы на основании калориметрии продуктов аффинного связывания компонентов крахмала с йодом, использованная нами, дает заниженные результаты, что показано в работе (Wang et al., 1993). Кроме того, эти генотипы могут содержать мутации и других генов биосинтеза крахмала, что также оказывает влияние на эффект гена *ae*.

Тринадцать образцов второго кластера (на рис. 1 – сектор АД-42 – 909, далее – Высокоамилопектиновый) относятся к высококрахмалистым, высокоамилопектиновым образцам с низким накоплением КРУ в эндосперме. В состав этого кластера вошли образцы с нарушением функций гена *waxy* (участвующего в синтезе амилозы фермента ГСГТ). Образец M541 *aelwx1*, отнесенный алгоритмом *k*-средних к образцам с высоким содержанием амилопектина, несет мутации двух ключевых генов биосинтеза крахмала (*waxy* и *amylose extender*, данные приведены, согласно Maize Genetics and Genomics Database). Известно, что эффекты генов *waxy* и *amylose extender* комплементарны. По сравнению с восковидной кукурузой, крахмал *aelwx* содержит более длинные полиглицановые цепи и по физическим свойствам близок к фракции амилопектина растений, мутантных по гену *ae*.

Третий кластер – десять образцов сахарной кукурузы с высоким содержанием КРУ, с долей крахмала в эндосперме менее 55 % (на рис. 1 – сектор Golden Evergreen – 5010, далее – Сахарный). Кластер сахарной кукурузы, вероятно, сформирован образцами, несущими дефектные варианты генов, кодирующих ферменты биосинтеза амилопектина – изоамилазу (гены *sugary kernel*, *su* и *sugary-enhancer1*, *se1*), сахаросинтазу (*shrunk1*, *sh1*) или ADP-ATP (*brittle endosperm1*, *bt1*).

Расстояние между центрами конечных *k*-кластеров составило 1.85 евклидовых единиц (ЕЕ) для пары Амилозный – Сахарный, 1.90 ЕЕ – для пары Высокоамилопектиновый – Сахарный и 3.60 ЕЕ – для пары Амилозный – Высокоамилопектиновый. При этом среднее расстояние между образцами, принадлежащими одному кластеру, составило 0.26–0.44 ЕЕ, а максимальное не превышало 0.73 ЕЕ (между образцом Bear High amylose и конечным центром кластера Амилозный). Таким образом, получен-

**Fig. 2.** Electrophoretic analysis of samples: (a) AD96 (high-amylopectin *k*-cluster), (b) 517B *ae1*^{oh43} (amylose *k*-cluster).

ное решение для классификации образцов кукурузы по уровню накопления запасных полисахаридов в зерне является оптимальным. Образцы кукурузы, отнесенные к Высокоамилопектиновому кластеру, были использованы как экспериментальная выборка для анализа частот встречаемости SSR-маркеров гена *waxy*. В качестве контроля были использованы образцы кластеров Амилозный и Сахарный.

В настоящее время известно более 40–50 мутантных вариантов локуса *waxy*, часть из которых фенотипически нестабильна и обусловлена встраиванием в последовательность гена мобильных элементов (например, система *Activator-Dissociation* и др.) (Huang et al., 2010). Исходный аллельный вариант гена до сих пор не известен. Наиболее вероятное место происхождения восковидной кукурузы (данные морфологии, кариотипа, анализа изоферментов и ДНК-маркеров) – китайский регион Yunnan-Guangxi (Fan et al., 2009), а предковая форма – неглютинозные сорта интродуцированной в Китае около 500 лет назад американской кукурузы (Liu et al., 2005; Hao et al., 2015). На основании данных RAPD-, SSR- и SNP-анализа генетическое разнообразие местных сортов и инбредных линий восковидной кукурузы оценивается как существенное, подтверждены генетические различия восковидных и традиционных сортов кукурузы (Zheng et al., 2013; Hao et al., 2015).

По данным Maize Genetics and Genomics Database, в промоторной и кодирующей областях гена *waxy* (Klosgen et al., 1986) расположены три микросателлитных повтора: *phi022*, *phi027*, *phi061*. Проведена оценка генетического разнообразия 33 образцов кукурузы, выявляемого с использованием данных трех SSR-маркеров (табл. 2, рис. 2). В исследуемой коллекции локусы *phi022* и *phi061*

представлены в двух аллельных вариантах: *phi022*₁₃₄ и *phi022*₁₄₀ (ампликоны длиной 134 и 140 п. н.), *phi061*₈₆ и *phi061*₉₄ (ампликоны длиной 86 и 94 п. н.). Для маркера *phi027* отмечено три аллеля: *phi027*₁₄₈, *phi027*₁₅₃, *phi027*₁₆₃ (ампликоны длиной 148, 153, 163 п. н. соответственно). Для локуса *phi027* отмечены самые высокие значения показателей «эффективное число аллелей» (N_e), «наблюдаемая гетерозиготность» (H_o), «индекс полиморфизма» (PIC) (см. табл. 2). В локусе *phi022* ген *waxy* наименее изменчив, частота минорного аллеля *phi022*₁₄₀ составила всего 9 %, а наблюдаемая гетерозиготность маркера – 0.06. В среднем по трем SSR-маркерам эффективное число аллелей составило 1.94 ± 0.47 , наблюдаемая гетерозиготность – 0.19 ± 0.01 , индекс полиморфизма – 0.41 ± 0.04 . Согласно (Botstein et al., 1980), такие показатели соответствуют среднему уровню генетического разнообразия выборки.

Для оценки ассоциации аллельных вариантов маркеров *phi022*, *phi027*, *phi061* с показателями биохимического состава зерна использовали двухходовые таблицы сопряженности с оценкой достоверности различия распределения аллелей в группах образцов по критерию χ^2 Пирсона. В анализ включили: частоты встречаемости индивидуальных аллелей SSR-локусов, сочетания двух аллелей одного локуса, сочетания аллелей двух-трех SSR-локусов.

Однозначно дифференцировать носителей мутантного варианта гена *waxy* на основании анализа частот встречаемости отдельных аллелей *phi022* и *phi061*, *phi027*, а также их гомо/гетерозиготного состояния в локусе не представляется возможным (табл. 3). Высокие значения вероятности формирования фенотипа *waxy* (*wx* – восковая кукуруза) при наличии определенного SSR-аллеля получены для локуса *phi061* ($\chi^2 = 5.39$; $p = 0.02$). Для локусов *phi022* и *phi027* статистическая достоверность рассматриваемой гипотезы (ассоциация признак-маркер) низка. Рассмотрение частот аллелей в экспериментальной и контрольной группе показало, что у образцов восковидной кукурузы чаще встречаются варианты *phi022*₁₄₀, *phi061*₉₄, реже – *phi022*₁₃₄, *phi061*₈₆ (см. табл. 3). Не отмечено также значимых ассоциаций между гомо/гетерозиготным состоянием локуса и формированием восковидного эндосперма. У *wx*-мутантов относительно чаще встречались носители аллельных сочетаний *phi022*₁₄₀*phi022*₁₄₀ и *phi061*₉₄*phi061*₉₄ (см. табл. 3), реже гомозиготы – *phi061*₈₆*phi061*₈₆.

Проведен анализ встречаемости сочетаний аллельных вариантов двух (рис. 3, а–в) и трех SSR-локусов (см. рис. 3, г) у форм восковидной кукурузы и образцов с диким вариантом гена. Согласно критерию χ^2 , распределение анализируемых комбинаций аллелей в двух фенотипических группах значимо различается ($p < 1 \times 10^{-5}$). Из трех генотипических вариантов по локусам *phi022* и *phi061* сочетание аллелей *phi022*₁₃₄*phi061*₉₄ наиболее широко распространенное. Образцы с более редкими сочетаниями аллелей в группах восковидной и невосковидной кукурузы распределены неравномерно, так, вариант *phi022*₁₄₀*phi061*₉₄ чаще отмечался у форм с восковидным фенотипом зерна, комбинация *phi022*₁₃₄*phi061*₈₆ – у *Wx*-образцов. В группе образцов восковидной куку-

Table 3. Frequencies (%) of allelic variants of SSR loci in groups of maize accessions with different levels of amylopectin accumulation in the endosperm

Allele	Phenotypic variant		χ^2	p
	<i>Wx</i>	<i>wx</i>		
<i>phi022</i> ₁₃₄	53.0	37.9	3.82	0.05
<i>phi022</i> ₁₄₀	1.5	7.6		
<i>phi027</i> ₁₄₈	10.6	16.7	2.86	0.24
<i>phi027</i> ₁₅₃	21.2	16.7		
<i>phi027</i> ₁₆₃	22.7	12.1		
<i>phi061</i> ₈₆	21.21	6.06	5.39	0.02
<i>phi061</i> ₉₄	33.3	39.4		
<i>phi022</i> ₁₃₄ <i>phi022</i> ₁₃₄	51.52	36.36	2.61	0.27
<i>phi022</i> ₁₄₀ <i>phi022</i> ₁₄₀	0.00	6.06		
<i>phi022</i> ₁₃₄ <i>phi022</i> ₁₄₀	3.03	3.03		
<i>phi027</i> ₁₄₈ <i>phi027</i> ₁₅₂	3.03	3.03	4.09	0.39
<i>phi027</i> ₁₅₃ <i>phi027</i> ₁₅₃	12.12	15.15		
<i>phi027</i> ₁₄₈ <i>phi027</i> ₁₄₈	9.09	15.15		
<i>phi027</i> ₁₆₃ <i>phi027</i> ₁₆₃	12.12	9.09		
<i>phi027</i> ₁₅₃ <i>phi027</i> ₁₆₃	18.18	3.03		
<i>phi061</i> ₈₆ <i>phi061</i> ₈₆	12.12	3.03	4.36	0.11
<i>phi061</i> ₉₄ <i>phi061</i> ₉₄	24.24	36.36		
<i>phi061</i> ₈₆ <i>phi061</i> ₉₄	18.18	6.06		

Designations: *Wx*, samples of the amylose and sugar clusters; *wx*, samples of the high-amylopectin cluster.

рузы отмечено также накопление сочетания аллелей *phi027*₁₄₈*phi061*₉₄ и относительное снижение частоты встречаемости варианта *phi027*₁₅₃*phi061*₈₆.

Наиболее интересные результаты получены при анализе комбинаций аллелей локусов *phi022* и *phi027* и комплекса всех трех SSR-маркеров. Комбинация *phi022*₁₄₀*phi027*₁₆₃ характерна только для образца амилозной кукурузы 517B ae1^{oh43}. Сочетание аллелей *phi022*₁₄₀*phi027*₁₄₈ отмечено только у образцов восковидной кукурузы (в гомозиготе у номеров 909D c1sh1wx1, АД96; в гетерозиготе – у АД117).

Самое распространенное в коллекции сочетание трех SSR-локусов – вариант *phi022*₁₃₄*phi027*₁₅₃*phi061*₉₄. Однако существенных различий частот встречаемости этой комбинации аллелей в группах с контрастным содержанием амилопектина в крахмале не выявлено. Например, этот генотип отмечен у образцов восковидной кукурузы 915A wx1^{oh43}, АД174, АД37, в гетерозиготе у образца АД42. Выявлены и уникальные для групп сочетания аллелей: *phi022*₁₄₀*phi027*₁₆₃*phi061*₉₄ (образец амилозной кукурузы 517B ae1^{oh43}) и *phi022*₁₄₀*phi027*₁₄₈*phi061*₉₄ (образцы восковидной кукурузы 909D c1sh1wx1, АД96 и АД117). Кроме того, отмечены сочетания аллелей, с разной вероятностью встречающиеся в группах с диким и мутантным вариантами гена *waxy*. Так, варианты *phi022*₁₃₄*phi027*₁₅₃*phi061*₈₆ и *phi022*₁₃₄*phi027*₁₆₃*phi061*₈₆

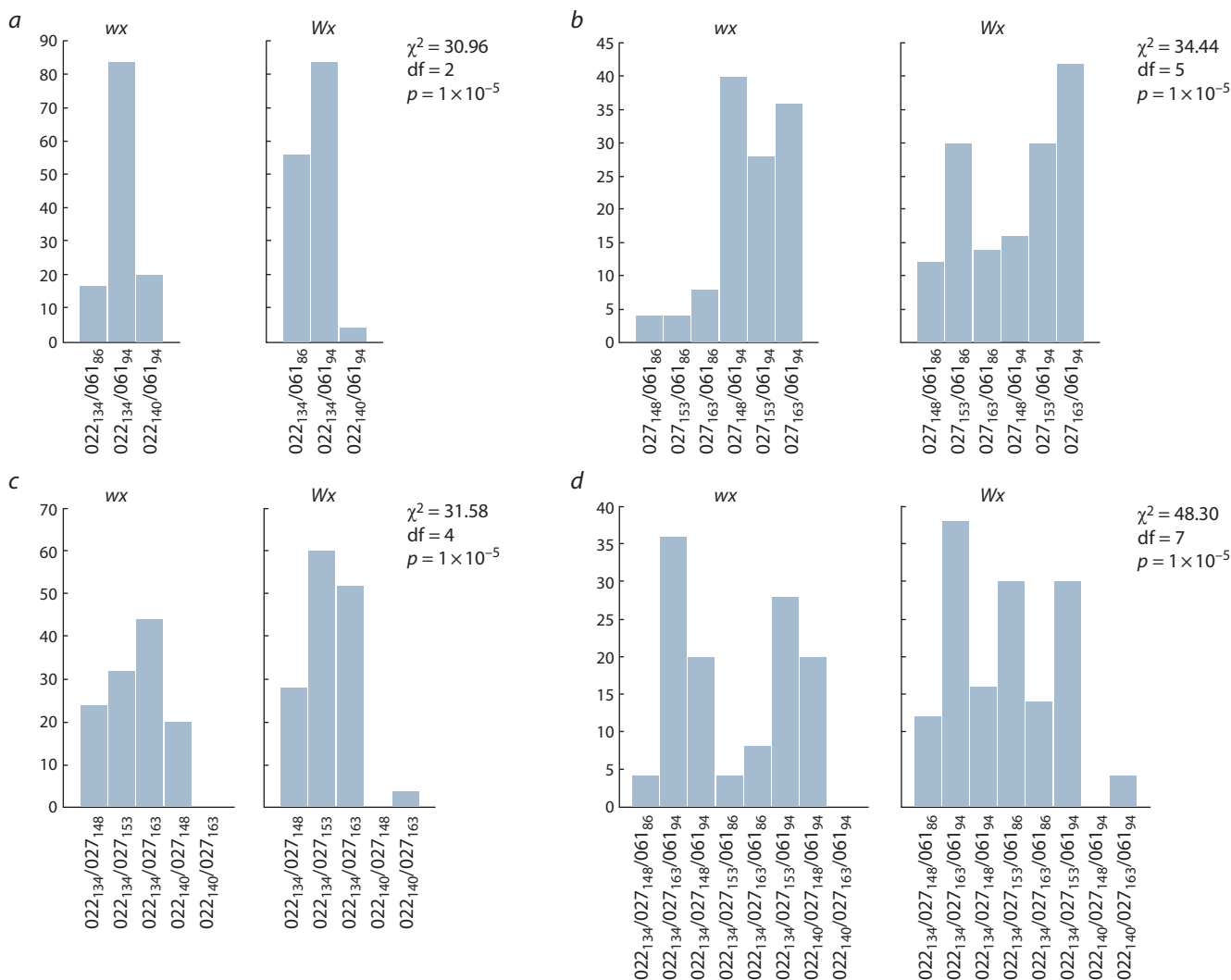


Fig. 3. Categorized graphs of the prevalence of alleles *phi022*, *phi027*, and *phi061* in groups of samples differing in amylopectin content: (a) *phi022* and *phi061*; (b) *phi027* and *phi061*; (c) *phi022* and *phi027*; (d) *phi022*, *phi027*, and *phi061*.

широко распространены среди образцов сахарной кукурузы, однако были отмечены только у двух образцов восковидной кукурузы (АД42 и АД17).

Заключение

Отсутствие информации о характере и причине мутации гена *waxy* использование внутригенных микросателлитных локусов – ценный инструмент для маркер-ассоциированной селекции восковидной кукурузы. В частности, L. Yang с коллегами (2013) использовали маркер *phi027* для пирамидирования генов *waxy* и *opaque-16*. По нашим данным, для маркер-ассоциированного отбора образцов восковидной кукурузы больший интерес представляют не отдельные аллели анализируемых SSR-локусов, а ассоциированные с целевым признаком комбинации аллелей.

На основании биохимического анализа в коллекции 33 образцов кукурузы были выделены две экспериментальные группы, контрастные по уровню накопления амило-

пектина в эндосперме: *Wx* – дикий тип, соответствующий менее 85 % амилопектина от общего содержания крахмала в эндосперме, и мутантные по гену *wx* высокоамилопектиновые формы. Для ассоциированных с последовательностью гена *waxy* локусов *phi022*, *phi027*, *phi061* проведен анализ частот встречаемости аллельных вариантов маркера, их гомо/гетерозиготного состояния, а также комбинаций аллелей в двух-трех локусах. Вероятность соответствия комбинации трех локусов фенотипу «восковидная кукуруза» составила от 5 % (у носителей сочетания *phi022*₁₃₄*phi027*₁₅₃*phi061*₉₄) до 100 % (у носителей уникального для восковидной кукурузы сочетания аллелей *phi022*₁₄₀*phi027*₁₄₈*phi061*₉₄).

Acknowledgements

We are grateful to the staff of the Vavilov All-Russia Institute of Plant Genetic Resources (St.-Petersburg, Russia) and the Maize Genetics Cooperation Stock Center (Illinois, United States) for the kindly provided plant material.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alexander D.E., Creech R.G. Breeding special and nutritional types. Corn and Corn Improvement. Ed. G.F. Sprague. Am. Soc. Agron, Madison, WI, 1977;363-390.
- Bao J.-D., Yao J.-Q., Zhu J.-Q., Hu W.-M., Cai D.-G., Li Y., Shu Q.-Y., Fan L.-J. Identification of glutinous maize landraces and inbred lines with altered transcription of *waxy* gene. Mol. Breed. 2012;30(4): 1707. DOI 10.1007/s11032-012-9754-3.
- Bear R.P., Vineyard M.L., MacMasters M.M., Deatherage W.L. Development of "amylomaize" – corn hybrids with high amylose starch: II. Results of breeding efforts. Agron. J. 1958;50(10):598-602. DOI 10.2134/agronj1958.00021962005000100010x.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 1980;32(3):314-331.
- Cui L., Dong Sh., Zhang J., Liu P. Starch granule size distribution and morphogenesis in maize (*Zea mays* L.) grains with different endosperm types. Aust. J. Crop Sci. 2014;8(11):1560-1565.
- Dang N.-Ch. Improvement of protein quality in waxy maize (*Zea mays* L.) by doubled haploid and marker assisted selection techniques, doctoral thesis. Zurich. 2010. DOI org10.3929/ethz-a-006192803.
- Fan L.J., Bao J.D., Wang Y., Yao J.Q., Gui Y., Hu W., Zhu J., Zeng M., Li Y., Xu Y. Post-domestication selection in the maize starch pathway. PLoS One. 2009;4(10):e7612. DOI 10.1371/journal.pone.0007612.
- Hao D., Zhang Z., Cheng Y., Chen G., Lu H., Mao Y., Shi M., Huang X., Zhou G., Xue L. Identification of genetic differentiation between *waxy* and common maize by SNP genotyping. PLoS One. 2015;10(11):e0142585. DOI 10.1371/journal.pone.0142585.
- Hoeverkamp-Hermelink J., Devries J., Adamse P., Jacobsen E., Witholt B., Feenstra W. Rapid estimation of the amylase amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. Potato Res. 1988;31:241-246.
- Huang B.-Q., Tian M.-L., Zhang J.-J., Huang Y.-B. *waxy* locus and its mutant types in maize *Zea mays* L. Agr. Sci. China. 2010;9(1):1-10. DOI 10.1016/S1671-2927(09)60061-4.
- 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.
- Klosgen R.B., Gierl A., Schwarz-Sommer Z., Saedler H. Molecular analysis of the *waxy* locus of *Zea mays*. Mol. Gen. Genet. 1986; 203(2):237-244.
- Knutson C.A. A simplified colorimetric procedure for determination of amylose in maize starches. Cereal Chem. 1986;63:89-92.
- Lambert R.J. High-oil corn hybrids. Specialty Corns. Ed. A.R. Hallauer. FL: CRC Press, 2001;131-154.
- Lawrence C.J., Harper L.C., Schaeffer M.L., Sen T.Z., Seigfried T.E., Campbell D.A. MaizeGDB: the maize model organism database for basic, translational, and applied research. Int. J. Plant Genomics. 2008;496957. DOI 10.1155/2008/496957.
- Li W.C. Quality breeding. Maize Breeding in Southwestern Ecological Region. Eds. T.Z. Rong, W.C. Li, K.C. Yang, B. Zhang, S.K. Zhang, H.J. Tang, X.M. Fan. Beijing: China Agric. Press, 2003.
- Liu Y.-J., Huang Y.-B., Rong T.-Z., Tian M.-L., Yang J.-P. Comparative analysis of genetic diversity in landraces of waxy maize from Yunnan and Guizhou using SSR markers. Agr. Sci. China. 2005;4(9): 648-653.
- Nugent A.P. Health properties of resistant starch. Nutr. Bull. 2005; 30(1):27-54. DOI 10.1111/j.1467-3010.2005.00481.x.
- Pan D. Starch synthesis in maize. Carbohydrate Reserves in Plants: Synthesis and Regulation. Eds. A.K. Gupta, N. Kaur. Amsterdam: Elsevier, 2000;26:125-146.
- Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes. 2006;6(1):288-295. DOI 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
- State Standard 10845-98. Interstate standard. Grain and Products of its Processing. Method for the Starch Determination. Moscow: IPK Izdatel'stvo standartov, 2001. (in Russian)
- State Standard 5903-89. Interstate standard. Methods for the Sugar Determination. Moscow: IPK Izdatel'stvo standartov, 2004. (in Russian)
- Tan H.-Z., Li Z.-G., Tan B. Starch noodles: history, classification, materials, processing, structure, nutrition, quality evaluating and improving. Food Res. Int. 2009;42(5):551-576. DOI 10.1016/j.foodres.2009.02.015.
- Tian M.L., Huang Y.B., Tan G.X., Liu Y.J., Rong T.Z. Sequence polymorphism of *waxy* genes in landraces of waxy maize from southwest China. Acta Agron. Sin. 2008;34(5):729-736. DOI 10.3724/SP.J.1006.2008.00729.
- Wang Y.-J., White P., Pollak L., Jane J. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with *oh43* inbred line background. Cereal Chem. 1993;70(2):171-179.
- Wessler S., Vagaron R. Molecular basis of mutations at the *waxy* locus of maize: correlation with the fine structure genetic map. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985;82(12):4177-4181.
- Wilson L.M., Whitt Sh.R., Ibáñez A.M., Rocheford T.R., Goodman M.M., Buckler E.S. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. Plant Cell. 2004;16(10):2719-2733. DOI 10.1105/tpc.104.025700.
- Yang L., Wang W., Yang W., Wang M. Marker-assisted selection for pyramiding the *waxy* and opaque-16 genes in maize using cross and backcross schemes. Mol. Breed. 2013;31(4):767-775. DOI 10.1007/s11032-012-9830-8.
- Yu R.H., Wang Y.L., Sun Y., Liu B. Analysis of genetic distance by SSR in waxy maize. Genet. Mol. Res. 2012;11(1):254-260. DOI http://dx.doi.org/10.4238/2012.February.3.5.
- Yu X., Yu H., Zhang J., Shao Sh., Xiong F., Wang Z. Endosperm structure and physicochemical properties of starches from normal, waxy, and super-sweet Maize. Int. J. Food Prop. 2015;18(12):2825-2839. DOI 10.1080/10942912.2015.1015732.
- Zheng H., Wang H., Yang H., Wu J., Shi B., Cai R. Genetic diversity and molecular evolution of Chinese waxy maize germplasm. PLoS One. 2013;8(6):e66606. pmid:23818949. DOI 10.1371/journal.pone.0066606.

ORCID ID

S.I. Vakula orcid.org/0000-0002-2242-7107
O.A. Orlovskaya orcid.org/0000-0002-1187-1317
L.V. Khotyleva orcid.org/0000-0003-0295-5022
A.V. Kilchevsky orcid.org/0000-0002-0175-9786

Анализ полиморфизма генома представителей синтетического вида *×Trititrigia cziczinii* Tsvet. методом AFLP

А.А. Трифонова¹✉, К.В. Борис¹, Л.В. Дедова¹, В.А. Мельник¹, Л.П. Иванова², Н.П. Кузьмина²,
С.В. Завгородний², В.П. Упелниек²

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

² Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва, Россия

×Trititrigia cziczinii Tsvet. – синтетический вид, полученный в результате гибридизации различных видов пшеницы и пырея. *×T. cziczinii*, – обладает уникальными признаками: многолетность, способность к отращиванию после скашивания на зерно, высокая адаптивность, устойчивость к болезням и вредителям, высокое содержание белка и клейковины в зерне. Это позволяет считать его перспективной сельскохозяйственной культурой. Новый вид является удобным объектом для проведения фундаментальных исследований в области генетики, филогении и эволюции злаков (Poaceae). Однако прежде генетические исследования *×T. cziczinii* практически не проводились. Цель настоящей работы – изучение генетического разнообразия 24 представителей двух подвидов (*ssp. Submitans* и *ssp. Perenne*) вида *×T. cziczinii*. Для оценки межвидовых различий в анализ было включено 17 образцов других видов трибы Triticeae (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Agropyron glaucum* и *Agropyron elongatum*, а также образцы пшенично-пырейных и пшенично-элимусных гибридов (ППГ и ПЭГ)). В работе был применен метод маркирования AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), который позволил выявить достаточно высокий уровень полиморфизма изученных образцов. С помощью двух комбинаций праймер/фермент (*EcoRI*-ACT/*MseI*-CCC и *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTA) удалось идентифицировать 227 фрагментов, из которых 224 были полиморфны (98.68 %), а уровень внутривидового полиморфизма 24 образцов *×T. cziczinii* составил 68.15 %. Найдены фрагменты AFLP-спектров, специфичные для представителей *×T. cziczinii* и изученных видов пырея, которые могут стать основой для создания маркеров, выявляющих интрогрессии генетического материала рода *Agropyron* в геноме представителей *×T. cziczinii*. Полученные результаты свидетельствуют о большей генетической близости *×T. cziczinii* к *T. aestivum*, чем к представителям рода *Agropyron*. Так, по данным кластерного анализа, представители *×T. cziczinii* и сорта мягкой пшеницы объединились в один подкластер, внутри которого образцы двух видов образуют отдельные группы. При этом в результате оценки внутривидового генетического разнообразия *×T. cziczinii* не было выявлено достоверной дифференциации представителей подвидов *Submitans* и *Perenne*, что, вероятно, связано с не до конца определенной генетической природой многолетности, основного признака, по которому эти подвиды разделены. Проведенное изучение части уникальной коллекции синтетического вида *×T. cziczinii* позволило получить первые данные о генетике вида, более ранние исследования затрагивали в основном фенотипические и хозяйственно ценные признаки. Применяемый в настоящем исследовании метод AFLP-маркирования показал высокую эффективность при работе с малоизученным видом, а его результаты перспективны и полезны для понимания генетической структуры нового вида (*×T. cziczinii* Tsvet.).

Ключевые слова: *×Trititrigia cziczinii* Tsvet.; синтетический вид; межвидовая гибридизация; AFLP-анализ; генетическое разнообразие.

Genome polymorphism of the synthetic species *×Trititrigia cziczinii* Tsvet. inferred from AFLP analysis

A.A. Trifonova¹✉, K.V. Boris¹, L.V. Dedova¹,
V.A. Melnik¹, L.P. Ivanova², N.P. Kuzmina²,
S.V. Zavgorodniy², V.P. Upelniiek²

¹ Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

² N.V. Tsitsin Main Botanical Garden, RAS, Moscow, Russia

×Trititrigia cziczinii Tsvet. is a synthetic species obtained as a result of hybridization of different wheat and wheat-grass species. *×T. cziczinii* has unique characteristics, as it is a perennial species, with the ability to grow after mowing, high adaptability, resistance to diseases and pests, high protein and gluten content in the grain. All this makes it a promising new crop for agriculture. The new species is a good object for fundamental research in the field of genetics, phylogeny and evolution of cereals (Poaceae). However, there were practically no genetic studies of *×T. cziczinii*. The aim of this work was to study the genetic diversity of 24 representatives of two *×T. cziczinii* subspecies (*ssp. Submitans* and *ssp. Perenne*). To estimate interspecific differences, 17 samples of other tribe Triticeae species (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Agropyron glaucum* and *Agropyron elongatum*, as well as samples of *Triticum*-*Agropyron* and *Triticum*-*Elymus* hybrids) were included in the analysis. For the study, AFLP method (Amplified Fragment Length Polymorphism) was chosen, which allowed us to reveal a sufficiently high polymorphism level of the studied samples. The two primer/enzyme combinations (*EcoRI*-ACT/*MseI*-CCC, *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTA) allowed the identification of 227 fragments, 224 of them were polymorphic (98.68 %), and the level of intraspecific polymorphism of 24 *×T. cziczinii* samples was 68.15 %. The identified fragments of AFLP spectra, specific for the *×T. cziczinii* representatives and the studied wheat-grass species, can be the basis for creating markers that will detect introgressions of genetic material of the genus *Agropyron* in the *T. cziczinii* genome. Our results indicate a greater genetic relatedness of *×T. cziczinii* to *T. aestivum* than to representatives of the genus *Agropyron*. According to the cluster analysis, representatives of *×T. cziczinii* and varieties of bread wheat were combined into a single subcluster, within which the samples of two species form separate groups. At the same time, the evaluation of the intraspecific genetic diversity of *×T. cziczinii* showed

no reliable differentiation of representatives of the subspecies *Submitans* and *Perenne*, which is probably due to uncertain genetic nature of perenniality, the main feature that divides these subspecies. The study of the unique $\times T. cziczinii$ collection allowed us to obtain the first data on the genetics of the species, while previous studies were focused mainly on phenotypic and economically valuable traits. AFLP analysis used in this study showed high efficiency when working with less studied species, and its results are promising and useful for understanding the genetic structure of the new species ($\times T. cziczinii$ Tsvl.).

Key words: $\times Triticigia cziczinii$ Tsvl.; synthetic species; interspecific hybridization; AFLP-analysis; genetic diversity.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Трифопова А.А., Борис К.В., Дедова Л.В., Мельник В.А., Иванова Л.П., Кузьмина Н.П., Завгородний С.В., Упельник В.П. Анализ полиморфизма генома представителей синтетического вида $\times Triticigia cziczinii$ Tsvl. методом AFLP. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):648-653. DOI 10.18699/VJ18.406

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Trifonova A.A., Boris K.V., Dedova L.V., Melnik V.A., Ivanova L.P., Kuzmina N.P., Zavgorodniy S.V., Upelnik V.P. Genome polymorphism of the synthetic species $\times Triticigia cziczinii$ Tsvl. inferred from AFLP analysis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):648-653. DOI 10.18699/VJ18.406 (in Russian)

Отдаленная гибридизация открывает широкие возможности для использования геномного потенциала диких видов растений. Так, представители видов пырея являются донорами генов устойчивости к ряду заболеваний, адаптивности и качества и, соответственно, могут быть использованы в селекционных программах по улучшению культурных видов злаков. Поэтому отдаленные гибриды, полученные от скрещивания культурных и диких видов, могут стать не только хорошим объектом для фундаментальных исследований, но и перспективными формами для селекции и сельскохозяйственного производства.

Генетическое разнообразие отдаленных гибридов, в частности синтетических (рукотворных), полученных с помощью межродовой гибридизации, изучается недостаточно активно, хотя подобные исследования позволяют получать данные о механизмах межгеномных взаимодействий в процессе образования новых таксонов при гибридизации, расширить знания в области сетчатой эволюции злаков – одного из способов объяснения главных эволюционных путей в трибе Triticeae.

$\times Triticigia cziczinii$ Tsvl. – синтетический вид, полученный под руководством академика Н.В. Цицина методом отдаленной гибридизации и выделенный в отдельный род *Triticigia* Н.Н. Цвелевым (1973). В качестве родительских форм использовали виды пырея (*Agropyron elongatum* (Host) P. Beauv. (syn. *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Zhi W. Liu & R.R.-C. Wang) и *A. glaucum* (Desf. ex DC) Roem. and Schult. (syn. *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey)) и сорта мягкой и твердой пшеницы (*Triticum aestivum* L. и *T. durum* Desf.) в различных комбинациях. Описывая новый синтетический вид, отличительной особенностью которого является то, что после созревания и уборки зерна развиваются побеги возобновления, т.е. происходит отрастание новых побегов, которые способны образовывать колос, Н.В. Цицин (1960) выделил два подвида: ssp. *Submitans* (отрастающая форма) и ssp. *Perenne* (многолетняя форма). Геном $\times T. cziczinii$ представлен 56 хромосомами, из которых 42 пшеничные и 14 пырей-

ные (Любимова и др., 1976). Кроме того, растения этого вида обладают устойчивостью к болезням и вредителям, высокой адаптивностью.

С 1960 г. коллекция образцов $\times T. cziczinii$ поддерживается в отделе отдаленной гибридизации Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН; сотрудниками проводятся многолетние наблюдения и исследования этого вида, отбираются новые перспективные формы. Но только в последние годы начаты работы по использованию молекулярно-генетических маркеров для оценки генетического разнообразия коллекции. В 2012 г. впервые исследован полиморфизм запасных белков (глюадинов) $\times T. cziczinii$ (Упельник и др., 2012). Однако анализ генетического разнообразия вида $\times T. cziczinii$ с помощью ДНК-маркеров ранее не проводился.

Одним из эффективных методов изучения генетического разнообразия растений является AFLP-анализ (Amplified Fragment Length Polymorphism). Он широко используется для изучения популяционного полиморфизма, филогенетических отношений, идентификации видов, а также маркирования локусов, сцепленных с хозяйственно ценными признаками (Altinkut et al, 2003; El Rabey et al., 2014; Kaaya et al., 2014; Xue, Chu, 2015). Этот метод довольно часто применяется и для исследования геномов злаков, причем как культурных (El Rabey et al., 2014; Садыгов и др., 2017), так и дикорастущих (Kaaya et al., 2014; Горюнова и др., 2017) видов.

Целью настоящей работы было изучение внутривидового генетического разнообразия представителей двух подвидов синтетического вида $\times Triticigia cziczinii$ Tsvl., а также межвидового разнообразия представителей дикорастущих и культурных форм злаков, использованных при создании этого вида, методом AFLP-анализа.

Материалы и методы

Исследовано восемь образцов подвида ssp. *Submitans* (однолетние, отрастающие) – линии № 12, 38, 40, 80, 166, 192, 1689, 3305 и 15 образцов подвида ssp. *Perenne* (многолетние) – линии № 24, 33, 249, 249-1, 548, 1416,

1451, 1514, 1533, 1797, 1682, 3202, 4015, 209, 3П26. Разделение по признаку многолетности происходит в зависимости от числа перезимовавших растений и может зависеть от условий зимовки. Поэтому линии подвида *Perenne* могут в определенные годы развиваться как однолетние, отрастающие. Лишь линии 24, 249, 249-1 можно считать облигатно многолетними (по данным длительных наблюдений).

Кроме того, в анализ было включено шесть образцов двух видов пырея (три образца *A. glaucum* и три – *A. elongatum*), четыре образца мягкой пшеницы *T. aestivum* (сорта Chinese Spring, Мироновская 808, Московская 39 и Заря), один образец твердой пшеницы *T. durum* (сорт Харьковская 21), четыре линии пшенично-пырейных гибридов (ППГ-254, ППГ-260, ППГ-283, ППГ-284), два сорта ППГ (Оста, Снегиревская 10) и один сорт пшенично-элимусного гибрида – ПЭГ (Рубежная).

Образцы родов ×*Triticigia* и *Agropyron*, а также пшенично-пырейные и элимусные гибриды получены из коллекции Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. Сорта мягкой и твердой пшеницы взяты из коллекции Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (ИОГен РАН).

ДНК образцов рода *Agropyron* и вида ×*T. cziczinii* выделяли из свежих листьев, а образцов рода *Triticum*, ППГ и ПЭГ – из пятидневных проростков стандартным СТАВ-методом с модификациями (Doyle, 1991). AFLP-анализ проводили стандартным методом (Vos et al., 1995). Для первого раунда амплификации была использована следующая комбинация праймер/фермент: *EcoRI*-А и *MseI*-С. Для второго раунда амплификации по литературным данным (Садыгов и др., 2017) были отобраны две комбинации: *EcoRI* – *ACT/MseI*-CCC и *EcoRI*-*ACT/MseI*-CTA. Фракционирование продуктов амплификации осуществляли путем электрофореза в 6 % полиакриламидном геле (ПААГ) в 1×кратном ТВЕ-буфере. Окрашивание проводили нитратом серебра, проявляли гель по методу № 3 (Benbouza et al., 2006). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы 100 bp DNA ladder (Invitrogen) (0.05 г/л).

Результаты AFLP-анализа суммировали в виде бинарной матрицы (1/0) в программе Microsoft Excel. Анализ методом главных координат (PCA), а также построение дендрограммы выполняли в программе PAST 3.16 (Hammer et al., 2001) на основе индекса генетического сходства Дайса, который исключает из рассмотрения совместное отсутствие фрагмента (так как существует возможность того, что нулевые аллели не гомологичны), и в некоторых исследованиях показаны преимущества его использования (Duarte et al., 1999). Кластерный анализ выполнен с использованием метода UPGMA, оценку достоверности проводили с помощью бутстреп-анализа с 1000 реплик.

Результаты

В ходе AFLP-анализа 41 образца трибы Triticeae выявлено 227 фрагментов (137 для праймера *EcoRI* – *ACT/MseI*-CCC и 90 для праймера *EcoRI*-*ACT/MseI*-CTA), из которых 224 были полиморфны (98.68 %).

Средний показатель коэффициента генетического сходства между всеми образцами составил 0.668. Наиболее

генетически близкими оказались образцы ППГ-254 и сорт ПЭГ Рубежная (0.982). Наименьший уровень генетического сходства отмечен для образцов *A. elongatum* и сорта ПЭГ Рубежная (0.087).

На основании рассчитанных индексов сходства проведен кластерный анализ (рис. 1).

Как видно из рис. 1, на дендрограмме четко выделяются два кластера с высоким значением бутстреп-поддержки (индекс бутстрепа (ИБ) = 100). Представители рода *Agropyron* образуют первый кластер, который в свою очередь делится на два подкластера, соответствующих видам *A. glaucum* и *A. elongatum*.

Все остальные образцы объединяются во второй кластер. Обособленное положение (ИБ = 100) в этом кластере занимает образец твердой пшеницы сорта Харьковская 21. Отдельный подкластер во втором кластере образуют линии и сорта ППГ (ППГ-254, ППГ-260, ППГ-283, ППГ-284, Оста, Снегиревская 10) и сорт ПЭГ (Рубежная). Представители ×*T. cziczinii* и сорта мягкой пшеницы объединились в еще один подкластер, внутри которого образцы двух видов дифференцированы, пусть и с небольшим значением индекса бутстрепа (ИБ = 58).

Спектры фрагментов представителей ×*T. cziczinii* были более сходны со спектрами *T. aestivum*, чем со спектрами *A. glaucum* и *A. elongatum*. Детектировано 10 фрагментов, присутствующих только у представителей рода *Agropyron*, и 24 фрагмента, присутствующих только у *T. aestivum* и представителей двух подвидов ×*Triticigia*. Но найдены также фрагменты, специфичные для *A. glaucum*, *A. elongatum* и представителей ×*T. cziczinii*. Было детектировано три фрагмента, амплифицирующихся только у образцов рода *Agropyron* и у всех представителей ssp. *Submitans* и ssp. *Perenne*, а также один фрагмент, который амплифицировался у образцов *T. aestivum*, а в спектрах *A. glaucum*, *A. elongatum* и ×*T. cziczinii* отсутствовал.

В ходе работы была проведена оценка внутривидового полиморфизма ×*T. cziczinii*. Уровень полиморфизма изучаемых образцов ×*T. cziczinii* составил 68.15 %. При этом у представителей подвида *Submitans* уровень полиморфизма был ниже, чем у представителей подвида *Perenne* (52.08 и 61.07 % соответственно), что может быть объяснено меньшим числом образцов этого подвида, доступных для анализа.

Коэффициент генетического сходства Дайса между образцами ×*T. cziczinii* оказался достаточно высоким (среднее значение 0.855), он варьировал от 0.755 до 0.974. Максимальный уровень сходства между образцами подвида *Perenne* составил 0.974 (образцы 4015 и 209), минимальный уровень сходства отмечен между образцами 24 и 3202 (0.755). Среди образцов подвида *Submitans* этот показатель варьировал от 0.784 (между образцами 38 и 3305) до 0.961 (между образцами 40 и 80).

На основании значений индексов генетического сходства выполнен анализ методом главных координат, отражающий различия между изучаемыми образцами ×*T. cziczinii* (рис. 2). Как видно из приведенного графика, а также на дендрограмме, нет четкого разделения между образцами двух подвидов. Это подтверждается также отсутствием фрагментов, специфичных для AFLP-спектра определенного подвида. Достаточно обособлены образцы подвида

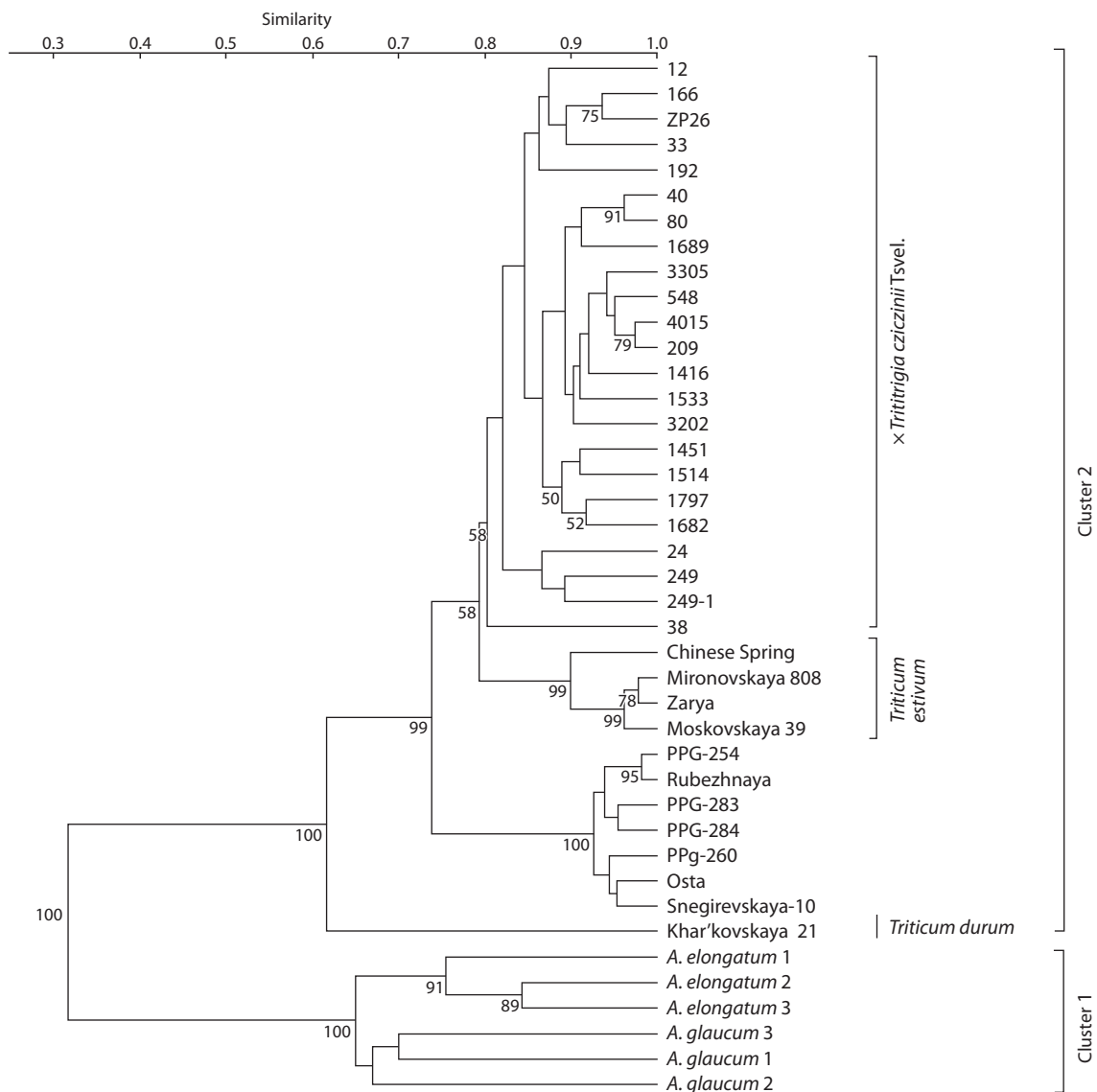


Fig. 1. Cluster analysis of AFLP data for all studied samples.

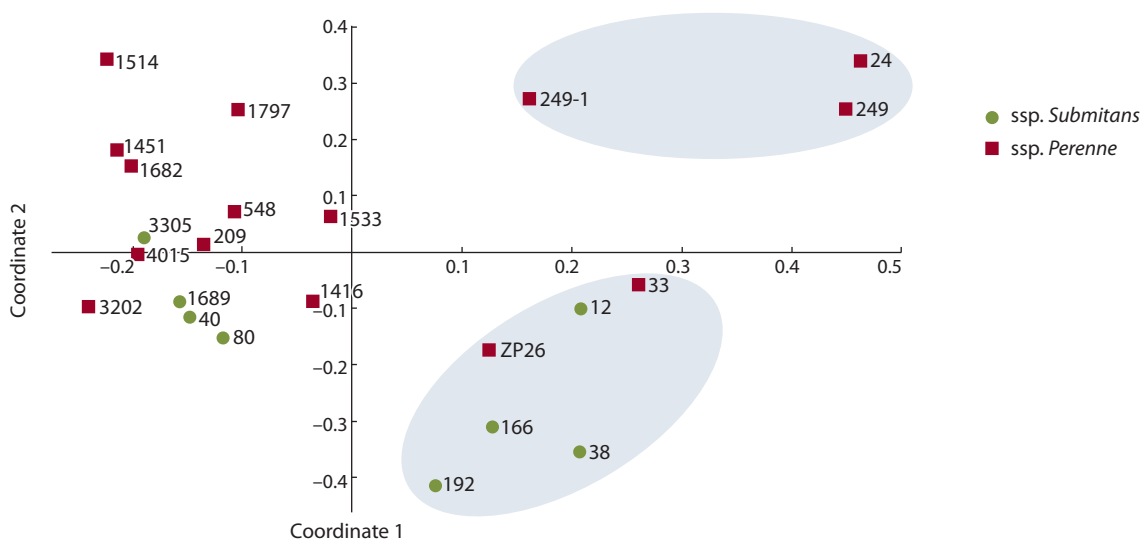


Fig. 2. Differentiation of studied *×T. cziczinii* Tsvet. samples by principal coordinate analysis based on AFLP data.

Perenne: 24, 249, 249-1. Отдельную группу формируют также образцы 12, 33, 38, 166, 192 и 3П26.

Обсуждение

Метод AFLP-маркирования достаточно широко используется для анализа генетического разнообразия трибы Triticeae (Khalighi et al., 2008; Colomba et al., 2011; Jensen et al., 2016; Горюнова и др., 2017; Садыгов и др., 2017). В настоящем исследовании этот метод был впервые применен для анализа генетического разнообразия синтетического вида *×T. cziczinii* Tsvet. и позволил выявить и оценить как внутривидовой полиморфизм, так и межвидовые различия. Были использованы две праймерные комбинации, ранее успешно примененные для оценки генетического разнообразия твердой пшеницы (Садыгов и др., 2017). Выбранные комбинации праймер/фермент оказались эффективны и для анализируемой выборки (всего получено 227 фрагментов), а уровень межвидового полиморфизма был достаточно высок и составил 98.68 %.

Уровень разнообразия внутри вида *×T. cziczinii* был меньше (68.15 %). Однако, по сравнению с другими исследованиями внутривидового разнообразия представителей рода *Triticum*, его можно считать высоким. Так, при исследовании внутривидового полиморфизма разных видов пшеницы с помощью AFLP-маркирования уровень полиморфизма не превышал 64 % (Khan et al., 2014). Уровень генетического разнообразия, выявленный в ходе AFLP-анализа 54 образцов синтетической гексаплоидной пшеницы, полученной путем скрещивания *T. dicoccum* и *A. tauschii*, составил 39 %, что, как отмечают авторы (Lage et al., 2003), выше, чем у обычно наблюдаемого для культивируемых гексаплоидных пшениц уровня полиморфизма (12–21 %).

В AFLP-спектрах образцов *×T. cziczinii* преобладают компоненты пшеницы. В результате кластерного анализа полученных результатов установлено, что вид *×T. cziczinii* является промежуточной формой и генетически ближе к роду *Triticum*, чем к роду *Agropyron* (см. рис. 1). Близость вида *×T. cziczinii* к представителям рода *Triticum* подтверждается также данными, полученными в результате анализа электрофоретических спектров глина. Спектры глина *×T. cziczinii* типичны для представителей рода *Triticum*, в них присутствовали также и отдельные компоненты проламинов пырея (Упелник и др., 2012). Такая дифференциация вполне объяснима, ведь при получении *×T. cziczinii* применялись сложные схемы скрещиваний, в том числе возвратные скрещивания с пшеницей, для элиминации нежелательных признаков пырея.

Идентифицированные в настоящем исследовании фрагменты, специфичные для представителей *×T. cziczinii* и изучаемых видов пырея, могут стать основой для создания маркеров, которые будут выявлять интрогрессии генетического материала рода *Agropyron* в геноме представителей *×T. cziczinii*. Это может быть использовано в селекционной работе для отслеживания передачи генетического материала пырея и последующей защиты и идентификации сортов/генотипов синтетического вида.

Поиск маркеров, позволяющих выявлять интрогрессии генетического материала в гибридных видах, был ранее проведен П.Ю. Крупинным с коллегами (2011). В своей

работе они идентифицировали специфичные аллельные варианты для видов рода *Agropyron* и сорта пшенично-пырейного гибрида Истра 1 по шести микросателлитным локусам, отсутствующим у пшеницы. Однако следует заметить, что в это исследование был включен всего один образец ППГ, а размер аллелей микросателлитных локусов (п. н.) пшеницы, использованной авторами для сравнения, был взят из литературных данных.

Образцы ППГ формируют на дендрограмме отдельную группу (см. рис. 1), что, по всей видимости, связано с тем, что у этих гибридов в геноме встречаются отличные от *×T. cziczinii* комбинации хромосом от родительских форм. Однако средний коэффициент сходства между образцами ППГ и образцами мягкой пшеницы сопоставим с таковым между представителями *×T. cziczinii* и образцами мягкой пшеницы (0.790 и 0.794 соответственно). Интересно, что вместе с образцами ППГ кластеризуется и образец ПЭГ (сорт Рубежная), возможно, из-за похожего набора родительских форм пшеницы, использованных для их создания, а также из-за сходства геномов элимуса и пырея.

В результате проведенной оценки внутривидового генетического разнообразия *×T. cziczinii* не было выявлено достоверной дифференциации представителей подвидов *Submitans* и *Perenne* (см. рис. 2). Кроме того, коэффициент генетического сходства между всеми изучаемыми образцами *×T. cziczinii* совпадает со значениями этого показателя, выявленными для образцов внутри каждого подвида. Отметим обособленное положение на графике главных координат (см. рис. 2) образцов 24, 249, 249-1, которые по описанию являются облигатно многолетними формами (см. Материалы и методы). Вероятно, именно эти образцы должны быть отнесены к ssp. *Perenne*. Однолетние отступающие и многолетние образцы 12, 33, 38, 166, 192 и 3П26 располагаются на графике главных координат отдельно от основной группы образцов, состоящей из линий, которые по определенным ботаническим характеристикам, выделенным еще Н.В. Цициным, относятся к разным подвидам (см. рис. 2). Возможным объяснением полученного результата можно считать не окончательно выявленную природу основного признака, по которому эти подвиды разделены, – многолетность. Необходимо проведение дополнительных исследований, направленных на уточнение ботанических, а также генетических параметров, разделяющих изучаемые подвиды.

Таким образом, впервые проведен AFLP-анализ представителей двух подвидов вида *×T. cziczinii* Tsvet. (ssp. *Submitans* и ssp. *Perenne*). Примененные комбинации праймеров позволили выявить и оценить уровень внутривидового полиморфизма ранее не изучавшегося синтетического вида, а также генетические различия с видами рода *Triticum* и *Agropyron*. Определено, что, исходя из структуры генома изучаемого вида, вид *×T. cziczinii* генетически более близок к роду *Triticum*, чем к роду *Agropyron*, что вполне закономерно. Показан низкий уровень дифференциации между представителями двух подвидов. Найдены фрагменты, специфичные для образцов рода *Agropyron* и *×T. cziczinii*. Идентифицированные фрагменты могут стать основой для создания маркеров, которые будут выявлять интрогрессии генетического материала *Agropyron* в геноме представителей *×T. cziczinii*.

Acknowledgements

This work was supported by RAS Presidium Program 41 “Biodiversity of natural systems and bioresources of Russia”, project 0112-2018-0023; and by Governmental contract 118021490111-5 with the State Botanical Garden, Russian Academy of Sciences.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Altinkut A., Kazan K., Gozukirmizi N. AFLP marker linked to water-stress-tolerant bulks in barley (*Hordeum vulgare* L.). Genet. Mol. Biol. 2003;26(1):77-82. DOI 10.1590/S1415-4752003000100013.
- Benbouza H., Jacquemin J., Baudoin J., Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2006;10(2):77-81.
- Colomba M.S., Gregorini A. Genetic diversity analysis of the durum wheat Graziella Ra, *Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn. (Poales, Poaceae). Biodivers. J. 2011;2:73-84.
- Doyle J. DNA protocols for plants. Molecular Techniques in Taxonomy NATO ASI Series. 1991;57:283-293.
- Duarte J.M., Santos J.B.D., Melo L.C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. Genet. Mol. Biol. 1999;22(3):427-432. DOI 10.1590/S1415-47571999000300024.
- El Rabey H.A., Al-Malki A.L., Abulnaja K.O., Ebrahim M.K., Kumosani T., Khan J.A. Phylogeny of ten species of the genus *Hordeum* L. as revealed by AFLP markers and seed storage protein electrophoresis. Mol. Biol. Rep. 2014;41(1):365-372. DOI 10.1007/s11033-013-2870-2.
- Goryunova S.V., Chikida N.N., Kochieva E.Z. AFLP, RAPD, and ISSR analysis of intraspecific polymorphism and interspecific differences of allotetraploid species *Aegilops kotschy* Boiss. and *Aegilops variabilis* Eig. Russ. J. Genetics (Moscow). 2017;53(5):568-575. DOI 10.1134/S1022795417050040.
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Paleontologia Electronica. 2001;4(1):1-9.
- Jensen K.B., Yan X., Larson S.R., Wang R.R.C., Robins J.G. Agrogenomic and genetic diversity in intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). Plant Breed. 2016;135(6):751-758. DOI 10.1111/pbr.12420.
- Kaya H.B., Demirci M., Tanyolac B. Genetic structure and diversity analysis revealed by AFLP on different *Echinochloa* spp. from northwest Turkey. Plant Syst. Evol. 2014;300(6):1337-1347. DOI 10.1007/s00606-013-0965-9.
- Khalighi M., Arzani A., Poursiahbidi M.A. Assessment of genetic diversity in *Triticum* spp. and *Aegilops* spp. using AFLP markers. Afr. J. Biotechnol. 2008;7(5):546-552.
- Khan M.K., Pandey A., Choudhary S., Hakki E.E., Akkaya M.S., Thomas G. From RFLP to DArT: molecular tools for wheat (*Triticum* spp.) diversity analysis. Genet. Resour. Crop Evol. 2014;61(5):1001-1032. DOI 10.1007/s10722-014-0114-5.
- Krupin P.Yu., Divashuk M.G., Fesenko I.A., Karlov G.I. Adaptation of wheat microsatellite SSR-markers for the genome analysis of intermediate wheatgrass, tall wheatgrass, and wheat-wheatgrass hybrids. Izvestiya Timiryazevskoy Selskokhozyaystvennoy Akademii = Proceedings of the Timiryazev Agricultural Academy. 2011;3:49-57. (in Russian)
- Lage J., Warburton M.L., Crossa J., Skovmand B., Andersen S.B. Assessment of genetic diversity in synthetic hexaploid wheats and their *Triticum dicoccum* and *Aegilops tauschii* parents using AFLPs and agronomic traits. Euphytica. 2003;134(3):305-317.
- Lyubimova V.F., Myasnikova A.P., Belov V.I. Cytogenetic study of the perennial wheat forms. Genetics and Breeding of Distant Hybrids. Moscow: Nauka Publ., 1976. (in Russian)
- Sadigov G.B., Trifonova A.A., Kudryavtsev A.M. Genetic diversity in collection of cultivars and varieties of *Triticum durum* Desf. from Azerbaijan. Russ. J. Genetics. (Moscow). 2017;53(5):576-586. DOI 10.1134/S1022795417050088.
- Tsitsin N.V. New species and new varieties of wheat. Byulleten' Glavnogo Botanicheskogo Sada = Bulletin of the Central Botanical Garden. 1960;38:38-41. (in Russian)
- Tsvelev N.N. Conspectus specierum tribus *Triticeae* Dum. familiae Poaceae in flora USSR. Novosti Systematiki Vysshikh Rasteniy = News in Higher Plant Taxonomy. 1973;10:19-59. (in Russian)
- Upel'nik V.P., Belov V.I., Ivanova L.P., Dolgova S.P., Demidov A.S. Heritage of academician N.V. Tsitsin: state-of-the-art and potential of the collection of intermediate wheat × couch-grass hybrids. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(3): 667-674. (in Russian)
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijers M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 1995;23(21):4407-4414.
- Xue Y., Chu L. A rapid identification of barley varieties using DNA-AFLP. J. Institute of Brewing. 2015;121(4):496-501. DOI 10.1002/jib.253.

ORCID ID

A.A. Trifonova orcid.org/0000-0001-9618-5932
K.V. Boris orcid.org/0000-0002-8479-4949
L.V. Dedova orcid.org/0000-0003-1531-8938
V.A. Melnik orcid.org/0000-0001-8677-4354
L.P. Ivanova orcid.org/0000-0002-3466-7263
N.P. Kuzmina orcid.org/0000-0002-2266-4348
S.V. Zagorodnyi orcid.org/0000-0001-8264-4499
V.P. Upel'nik orcid.org/0000-0002-6055-8861

Assessment of genetic diversity of some Siberian and Far Eastern species of the genus *Spiraea* (Rosaceae) by newly developed multiplex panels of nuclear SSR loci

T.A. Poliakova , A.V. Shatokhina, G.N. Bondarenko, D.V. Politov

Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

Taxonomic and population genetic studies of the genus *Spiraea* (Rosaceae) species require new informative genetic markers. We screened 37 previously published heterologous oligonucleotide primer pairs for nuclear microsatellite loci and selected eight polymorphic and most reproducible of them for PCR multiplexing which substantially increases performance of routine mass genotyping. Three multiplex sets of 3, 3 and 2 loci, respectively, were developed and tested for ability to estimate the parameters of genetic variability and population structure in closely related species *Spiraea ussuriensis*, *S. flexuosa*, *S. chamaedryfolia* representing seven natural populations of the Russian Far East and Siberia. Allele number ranged among loci from twelve (*Spth20*) to three. Among 41 alleles found, 7 were unique in some species/populations. Analysis of parameters of genetic variability in *Spiraea* spp. showed similar values of allele number per locus and observed heterozygosity among populations and slightly greater estimates of expected heterozygosity in the samples of *S. flexuosa* ($N_A = 2.387$; $H_O = 0.387 \pm 0.052$; $H_E = 0.540 \pm 0.055$) as compared to *S. ussuriensis* ($N_A = 2.781$; $H_O = 0.385 \pm 0.079$; $H_E = 0.453 \pm 0.072$) and *S. chamaedryfolia* ($N_A = 2.875$; $H_O = 0.331 \pm 0.071$; $H_E = 0.505 \pm 0.069$). The observed values of genetic polymorphism parameters indicate the average level of genetic diversity of the studied species typical to previous studies in *Spiraea*. About 19 % of the observed variability occurred among populations ($F_{ST} = 0.191$) while 81 % of the total genetic variation concentrated within the populations. The loci *VS11*, *VS12*, *VS2*, and *VS6* contributed most to the observed differentiation. Nei genetic distances between populations ranged from 0.049 to 0.585. Genetic differentiation patterns among studied populations based on allele frequencies of nuclear microsatellite loci correspond with their geographical location. Genetic composition of some samples contradicted with their provisional species identification.

Key words: *Spiraea ussuriensis*; *Spiraea flexuosa*; *Spiraea chamaedryfolia*; nuclear microsatellite loci; SSR; multiplex panels; genetic variability; population structure.

Оценка генетического разнообразия некоторых сибирских и дальневосточных видов рода *Spiraea* (Rosaceae) на основе разработанных мультиплексных панелей из ядерных микросателлитных локусов

Т.А. Полякова , А.В. Шатохина, Г.Н. Бондаренко, Д.В. Политов

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

Для таксономических и популяционно-генетических исследований видов рода *Spiraea* (Rosaceae) требуются новые информативные генетические маркеры. Мы протестировали 37 ранее опубликованных гетерологичных пар олигонуклеотидных праймеров для ядерных микросателлитных локусов и отобрали 8, дающих полиморфные продукты амплификации и наиболее воспроизводимых для ПЦР-мультиплексирования, что существенно повышает эффективность рутинного массового генотипирования. Разработаны и апробированы три мультиплексных панели из трех, трех и двух локусов соответственно для оценки параметров генетической изменчивости и структуры популяции у близкородственных видов *Spiraea ussuriensis*, *S. flexuosa* и *S. chamaedryfolia* из семи природных популяций Дальнего Востока и Сибири. Число аллелей варьировало между локусами от двенадцати (в локусе *Spth20*) до трех. У некоторых видов/популяций из 41 выявленного аллеля 7 были уникальными. Анализ параметров генетической изменчивости в *Spiraea* spp. показывает сходные значения числа аллелей на локус и наблюдаемой гетерозиготности между популяциями и немногим более высокий уровень ожидаемой гетерозиготности в выборках *S. flexuosa* ($N_A = 2.387$; $H_O = 0.387 \pm 0.052$; $H_E = 0.540 \pm 0.055$) по сравнению с *S. ussuriensis* ($N_A = 2.781$; $H_O = 0.385 \pm 0.079$; $H_E = 0.453 \pm 0.072$) и *S. chamaedryfolia* ($N_A = 2.875$; $H_O = 0.331 \pm 0.071$; $H_E = 0.505 \pm 0.069$). Выявленные значения параметров генетического полиморфизма свидетельствуют о среднем уровне генетического разнообразия изучаемых видов, характерном для ранее проведенных исследований в роде *Spiraea*. Около 19 % всей изучаемой изменчивости приходится на межпопуляционную ($F_{ST} = 0.191$), в то время как 81 % общей генетической изменчивости сосредоточен в популяциях. Наибольший вклад в исследуемую дифференциацию вносят локусы *VS11*, *VS12*, *VS2*, *VS6*. Генетические расстояния Nei между популяциями варьировали от 0.049 до 0.585.

Генетическая дифференциация исследуемых популяций, основанная на частотах аллелей ядерных микросателлитных локусов, соответствует географическому положению выборок. У некоторых образцов отмечается противоречие между аллельным разнообразием и их предварительной морфологической идентификацией.

Ключевые слова: *Spiraea ussuriensis*; *Spiraea flexuosa*; *Spiraea chamaedryfolia*; ядерные микросателлитные локусы; SSR; мультиплексные панели; генетическая изменчивость; популяционная структура.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Poliakova T.A., Shatokhina A.V., Bondarenko G.N., Politov D.V. Assessment of genetic diversity of some Siberian and Far Eastern species of the genus *Spiraea* (Rosaceae) by newly developed multiplex panels of nuclear SSR loci. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekttsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):654-659. DOI 10.18699/VJ18.407

The study of biological diversity is one of the most important scientific directions in plant genetics. The nuclear microsatellite loci are highly variable codominant molecular markers widely used in population genetic studies, genetic identification of individual genotypes and clones, parentage analysis, and confirmation of the hybridity. The development of multiplex panels consisting of nuclear microsatellite loci is relevant for the genus *Spiraea* due to the complexity in the taxonomic identification of samples, the phenomenon of hybridization and polyploidy, and the clonal nature of the distribution of some species, so the fragment analysis based on the developed multiplex sets can substantially simplify the workflow.

The *Spiraea* species grow in temperate and boreal zones of the Northern Hemisphere. The southern border of the genus range in Asia passes through the Eastern and Northern Himalayas, in America the southern border crosses the Central part of Mexico. The genus *Spiraea* includes more than 100 taxa in the world flora and about 25 taxa in Russia.

There are few researches devoted to the analysis of population-genetic structure of species of *Spiraea* genus, and they are mainly associated with the development of primers for microsatellite analysis of specific species (Brzyski, 2010; Ashizawa et al., 2012; Khan et al., 2014). However, there are no publications on PCR multiplexing and development of multiplex assays for genotyping of *Spiraea* species. The population genetic studies in such species as *Spiraea ussuriensis*, *S. flexuosa*, *S. chamaedryfolia* have been conducted for the first time.

The goal of this research was to assess the genetic diversity of some Siberian and Far Eastern species of the genus *Spiraea* by newly developed multiplex panels of nuclear microsatellite markers able to raise efficiency and optimize population genetic studies, species and clone identification in the *Spiraea* taxa.

Materials and methods

The present study was carried out on 115 samples of *Spiraea* spp. collected by us in seven native stands located in Siberia and the Far East of Russia. While collecting samples, the ability of *Spiraea* to develop clonal offsprings was taken into account. The geographical location, code and sample size for the studied sites are listed below: *S. ussuriensis* – Ussuriysk (uss), Primorsky Krai, Ussuri district, 15 specimens; Ol'ga (olg), Primorsky Krai, Ol'ginsky district, 8 specimens; Gornovodnoye (gorn), Primorsky Krai, Ol'ginsky district, 18 specimens; Zeya (zey), Amurskaya oblast, Zeyskii district,

19 specimens; *S. flexuosa* – Shkotovo (shkt), Primorsky Krai, Shkotovsky district, 23 specimens; Buryat (ul), Buryatia, near Ulan-Ude city, 15 specimens; *S. chamaedryfolia* – Turochak (tur), Altayskiy Krai, Turochakskiy district, 17 specimens.

Total DNA was isolated from herbarium specimens by both the standard CTAB method (Doyle J.J., Doyle J.L., 1990) and the commercial kits for isolation of genomic DNA from plants – GeneJET Mini (Fermentas) and DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), MagMAX DNA Multi-Sample Kit (Invitrogen). The concentration and amount of DNA were measured in 0.8 % agarose gel and spectrophotometrically (NanoPhotometer P-Class P-360, Implen).

First of all, we carried out screening of primers designed for different species of *Spiraea* (Brzyski, 2010; Ashizawa et al., 2012; Khan et al., 2014). All 37 primer pairs previously published were selected for pre-screening. Each primer pair was first tested in a separate PCR following the original protocols. Loci that showed stable amplification were further combined into groups of three or two in order to develop PCR multiplex assays. If it was possible, primers with identical annealing temperature were combined into one set.

From the selected eight pre-screened loci three multiplex assays, each of them amplifying three or two loci, were developed (Table 1). DNA was diluted to a concentration of 10 ng/μl. A total PCR volume of 15 μl, containing 1.5 μl 10×PCR Buffer, 0.75 μl 50 mM MgCl₂, 0.25 μl 10 mM dNTP mix, 1 μM of each primer 5 mM (the forward primer with a fluorescent label, linked to the 5' end; Evrogen, Russia), 0.2 μl 5 u/μl HS Taq DNA Polymerase (Evrogen, Russia), 8.3 μl ddH₂O, and 2 μl 10.0 ng DNA was used. The touchdown PCRs were run on DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) under the following conditions: 15 min of denaturation at 95 °C, 1 min at 94 °C, 1 min at 60–47 °C (temperature of primer annealing decreased in each cycle by 1 °C), 1 min at 72 °C (10 cycles); 1 min at 94 °C, 1 min at 47 °C and 1 min at 72 °C (25 cycles); terminal elongation at 72 °C for 20 min. The PCR products were diluted 1:10 or 1:50 times depending on the product concentration. For fragment analysis, 2 μl of diluted product was combined with 12 μl of total mixture of GeneScan 600 LIZ size standard (5 μl) and HiDi Formamide (190 μl) (Life Technologies). A fragment analysis was carried out on an ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies). Genotyping was performed using GeneMapper 5 software (Life Technologies).

The obtained multi-locus genotypes of the samples were analyzed in the program GenAlEx V.6.5 (Peakall, Smouse, 2012) in order to identify the main parameters of intra-popu-

Table 1. Characteristics of the eight loci used in three multiplex assays

Locus	Dye	Set	Repeat motif	Annealing temperature, °C	Size range, bp	Number of alleles
VS2	HEX	I	(TC) ₁₄	53	86–90	3
VS6	FAM	I	(TG) ₈	47	154–168	3
SA2	ROX	I	(AG) ₁₇	51	134–168	4
VS11	FAM	II	(CAG) ₄	57	146–164	7
<i>Spth16</i>	HEX	II	(AC) ₆ (TC) ₈	54	73–81	3
SA4	ROX	II	(AG) ₁₆	51	116–140	4
VS12	FAM	III	(TGG) ₄	50	166–178	5
<i>Spth20</i>	HEX	III	(AG) ₆ (AC) ₇	60	85–121	12

lation variability (an average and effective number of alleles per locus, expected and observed heterozygosity, inbreeding coefficient, etc.). The genotypes were tested in the program Micro-Checker v.2.2 (Van Oosterhout et al., 2004) in order to identify “null-alleles”. The Ewens-Watterson tests for heterogeneity and for neutrality were made in the program PopGene32 (Yeh et al., 1999). Population genetic structure was inferred from multilocus microsatellite genotypes (K) using the Bayesian clustering algorithm in the program STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). For each number of inferred clusters (K) varied from 2 to 8. Five independent replicas of simulations with the number of iterations equal to 100000 with the previous heating period of 10.000 iterations were performed using the LOCPRIOR = 1 population data binding option. The most probable number of clusters was evaluated in the program Structure Harvester (Earl, von Holdt, 2012) using the method by G. Evanno et al. (2005) based on the selection of K with the highest likelihood ratio with the lowest standard deviation and the maximum increment (parameter DeltaK). Further processing of the results for the most probable K was performed in the program CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson, Rosenberg, 2007) and visualized in the program Distruct (Rosenberg, 2007).

Results

For microsatellite analysis of *Spiraea* species, 37 heterologous microsatellite loci were tested, initially designed to study the genetic variability of the rare North American species *S. virginiana* (Brzyski, 2010), the Japanese species *S. thunbergii* (Ashizawa et al., 2012) and the Asian species *S. alpina* and *S. mongolica* (Khan et al., 2014).

According to the results of testing 37 microsatellite nuclear loci 12 did not show specific amplification, 9 were monomorphic, 8 contained “null-alleles”. Therefore, for further routine genotyping of *Spiraea* samples we selected eight pairs of primers demonstrating good reproducibility, stability and expressed polymorphism. Based on these loci, three multiplex panels (see Table 1) were designed in order to optimize routine by performing fragmented analysis on the capillary sequencer.

The selected loci were used to study the genetic polymorphism and population structure of closely related species *S. ussuriensis*, *S. flexuosa*, *S. chamaedryfolia* from seven Far Eastern and Siberian native populations. All the eight analyzed nuclear microsatellite loci in these *Spiraea* species were polymorphic. Most variable loci were *Spth20* and *VS11*,

12 and 7 alleles, respectively. The remaining loci (*VS2*, *VS6*, *SA2*, *Spth16*, *SA4*, and *VS12*) demonstrated lower allelic richness – from three to five alleles per locus. Among 105 individual specimens included in this study, homozygotes for “null-allele” were not found. A total of 41 allelic variants were identified, 7 alleles (17 %) of which were unique, occurring only in a single population. In the Shkotovsky population four unique alleles were detected. Based on the observed distributions of genotypes, the parameters of interpopulation variability were calculated (Table 2).

Analysis of genetic variability parameters in *Spiraea* spp. showed similar values of allele number per locus and observed heterozygosity among populations and slightly greater estimates of expected heterozygosity in the samples of *S. flexuosa* ($N_A = 2.387$; $H_O = 0.387 \pm 0.052$; $H_E = 0.540 \pm 0.055$) as compared to *S. ussuriensis* ($N_A = 2.781$; $H_O = 0.385 \pm 0.079$; $H_E = 0.453 \pm 0.072$) and *S. chamaedryfolia* ($N_A = 2.875$; $H_O = 0.331 \pm 0.071$; $H_E = 0.505 \pm 0.069$).

The values of the main parameters of genetic polymorphism estimated by us indicated the average level of genetic diversity of the studied *Spiraea* species to be within the limits of the values earlier revealed for populations of *S. virginiana* (Brzyski, 2010), *S. thunbergii* (Ashizawa et al., 2012), *S. alpina* and *S. mongolica* (Khan et al., 2014) for the corresponding loci. The comparison of observed and expected heterozygosity showed that all the loci indicated a deficit of heterozygous genotypes within samples (positive values of F_{IS}) for most of the studied microsatellite loci, except for the locus *Spth16*, which revealed a slight excess of heterozygotes (Table 3). Most genotype distributions within individual populations demonstrated also deficiency of heterozygotes (see Table 2). The Buryat population of *S. flexuosa* ($F = 0.371$) and the Turochak population of *S. chamaedryfolia* ($F = 0.340$) were distinguished by the increased values of Wright’s fixation index, which can be explained by the low population sizes of these species, as well as by the probable self-pollination and/or consanguineous matings leading to a high degree of inbreeding. These observations showed the species of the genus *Spiraea* to be often reproduced not only sexually, but also through the root offspring. Thus, the observed deficit of heterozygotes may be caused by closely related crosses and vegetative reproduction prevailing in the species of section *Chamaedryon*.

The study of the population structure of the selected species of *Spiraea* using Wright’s F -statistics (see Table 3) detected in

Table 2. Parameters of *Spiraea* genetic variability

Population code	N_A	N_E	H_O	H_E	F
uss	2.625	2.047	0.425 ± 0.079	0.466 ± 0.072	0.094
olg	2.000	1.679	0.297 ± 0.097	0.339 ± 0.083	0.156
gorn	3.000	2.005	0.396 ± 0.087	0.455 ± 0.072	0.144
zey	3.500	2.743	0.421 ± 0.054	0.561 ± 0.060	0.231
Average values for <i>S. ussuriensis</i>	2.781	2.119	0.385 ± 0.079	0.453 ± 0.072	0.156
shkt	3.750	2.488	0.424 ± 0.035	0.562 ± 0.050	0.231
ul	2.875	2.286	0.350 ± 0.069	0.518 ± 0.059	0.371
Average values for <i>S. flexuosa</i>	3.313	2.387	0.387 ± 0.052	0.540 ± 0.055	0.301
tur	2.875	2.265	0.331 ± 0.071	0.505 ± 0.069	0.390
Average values for all populations	2.946 ± 0.184	2.216 ± 0.112	0.378 ± 0.027	0.487 ± 0.026	0.239 ± 0.039

Note. N_A – average number of alleles per locus; N_E – effective number of alleles; H_O – observed heterozygosity; H_E – expected heterozygosity; F – fixation index.

individuals of *Spiraea* spp. populations a 24 % deficit of heterozygotes ($F_{IS} = 0.242$) relative to the population and about 38 % being a deficit of heterozygous genotypes ($F_{IT} = 0.383$) relative to the species *S. chamaedryfolia* s.l. About 19 % of the total observed variability resulted from interpopulation variation ($F_{ST} = 0.191$). 81 % of all genetic polymorphism was concentrated within populations.

The loci with maximum differentiation of these populations were: *VS11*, *VS12*, *VS2*, and *VS6*. The test for heterogeneity of allele frequencies in geographically close samples from the Primorsky territory “olg” and “gorn” revealed significant differences between samples in allele frequencies in three loci: *VS11*, *VS2* and *SA4*, as well as in general (Table 4).

Based on the frequencies of alleles of the studied nuclear microsatellite loci the differentiation of the studied *Spiraea* spp. samples was analyzed. The standard genetic distances between populations range from 0.049 to 0.585. In general, genetic differentiation within the investigated populations corresponds to their geographical remoteness from each other.

Table 3. Values of Wright's F -statistics

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>VS11</i>	0.040	0.372	0.346
<i>VS12</i>	0.411	0.564	0.259
<i>VS2</i>	0.467	0.583	0.217
<i>VS6</i>	0.184	0.412	0.280
<i>Spth20</i>	0.323	0.454	0.194
<i>Spth16</i>	–0.051	–0.026	0.024
<i>SA2</i>	0.268	0.295	0.037
<i>SA4</i>	0.293	0.414	0.172
Average	0.242 ± 0.063	0.383 ± 0.067	0.191 ± 0.040

Note. F_{IS} – the inbreeding coefficient of an individual relative to the subpopulation to which it belongs; F_{IT} – the inbreeding coefficient of an individual relative to the whole population; F_{ST} – the coefficient of inbreeding of the subpopulation relative to the entire subdivided population.

Table 4. The results of the test for heterogeneity of allele frequencies in the populations “olg” and “gorn” of *S. ussuriensis* on the studied SSR loci

Locus	Value of χ^2	Number of degrees of freedom	Probability	Significance level
<i>VS11</i>	7.1633	1	0.0074	**
<i>VS12</i>	5.8196	3	0.1207	NS
<i>VS2</i>	11.2254	2	0.0037	**
<i>VS6</i>	0.8432	1	0.3585	NS
<i>Spth20</i>	10.2716	5	0.0679	NS
<i>Spth16</i>	0.9489	2	0.6222	NS
<i>SA2</i>	0.2941	2	0.8633	NS
<i>SA4</i>	28.5278	2	0.0000	***
In general	65.0938	18	0.0000	***

Note. The statistical significance of allele frequency shifts as determined by heterogeneity test is indicated by asterisks; p – the significance level; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS – not significant at the 5 % level.

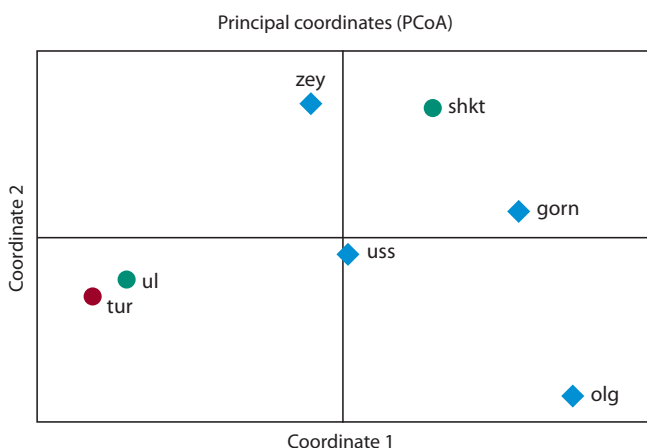


Fig. 1. Projection of the studied *Spiraea* populations on the two-coordinate system according to the PCoA-analysis of the Nei genetic distances matrix.

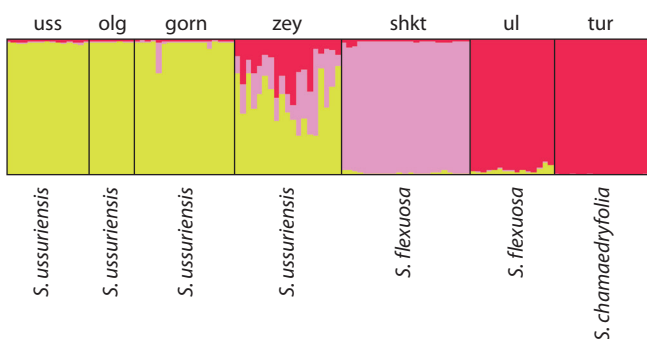


Fig. 2. Analysis of the population structure of *S. chamaedryfolia* s.l. with the assumed number of genetic clusters $K = 3$.

The Turochak and Buryat populations (the genetic distance is 0.049) were characterized by the lowest genetic differences. Previously, we showed strong affinity of *S. flexuosa* and *S. chamaedryfolia* species by morphological features. Analysis of genetic distances using multidimensional scaling (PCoA) demonstrated genetic differentiation of populations under the study (Fig. 1). Corresponding to their mutual geographical location, a grouping of samples with each other was observed. Based on the results of the main coordinates analysis two groups can be distinguished; one – more Western – combining the samples “tur” and “ul” from Altai and Buryatia, which belong to different species *S. chamaedryfolia* and *S. flexuosa*, respectively; while the second Eastern one was differentiated not so clearly and included the Far Eastern samples of *S. flexuosa* and *S. ussuriensis*. The samples of “shkt” population of *S. flexuosa* were among the populations of *S. ussuriensis*.

The analysis of population structure was also conducted in the program STRUCTURE v. 2.3.4 on the basis of multilocus genotypes. The most probable number of initial genetic clusters $K = 3$ was calculated corresponding to the provisional species – *S. chamaedryfolia*, *S. flexuosa*, *S. ussuriensis*. The identified clusters contribution to genotypes of populations and individuals as well as the distribution of individuals by population are visualized using different colors (Fig. 2). Taking into account the designation of clusters 1, 2 and 3 (K1, K2,

K3), colors are yellow, pink and red, respectively. It is possible to note a clear predominance in the studied samples of *S. ussuriensis* genetic cluster K1, and K1 represents the most of the gene pool of *S. ussuriensis* from Primorsky Krai. In the “zey” sample from the Amur region, along with the predominance of K1, K2 and K3 clusters make a significant contribution to all individuals in the population. Genetic cluster K2 dominates the sample “shkt” *S. flexuosa* from Primorsky Krai. Cluster K3 prevails in samples “tur” and “ul” from Altai and Buryatia belonging to different species – *S. chamaedryfolia* and *S. flexuosa*, respectively, and slightly represented in all the other samples. The content of the genetic cluster K1 in small quantities is shown in samples *S. flexuosa* – “shkt” and “ul”.

Discussion

The values of the main parameters of genetic polymorphism established by us indicated the average level of genetic diversity of the studied populations of *Spiraea* in the investigated regions and were within the same range as of similar values estimated for populations *S. virginiana* (Brzyski, 2010), *S. thunbergii* (Ashizawa et al., 2012), *S. alpina* and *S. mongolica* (Khan et al., 2014). A higher level of interpopulation variability (37.3 %) was observed in *S. prunifolia* for *simpliciflora* from Korea on the basis of analysis of ISSR repeats (Huh, 2009), and the highest (73.7 %) of the studied one – in *S. alpina* from the Tibetan upland in Central Asia based on variability of *trnL-trnF* sequences of chloroplast DNA (Zhang et al., 2012).

A similar pattern of heterogeneous structure of populations of species close to *S. chamaedryfolia* s.l. was shown by us earlier on a combination of morphological characteristics (Polyakova, 2004). *S. chamaedryfolia*, *S. flexuosa* and *S. ussuriensis* were not significantly different in morphometric characteristics meanwhile weak ones being distinguishable qualitative (within such features as: degree of the pubescence of the abaxial part of the leaf, the shape of the axillary buds, color of shoots, the nature of “jagged” edges of the leaf blade). Almost all signs of intermediate forms between these species have been found. The clustering of populations of these species by morphological features showed a single, structurally heterogeneous group. Most likely, it is necessary to consider these samples as one species – *S. chamaedryfolia*. A small number of relatively reliable indicators-discriminators in *S. flexuosa* and *S. ussuriensis* indicate their intraspecific rank. Probably, a separate taxonomic status should be considered for coastal populations of *S. flexuosa* and *S. ussuriensis* (*S. flexuosa* from the samples of population “shkt” formed a separate genetic cluster K2). The hybrids of *S. ussuriensis* with another close species *S. elegans* were described by A.I. Pojarkova (1939). According to the morphological characteristics of the hybrids such specimens were found by us in various parts of the Amur region. Probably, individuals from the population “zey” of *S. ussuriensis* from the Amur region have a hybrid origin, as indicated by the combination of contributions of different genetic clusters to this population (see Fig. 2).

Thus, the developed multiplex panels of eight nuclear microsatellite loci made it possible to study the genetic variability and population structure of close relatives of *S. chamaedryfolia* s.l., suggest hybrid origin of some specimens and populations. For the most accurate decisions on subspecies structure

of the *S. chamaedryfolia* s.l. complex and about the distribution of certain taxonomic units and the composition of genetically heterogeneous populations analysis of ecological, morphological and genetic data is required as well as samples should be more representative.

Acknowledgements

This study was conducted with financial support of Russian Fund of Basic Research (Project No. 15-04-03093, leader T.A. Poliakova), and also by the Program of Fundamental Researches of the Presidium of Russian Academy of Sciences No. 32 “Evolution of the organic world. The role and influence of planetary processes” (No. 0112-2018-0027 “The study of genetic mechanisms of evolution at the genomic and organismal level: the role of hybridization, the effects of global environmental change”); Program No. 41 “Biodiversity of natural systems and biological resources of Russia” (No. 0112-2018-0025), and Project No. 0112-2016-0002 “Research of gene pools and population-genetic structure of animals, plants and humans” from Russian State Budget (coordinator D.V. Politov).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ashizawa K., Kimura M.K., Takahashi A., Lian Ch., Kuramoto N. Development of microsatellite markers in a riparian shrub, *Spiraea thunbergii* (Rosaceae). *Am. J. Bot.* 2012;99(7):e283-e285. DOI 10.3732/ajb.1100587.
- Brzyski J.R. Isolation and characterization of microsatellite markers in the rare clonal plant, *Spiraea virginiana* (Rosaceae). *Am. J. Bot.* 2010;97:e20-e22. DOI 10.3732/ajb.1000008.
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990;12:12-15.
- Earl D.A., von Holdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 2012;4:359-361. DOI 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14:2611-2620. DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Huh M.K. Genetic diversity and population structure of *Spiraea prunifolia* for. *simpliciflora* by inter-simple sequence repeats. *J. Life Sci.* 2009;19,9:1183-1189.
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics.* 2007;23(14):1801-1806. DOI 10.1093/bioinformatics/btm233.
- Khan G., Zhang F., Gao Q., Jiao X., Fu P., Xing R., Zhang J., Chen S. Isolation of 16 microsatellite markers for *Spiraea alpina* and *S. mongolica* (Rosaceae) of the Qinghai-Tibet Plateau. *Appl. Plant Sci.* 2014;2(1):e1-e4. DOI 10.3732/apps.1300059.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics.* 2012;28:2537-2539. <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>.
- Pojarkova A.I. *Spiraeoideae* Agardh. Flora of SSSR. Ed. V.L. Komarov. Moscow; Saint-Petersburg: Academy of Sciences of USSR Publ. 1939;9:279-318.
- Polyakova T.A. Vnutrividovaya izmenchivost' dal'nevostochnyh i sibirskih vidov roda *Spiraea* L. Novosibirsk, 2004. (in Russian)
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155:945-959.
- Rosenberg N.A. DISTRICT: a program for the graphical display of population structure. Publishers of Center for Computational Medicine and Biology. Department of Human Genetics. University of Michigan, 2007. <http://rosenberglab.bioinformatics.med.umich.edu/district.html>.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 2004;4:535-538. DOI 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. POPGENE Version 1.31. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. 1999; available at <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>.
- Zhang F.-Q., Gao Q.-B., Zhang D.-J., Duan Y.-Z., Li Y.-H., Fu P.-C., Xing R., Gulzar K., Chen S.-L. Phylogeography of *Spiraea alpina* in the Qinghai-Tibetan Plateau inferred from chloroplast DNA sequence variations. *J. Syst. Evol.* 2012;50(4):276-283. DOI 10.1111/j.1759-6831.2012.00194.x.

ORCID ID

T.A. Poliakova orcid.org/0000-0002-8258-127X
A.V. Shatikhina orcid.org/0000-0003-1573-478X
G.N. Bondarenko orcid.org/0000-0002-2172-7634

Ethylene and expansin biosynthesis related genes polymorphism in local apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars from VIR Collection of plant genetic resources

I.N. Shamshin¹✉, A.V. Shlyavas², A.A. Trifonova³, K.V. Boris³, A.M. Kudryavtsev³

¹ Michurinsk State Agrarian University, Michurinsk, Russia

² Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

At Pushkin and Pavlovsk Laboratories of the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) a diverse collection of local apple cultivars is maintained. Some of the cultivars are widely used in breeding programs for their ecological plasticity, increased adaptation to abiotic stress and disease resistance, still there have been no large-scale studies of these local cultivars for fruit storage ability. Fruit softening during storage is an important problem for apple production. Retention of desirable firmness after prolonged storage is one of the key requirements for new apple cultivars. Expansin and ethylene biosynthesis related genes are known to be involved in control of fruit softening in apple, and gene specific molecular markers have been reported. In this study the polymorphism and allelic configuration of ethylene and expansin biosynthesis related genes *Md-ACS1*, *Md-ACO1* and *Md-Exp7* involved in control of fruit softening in 87 local apple cultivars from VIR Collection of Plant Genetic Resources were analyzed. PCR markers *Md-ACS1*, *Md-ACO1* and SSR-marker *Md-Exp7* were used in the study. The allele frequencies in the collection generally coincided with the data from previous studies. *Md-ACS1* allele 2 associated with reduced ethylene production was found only in three local cultivars, while all the studied local cultivars were heterozygous for the *Md-ACO1* locus, as well as most modern Russian apple cultivars. Half of the studied local cultivars were heterozygous for *Md-Exp7* (198:202). Thirteen local cultivars with rare *Md-Exp7* alleles (206, 210 and 212) were detected. No association was found between the *Md-Exp7* genotype and the cultivars' maturation time. The obtained results can be used for additional evaluation of the cultivars' potential for breeding.

Key words: apple; local cultivars; ethylene production; expansin; fruit softening; marker assisted breeding.

Полиморфизм генов биосинтеза этилена и экспансина у местных и стародавних сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.) из коллекции генетических ресурсов растений ВИР

И.Н. Шамшин¹✉, А.В. Шлявас², А.А. Трифонова³, К.В. Борис³, А.М. Кудрявцев³

¹ Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

³ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

В Пушкинских и Павловских лабораториях Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) представлена коллекция разнообразных местных и стародавних сортов яблони. Некоторые из них широко используются в селекционных программах благодаря экологической пластичности, повышенной устойчивости к абиотическому стрессу и болезням, однако масштабных исследований лежкости плодов у местных и стародавних сортов не проводилось. Лежкость плодов является важной проблемой для производителей. Сохранение твердости плодов во время длительного хранения – одно из ключевых требований, предъявляемых к новым сортам яблони. Показано, что гены биосинтеза этилена и экспансина вовлечены в контроль лежкости у яблони, разработаны специфичные молекулярные маркеры для этих генов. В настоящем исследовании проведен анализ аллельного разнообразия генов биосинтеза этилена и экспансина *Md-ACS1*, *Md-ACO1* и *Md-Exp7*, вовлеченных в контроль лежкости плодов у 87 местных и стародавних сортов яблони из коллекции генетических ресурсов растений ВИР. Были использованы ПЦР-маркеры *Md-ACS1*, *Md-ACO1* и SSR-маркер *Md-Exp7*. Частоты аллелей в изученной коллекции в целом совпадали с данными предыдущих исследований. Аллель 2 гена *Md-ACS1*, определяющий сниженный уровень синтеза этилена, был выявлен только у трех образцов, в то время как все изученные местные и стародавние сорта были гетерозиготны по локусу *Md-ACO1*, так же как и большинство изученных ранее современных отечественных сортов яблони. Половина проанализированных образцов были гетерозиготны по локусу *Md-Exp7* (198:202). Выявлено 13 местных и стародавних сортов, несущих редкие аллели гена *Md-Exp7* (206, 210 и 212). Не было обнаружено связи между сочетанием аллелей гена *Md-Exp7* и временем созревания изученных сортов. Полученные результаты могут быть использованы при дополнительной оценке потенциала изученных генотипов яблони для селекции.

Ключевые слова: яблоня; местные и стародавние сорта; синтез этилена; экспансин; лежкость плодов; маркер-ассоциированная селекция.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shamshin I.N., Shlyavas A.V., Trifonova A.A., Boris K.V., Kudryavtsev A.M. Ethylene and expansin biosynthesis related genes polymorphism in local apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars from VIR Collection of plant genetic resources. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):660-666. DOI 10.18699/VJ18.408

Received 28.04.2018

Accepted for publication 08.07.2018

© AUTHORS, 2018

Apple is a climacteric fruit that needs special postharvest handling to provide year-round high-quality apples to consumers. Shelf life – one of the key characteristics of apple cultivars – is limited by loss of firmness during storage and transportation, known as fruit softening. Shelf life depends not only on growing methods, harvesting time and successful application of postharvest technologies but also on the genetic basis of a cultivar. Firmness at harvest and after storage varies greatly among apple cultivars (Bratilova et al., 2015). Retention of desirable firmness after prolonged storage is one of the key requirements for new cultivars. Apple genotypes with prolonged storage time have always been of great interest to breeders, and DNA markers are widely used to study the genetic potential of *Malus* germplasm for breeding purposes. Today, in studies of fruit softening in Russian and international apple germplasm collections, ethylene and expansin biosynthesis related genes markers are widely used (Nybom et al., 2013; Suprun, Tokmakov, 2013; Savel'ev et al., 2014a, b; Shamshin, Savelieva, 2014).

Fruit ripening is controlled by internal ethylene concentration that plays an important role in apple softening and is associated with a rapid rise in ethylene production. Ethylene biosynthesis in plants is controlled by two enzymes: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACC synthase (ACS) (EC 4.4.1.14)) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO (EC 1.14.17.4)) that belong to large gene families. The two most well-studied genes encoding these enzymes in *M. domestica* are *Md-ACS1* (LG 15) and *Md-ACO1* (LG10) (Sunako et al., 1999; Harada et al., 2000; Oraguzie et al., 2004, 2007; Costa et al., 2005). Two alleles have been identified in the *Md-ACO1* locus: the cultivars homozygous for low ethylene allele 1 (525 bp) show better firmness retention than heterozygous cultivars and cultivars homozygous for allele 2 (587 bp) (Costa et al., 2005, 2010; Zhu, Barritt, 2008). Two alleles were also reported for the *Md-ACS1* locus (Harada et al., 2000; Oraguzie et al., 2004, 2007; Nybom et al., 2008; Zhu, Barritt, 2008). Allele 2 (655 bp) is associated with a reduced ethylene production while allele 1 (489 bp) results in normal ethylene production. Of these two loci, *Md-ACS1* appears to have the strongest effect on fruit storage (Nybom et al., 2013).

Expansins are the proteins involved in disruption of the non-covalent bonds between the hemicellulose matrix and the cellulose microfibril of a cell wall during fruit softening (Costa et al., 2008). A functional marker was developed based on the microsatellite motif within the untranslated region of expansin gene *Md-Exp7* (LG1) (Costa et al., 2008). The allelic composition of studied apple cultivars for the SSR marker was associated with differences in fruit softening: 198 bp (best firmness retention), 202 bp (intermediate) and 214 bp (worst) (Costa et al., 2008). Later screening of apple cultivars and species collections revealed some rare *Md-Exp7* alleles with unknown effect on fruit softening (Nybom et al., 2012, 2013; Savel'ev et al., 2014b).

These markers were used to study the allelic diversity of the *Md-ACS1*, *Md-ACO1* and *Md-Exp7* genes in different apple germplasm collections, including modern Russian apple cultivars and other species of genus *Malus* (Zhu, Barritt, 2008; Nybom et al., 2012, 2013; Suprun, Tokmakov, 2013; Savel'ev et al., 2014a, b; Shamshin, Savelieva, 2014). However, their

predictive power had turned out to be rather low (Nybom et al., 2013).

VIR collection of plant genetic resources is one of the most diverse and interesting in the Russian Federation and includes many varieties, forms and species of genus *Malus*. At Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR many local apple cultivars from Russia (distributed throughout the country and regional), Eastern and Western Europe, the Baltic countries and Scandinavia are present. This collection had never been previously involved in large-scale studies using DNA markers, although, some of the cultivars are widely used in breeding programs for their ecological plasticity, increased adaptation to abiotic stress and disease resistance, which makes a search for new donors of valuable traits among them a worthy affair.

The aim of this work was to study genetic diversity and allelic configuration of the ethylene and expansin biosynthesis genes (*Md-ACS1*, *Md-ACO1* and *Md-Exp7*) involved in control of fruit softening in local apple cultivars from the *ex situ* collection of Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR.

Materials and methods

The plant material was obtained from Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR. The collection comprised 89 accessions, including 87 local apple cultivars and 2 reference cultivars. All the names of the accessions together with their catalogue numbers can be found in Table.

Total genomic DNA was extracted from the fresh leaves using the Qiagen DNeasy Plant Mini Kit following the manufacturers' protocols.

The sequences of the *Md-ACS1* and *Md-ACO1* primers and the relative PCR conditions were reported by T. Harada et al. (2000) and F. Costa et al. (2005) respectively, and the sequences of the *Md-Exp7* SSR primers and the relative PCR conditions were reported by F. Costa et al. (2008): *Md-ACO1*f 5'-TCCCCCAATGCACCACTCCA-3'; *Md-ACO1*r 5'-GATTCCTTGGCCTTCATAGCTTC-3'; *Md-ACS1*f 5'-AGAGAGATGCCATTTTGTTCGTAC-3'; *Md-ACS1*r 5'-CCTACAAACTTGCCTGGGGATTATAAGTGT-3'; *Md-Exp7*f 5'-(Fam) CATAGAAGGTGGCATGAGCA-3'; *Md-Exp7*r 5'-TTTCTCCTCACACCCAAACC-3'.

PCR reactions were performed in T100 Thermal Cycler (BioRad) in a final mix of 15 µl containing 20 ng of genomic DNA, 0.25 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer, 1 U of Taq polymerase and 1.5 µl of 10x PCR-buffer (all components produced by DIALAT (Russia)), using the allele specific primers manufactured by Evrogen (Russia).

The PCR products with *Md-ACS1* and *Md-ACO1* primers were separated on a 2 % agarose gel, stained with ethidium bromide and evaluated on a UV-light box, using GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Md-Exp7 SSR analysis of labeled amplification products was performed by capillary electrophoresis on ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer, (Thermo Fisher Scientific). The results were analyzed using GeneMapper v4.1 (Thermo Fisher Scientific).

Results

For all the studied accessions, stable, clearly reproducible results were obtained from the three markers, and reference cultivars with known *Md-ACS1*, *Md-ACO1* and *Md-Exp7*

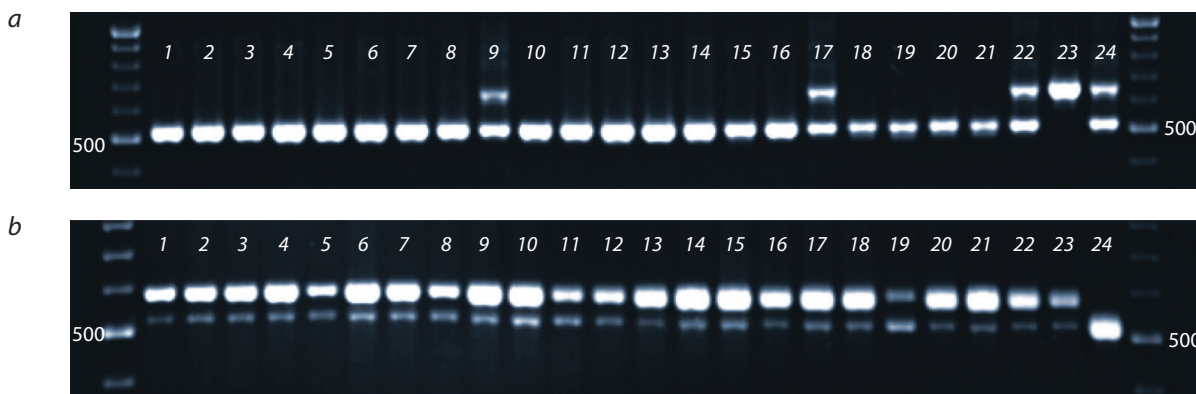
Analyzed apple cultivars

Local cultivars	Catalogue number	Maturation time*	Allelic configuration		
			ACS1	ACO1	EXP7
Anis Seryj	43	A	1/1	1/2	198:202
Anis Shaczkiy	15358	A	1/1	1/2	202
Anisovka	47	A	1/2	1/2	198
Antonovka Monastyrskaya	68	A	1/1	1/2	198:202
Antonovka Obyknovennaya	74	W	1/1	1/2	198:202
Antonovka Obyknovennaya	21190	W	1/1	1/2	198:202
Antonovka Obyknovennaya	711	W	1/1	1/2	198:202
Antonovka Rzhavaya	31709	W	1/1	1/2	198:202
Arkad Krasnyj	31708	S	1/1	1/2	202
Arkad Letnij Zheltyj	140	S	1/1	1/2	198:202
Ahlebinsk Pozdnee	25247	A	1/1	1/2	202
Bashkirskiy Krasavec	185	S	1/1	1/2	198:202
Beloe Osennee ot Ryzhego	23976	A	1/1	1/2	198
Naliv Belyj	1011	S	1/1	1/2	198:202
Bel' Chernyshevskaya	25211	A	1/1	1/2	198:202
Berezovka ot Isakova	24476	A	1/2	1/2	198:210
Borovinka	276	A	1/1	1/2	202:210
Borovinka Akulovskaya	38174	A	1/1	1/2	198:202
Borovinka Ivancovskaya	24781	A	1/1	1/2	198:202
Borovinka Moguchaya	25230	A	1/1	1/2	198:202
Buhovka	38211	A	1/1	1/2	198:202
Vargul'	350	A	1/1	1/2	202
Vinnoe	375	S	1/1	1/2	198:202
Voskovoe Prevoshodnoe	20343	W	1/1	1/2	198:202
Voskovoe Stepino	31711	A	1/1	1/2	198:202
Vydubetskaya Plakuchaya	31722	W	1/1	1/2	198
Golubok Kryugera	12247	A	1/1	1/2	198:202
Gravenshtejnskoe Russkoe	444	S	1/1	1/2	198:202
Grushovka Grebnickogo	20284	S	1/1	1/2	198:206
Grushovka Revel'skaya	10128	A	1/1	1/2	198:202
Grushovka Yudicheva	24484	A	1/1	1/2	202
Delyukinskoe	24470	A	1/1	1/2	198
Dynnoe	566	S	1/1	1/2	198:202
Zelenoe Knyazheskoe	25259	W	1/1	1/2	198:202
Zimnee ot Berdashkevicha	25234	W	1/1	1/2	202
Zimnee Uchkhozovskoe	23975	W	1/1	1/2	202:210
Kal'vil' Belyj Letnij	658	S	1/1	1/2	198
Kal'vil' Oranzhevyj	10134	A	1/1	1/2	198:202
Korichnoe Ananasnoe	29	A	1/1	1/2	198:202
Korichnoe Beloe	25257	A	1/1	1/2	198
Korichnoe Polosatoe	805	A	1/1	1/2	198:202
Korobovka	811	S	1/1	1/2	202
Korobovka Novaya	31726	A	1/1	1/2	202
Korolevskoe	21188	A	1/1	1/2	198:202
Lavia	21179	S	1/1	1/2	198

End of Table

Local cultivars	Catalogue number	Maturation time*	Allelic configuration		
			ACS1	ACO1	EXP7
Lajzanskoe Zimnee	20333	W	1/1	1/2	202
Letnee Rannee	25222	S	1/1	1/2	198:202
Limonovka	24782	A	1/1	1/2	198:202
Litovskoe Saharnoe	15391	S	1/1	1/2	198:202
Majskoe ot Ryzhego	23973	A	1/1	1/2	198:202
Mamutovskoe	15354	A	1/1	1/2	202:210
Medovoe ot Verevkina	20275	S	1/1	1/2	198
Mestnoe Lezhkoe	20281	W	1/2	1/2	202:210
Naliv Dymchatyj	24773	S	1/1	1/2	202
Nalivnoe Yantarnoe	1025	S	1/1	1/2	198:202
Novgorodchina	25217	S	1/1	1/2	202
Osennee Polosatoe	1083	A	1/1	1/2	198:202
Osennij Kvas	25255	A	1/1	1/2	198
Pajdeskoe Zimnee	1112	A	1/1	1/2	198
Papirovka	38223	S	1/1	1/2	202
Pestrushka	24774	S	1/1	1/2	202
Plodovitka Rannyaya	1216	S	1/1	1/2	198:202
Ponyavinskoe	1233	W	1/1	1/2	198:202
Putivka	25233	A	1/1	1/2	198:212
Pyl'tsamaaskoe Zimnee	20309	W	1/1	1/2	198:202
Rannyaya Pytalova	25254	S	1/1	1/2	198:202
Raspisnoe	10126	S	1/1	1/2	198:206
Rozovka	21194	S	1/1	1/2	198:202
Rozovka ot Ryzhego	23972	S	1/1	1/2	202
Severnyj Velikan	1503	W	1/1	1/2	206:210
Seyanec Trebu	433	A	1/1	1/2	198:202
Sladkoe Zimnee	21195	W	1/1	1/2	202
Slivochnoe	1573	A	1/1	1/2	198:202
Sujslepiskoe	1626	S	1/1	1/2	202
Tellisaare	1654	W	1/1	1/2	202:210
Terent'evka	12309	A	1/1	1/2	202
Titovka	1667	A	1/1	1/2	202
Titovka klon	21196	A	1/1	1/2	198:202
Tyushkinskoe Krasnoe	10133	A	1/1	1/2	198:202
Fedorovskoe	24489	A	1/1	1/2	198:210
Chernoguz	14495	A	1/1	1/2	198
Chernoje Derevo	1766	W	1/1	1/2	198:202
Chulanovka	1774	S	1/1	1/2	198:202
Shelkovka	1809	S	1/1	1/2	202:206
Shtrejfling Krasnyj	25196	A	1/1	1/2	202
Yablonya Dobrynicheva	24487	A	1/1	1/2	198:202
Yalkarnan Kesa	20311	S	1/1	1/2	202:210
Reference cultivars					
Fuji			2/2	1/1	202
Granny Smith			1/2	1/2	198:202

* S – summer; A – autumn; W – winter.



Md-ACS1 (a) and *Md-ACO1* (b) polymorphisms detected in the studied local apple cultivars.

a: 1 – Anis Seryi; 2 – Anis Ahaczki; 3 – Vargul'; 4 – Vinnoe; 5 – Voskovoe Prevoshodnoe; 6 – Voskovoe Stepino; 7 – Vydubeckaya Plakuchaya; 8 – Gravenshteinskoe Russkoe; 9 – Anisovka; 10 – Grushovka Grebnickogo; 11 – Grushovka Revel'skaya; 12 – Grushovka Yudicheva; 13 – Delyukinskoe; 14 – Dynnoe; 15 – Zelenoe Knyazheskoe; 16 – Zimnee Uchkhozovskoe; 17 – Berezovka ot Isakova; 18 – Kal'vil' Belyj Letnij; 19 – Kal'vil' Oranzhevyj; 20 – Korichnoe Ananasnoe; 21 – Korichnoe Beloe; 22 – Mestnoe Lezhkoe; 23 – Fuji; 24 – Granny Smith.

b: 1 – Borovinka Moguchaya; 2 – Buhovka; 3 – Vargul'; 4 – Vinnoe; 5 – Voskovoe Prevoshodnoe; 6 – Voskovoe Stepino; 7 – Vydubeckaya Plakuchaya; 8 – Golubok Kryugera; 9 – Gravenshteinskoe Russkoe; 10 – Grushovka Grebnickogo; 11 – Grushovka Revel'skaya; 12 – Grushovka Yudicheva; 13 – Delyukinskoe; 14 – Dynnoe; 15 – Zelenoe Knyazheskoe; 16 – Zimnee ot Bardashkevicha; 17 – Zimnee Uchkhozovskoe; 18 – Kal'vil' Belyj Letnij; 19 – Kal'vil' Oranzhevyj; 20 – Korichnoe Ananasnoe; 21 – Korichnoe Beloe; 22 – Korichnoe Polosatoye; 23 – Granny Smith; 24 – Fuji.

genotypes were used to confirm the results (see Table, Figure, a and b).

***Md-ACS1* and *Md-ACO1* loci.** Analysis of the *Md-ACS1* locus polymorphism of 87 local apple cultivars from the collection allowed to identify two known alleles: *Md-ACS1*-1 (489 bp) and *Md-ACS1*-2 (655 bp). Eighty four samples were homozygous for the *Md-ACS1*-1 allele, while only three samples – Anisovka (47), Berezovka ot Isakova (24476) and Mestnoe Lezhkoe (20281) – were heterozygous for this locus (see Figure, a). Among the samples studied, no homozygotes for the *Md-ACS1*-2 allele were found.

All the studied local cultivars were heterozygous for the *Md-ACO1* locus and carried alleles *Md-ACO1*-1 (525 bp) and *Md-ACO1*-2 (587 bp) (see Figure, b). No homozygous samples were identified from these alleles.

***Md-Exp7* locus.** Microsatellite marker *Md-Exp7* allowed to identify five alleles in the studied samples (198, 202, 206, 210, 212). Alleles 198 and 202 bp were the most common in the studied cultivars. In 44 local cultivars a combination of 198:202 alleles was detected, 19 local cultivars were homozygous for allele 202, 11 local cultivars – for allele 198 provided that the studied samples do not have any undetected allele. The presence of three rare alleles (206, 210, 212 bp) was detected in 13 local cultivars studied. So, allele 210 was identified in nine local cultivars, allele 206 – in four, and allele 212 – in one cultivar (see Table).

Discussion

***Md-ACS1* and *Md-ACO1* loci.** In our study of 87 local apple cultivars from the collection of Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR the *Md-ACS1* allele 2, associated with low ethylene production, was very rare. We identified only three heterozygous genotypes *Md-ACS1*-1/2 (Anisovka, Berezovka ot Isakova and Mestnoe Lezhkoe), while the remaining 84 local cultivars were homozygous for allele 1 (see Table).

In the previous screening of old and modern apple cultivars collection, out of 127 studied cultivars only eight were homo-

zygous for *Md-ACS1* allele 2, while 46 cultivars were heterozygous and 73 – homozygous for allele 1 (Nyblom et al., 2013). In contrast, of 60 cultivars/selections from Washington State University apple breeding program, 28 were homozygous for allele 2, 27 were heterozygous, and 5 – homozygous for allele 1 (Zhu, Barritt, 2008).

The results reported for 48 modern Russian apple cultivars showed that 19 cultivars were heterozygous for the *Md-ACS1* locus, and 17 and 8 cultivars were homozygous for alleles 1 and 2 respectively (Suprun, Tokmakov, 2013). Among 72 apple cultivars from the collection of Michurin All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Fruit Crops only nine Russian cultivars had the *Md-ACS1*-1/2 genotype and no homozygotes for allele 2 were detected (Savel'ev et al., 2014a).

It was reported that relative frequencies of the two *Md-ACS1* alleles varied depending on time of introduction of apple cultivars and the frequency of desirable allele 2 had increased in modern apple cultivars, indicating that this allele has been favored by selection for improved fruit quality in modern apple breeding programs (Nyblom et al., 2008, 2012). At the same time, later statistical evaluation did not reveal any effect of cultivar age on fruit softening (Nyblom et al., 2013).

Our data have confirmed that *Md-ACS1*-2 allele frequency is low in old local apple cultivars and is increasing not only in foreign apple cultivars, but also in modern Russian apple cultivars, which may be due to a wider involvement of foreign material in the breeding process.

All the studied 87 local apple cultivars were heterozygous for *Md-ACO1* locus (see Figure, b). Similar results were reported for 48 modern Russian apple cultivars (Suprun, Tokmakov, 2013) and 72 apple cultivars from the collection of Michurin All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Fruit Crops (Savel'ev et al., 2014a). As well as among the 95 studied cultivars and selections used as parents in Washington State University apple breeding program 76 were also heterozygous for *Md-ACO1* (Zhu, Barritt, 2008).

It was suggested that selection for fruit firmness has had little impact on increasing the frequency of low ethylene producing *ACO1*-1 homozygotes in apple breeding programs (Zhu, Barritt, 2008). At the same time in the study of 127 old and modern apple cultivars, the majority was homozygous for undesirable allele *Md-ACO1*-2, and the study showed no significant variation in softening rate during storage among the cultivars with different allele configurations (Nybom et al., 2013).

Md-ACS1 and *Md-ACO1* allelic diversity was also studied in 35 samples of genus *Malus* representing sections *Docyniopsis*, *Chloromeles*, *Gymnomeles* and *Malus* (Shamshin, Savelieva, 2014). Allele 2 of the *Md-ACS1* gene, associated with reduced level of ethylene synthesis, was identified only in two species: *M. prunifolia* (K2454) and *M. silvestris* (K41639), the latter was homozygous for allele 2. Of the 35 studied genotypes, 22 were heterozygous and 12 were homozygous for the *Md-ACO1*-1 allele (Shamshin, Savelieva, 2014).

***Md-Exp7* locus.** Among the three common *Md-Exp7* alleles (198, 202 and 214 bp) described by F. Costa et al. (2008), in our study we did not find allele 214 bp, but identified three additional alleles – 206, 210 and 212 bp. The most common genotype was 198:202 found in 44 local cultivars, while 19 were homozygous for allele 202 and 11 – for allele 198 provided that they really were homozygous and did not carry an undetected allele (see Table). Moreover, 13 local cultivars had three rare alleles. Allele 210 was found in nine genotypes, allele 206 – in four and allele 212 – in one genotype, while cultivar Severnyj Velikan was heterozygous for rare alleles 206:210 (see Table).

The uncommon alleles were previously described in several studies. H. Nybom et al. (2012, 2013) found the same common alleles, and additional alleles at lower frequencies: 196, 200, 206, 208, 210, 212, 216 and 220 bp. It should be noted that alleles 204, 210, 220, 226 and 230 bp were also detected in wild species of genus *Malus* (Savel'ev et al., 2014b). Since there have been no data on the effect of these alleles on fruit softening, their role remains uncertain and requires further study.

In the study by H. Nybom et al. (2012, 2013) of *Md-Exp7* locus polymorphism in a large apple collection the most common genotype was 202:202 and genotype 198:202 was also quite common. It was shown that allele 202 frequency is increasing in modern apple cultivars, suggesting that this marker has been favored by selection in modern apple breeding programs and therefore is more likely to be associated with low softening (Nybom et al., 2012). It was also reported that the cultivars homozygous for marker 202 showed a significantly lower softening compared to heterozygous cultivars (198:202) (Nybom et al., 2013).

In our study among 87 local cultivars the 198:202 genotype was the most common. We did not find association between early-maturing and late-maturing cultivars and the *Md-Exp7* genotype (see Table). In previously studied Russian apple cultivars collection the most common were genotypes homozygous for allele 202 and 198:202 genotypes (Savel'ev et al., 2014a). At the same time, analysis of *Md-Exp7* locus polymorphism in the *Malus* species representing four sections of the genus, showed that allele 202 was the most common and the authors suggested that this allele was the oldest one, while in species of section *Malus* that includes *M. domestica*,

the most common were alleles 198, 202 and 204 bp (Savel'ev et al., 2014b).

Thus, the allelic diversity of the ethylene (*Md-ACS1*, *Md-ACO1*) and expansin (*Md-Exp7*) biosynthesis genes has been evaluated for the first time in the collection of local apple cultivars from Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR. The allele frequencies in the collection generally coincide with the data of previous studies. The *Md-ACS1* allele 2 frequency is low in old local apple cultivars and is increasing in modern apple cultivars, while all the studied local cultivars are heterozygous for *Md-ACO1* locus, as well as most modern Russian apple cultivars. Half of the studied local cultivars are heterozygous for *Md-Exp7* (198:202). No association has been found between the *Md-Exp7* genotype and the maturation time of the cultivars. The obtained results can be used for additional evaluation of the local apple cultivars potential for breeding.

Acknowledgements

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 17-29-08020, the plant material for this study was provided by Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR under State contract No. AAAA-A17-117030910078-3.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bratilova N.P., Moksina N.V., Gerasimova O.A., Chepelev N.L. Stages of picking and storage for different cultivars of apple fruit in the Botanical garden named after V.M. Krutovskiy. The Bulletin of Kras-GAU. 2015;11:146-150.
- Costa F., Peace C.P., Stella S., Serra S., Musacchi S., Bazzani M., Sansavini S., Van de Weg W.E. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.). J. Expt. Bot. 2010;61(11):3029-3039. DOI 10.1093/jxb/erq130.
- Costa F., Stella S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchin M., Dallavia J., Koller B., Sansavini S. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.). Euphytica. 2005;141:181-190. DOI 10.1007/s10681-005-6805-4.
- Costa F., Van de Weg W.E., Stella S., Dondini L., Pratesi D., Musacchi S., Sansavini S. Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). Tree Genet. Genomes. 2008;4:575-586. DOI 10.1007/s11295-008-0133-5.
- Harada T., Sunako T., Wakasa Y., Soejima J., Satoh T., Niizeki M. An allele of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. Theor. Appl. Genet. 2000;101:742-746. DOI 10.1007/s001220051539.
- Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Garkava-Gustavsson L., Sehic J., Tahir I. Selection for improved fruit texture and storability in apple. Acta Hort. 2012;934(2):849-854. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.934.112.
- Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Sehic J., Hertog M. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm. Tree Genet. Genomes. 2013;9:279-290. DOI 10.1007/s11295-012-0554-z.
- Nybom H., Sehic J., Garkava-Gustavsson L. Modern apple breeding is associated with a significant change in allelic ratio of the ethylene production gene *Md-ACS1*. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 2008;83:673-677. DOI 10.1080/14620316.2008.11512442.

- Oraguzie N.C., Iwanami H., Soejima J., Harada T., Hall A. Inheritance of *Md-ACS1* gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.). Theor. Appl. Genet. 2004;108:1526-1533. DOI 10.1007/s00122-003-1574-8.
- Oraguzie N.C., Volz R.K., Whitworth C.J., Bassett H.C.M., Hall A.J., Gardiner S. Influence of *Md-ACS1* allelotype and harvest season within an apple germplasm collection on fruit softening during cold air storage. Postharvest Biol. Technol. 2007;44:212-219. DOI 10.1016/j.postharvbio.2006.12.013.
- Savel'ev N.I., Shamshin I.N., Kudryavtsev A.M. Apples for the alleles of genes of shelf life and quality of fruits. Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2014a;3:17-20.
- Savel'ev N.I., Shamshin I.N., Savel'eva N.N., Lyzhin A.S. Polymorphism for the *MD-EXP-7* gene for expansin biosynthesis in wild species of the genus *Malus* Mill. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014b;18(4/1): 713-717.
- Shamshin I.N., Savelieva N.N. Identifying the gene sources for ethylene biosynthesis (*MD-ACS1* and *MD-ACO1*) in genoplasm of wild apple tree species of the genus *Malus* (L.) Mill. Herald of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2014;4:35-37.
- Sunako T., Sakuraba W., Senda M., Akada S., Ishikawa R., Niizeki M., Harada T. An allele of the ripening-specific 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid synthase (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life. Plant Physiol. 1999;119(4):1297-1304. DOI 10.1104/pp.119.4.1297.
- Suprun I.I., Tokmakov S.V. Allelic diversity of ethylene biosynthesis related *MD-ACS1* and *MD-ACO1* genes in Russian apple germplasm. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(23):298-302.
- Zhu Y., Barritt B.H. *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. Tree Genet. Genomes. 2008;4:555-562. DOI 10.1007/s11295-007-0131-z.

ORCID ID

I.N. Shamshin orcid.org/0000-0002-4464-1876
A.V. Shlyavas orcid.org/0000-0002-8009-6780
A.A. Trifonova orcid.org/0000-0001-9618-5932
K.V. Boris orcid.org/0000-0002-8479-4949
A.M. Kudryavtsev orcid.org/0000-0001-6029-0730



Plant thionins: structure, biological functions and potential use in biotechnology

T.I. Odintsova , M.P. Slezina, E.A. Istomina

Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of defense system in both plants and animals. They represent an ancient mechanism of innate immunity providing rapid first line of defense against pathogens. Plant AMPs are classified into several families: thionins, defensins, non-specific lipid-transfer proteins, hevein- and knottin-type peptides, hairpinins and macrocyclic peptides (cyclotides). The review focuses on the thionin family. Thionins comprise a plant-specific AMP family that consists of short (~5 kDa) cysteine-rich peptides containing 6 or 8 cysteine residues with antimicrobial and toxic properties. Based on similarity in amino acid sequences and the arrangement of disulphide bonds, five structural classes of thionins are discriminated. The three-dimensional structures of a number of thionins were determined. The amphipathic thionin molecule resembles the Greek letter Γ , in which the long arm is formed by two antiparallel α -helices, while the short one, by two parallel β -strands. The residues responsible for the antimicrobial activity of thionins were identified. Thionins are synthesized as precursor proteins consisting of a signal peptide, the mature peptide region and the C-terminal prodomain. Thionins protect plants from pathogenic bacteria and fungi acting directly on the membranes of microorganisms at micromolar concentrations, although their precise mode of action remains unclear. In addition to plant pathogens, thionins inhibit growth of a number of human pathogens and opportunistic microorganisms, such as *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium solani*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Thionins are toxic to different types of cells including mammalian cancer cell lines. Transgenic plants expressing thionin genes display enhanced resistance to pathogens. A wide range of biological activities makes thionins promising candidates for practical application in agriculture and medicine.

Key words: antimicrobial peptides; thionins; plant immunity.

Тионины растений: строение, биологические функции и перспективы использования в биотехнологии

Т.И. Одинцова , М.П. Слезина, Е.А. Истомина

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

Антимикробные пептиды (АМП) – важнейшие компоненты защитной системы растений и животных, они представляют собой древний механизм врожденной устойчивости, обеспечивающий «первую линию обороны» против патогенов. Выделяют несколько семейств АМП растений: тионины, дефензины, неспецифические липид-переносящие белки (ЛПБ), геветино- и ноттиноподобные пептиды, гарпинины, а также макроциклические пептиды (циклотиды). Обзор посвящен характеристике семейства тионинов. Тионины – характерное только для растений семейство АМП, состоящее из коротких (~5 кДа) цистеин-богатых пептидов (с шестью или восемью остатками цистеина в молекуле), которые обладают антимикробными и токсическими свойствами. На основании сходства аминокислотных последовательностей и расположения дисульфидных связей выделяют пять структурных классов тионинов. Установлена пространственная структура ряда тионинов. Показано, что амфипатическая молекула тионина имеет форму греческой буквы Γ , у которой длинное плечо образовано двумя антипараллельными α -спиралями, а короткое – двумя параллельными β -тяжами. Выявлены аминокислотные остатки, ответственные за антимикробную активность тионинов. Тионины синтезируются в виде предшественников, состоящих из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена. Тионины являются защитными пептидами растений против патогенных бактерий и грибов, которые действуют в микромолярных концентрациях непосредственно на мембраны микроорганизмов, хотя детальный механизм действия этих АМП до конца не выяснен. Помимо патогенов растений, тионины подавляют рост ряда патогенных и условно патогенных микроорганизмов человека, таких как *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium solani*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Тионины токсичны для различного типа клеток, включая линии раковых клеток млекопитающих. Трансгенные растения, в которых экспрессируются гены тионинов, обладают повышенной устойчивостью к патогенам. Широкий спектр антимикробной и токсической активности тионинов открывает возможности их практического использования в сельском хозяйстве и медицине.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; тионины; иммунитет растений.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A. Plant thionins: structure, biological functions and potential use in biotechnology. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):667-675. DOI 10.18699/VJ18.409

Received 21.03.2018
Accepted for publication 18.06.2018
© AUTHORS, 2018



e-mail: odintsova2005@rambler.ru

During their lifetime plants are constantly confronted with pathogens, and to combat them, they have developed various defense mechanisms. Synthesis of antimicrobial compounds of protein or non-protein nature provides an example. In the plant defense system, antimicrobial peptides (AMPs) are the most important protein constituents. AMPs represent an ancient innate immunity mechanism providing rapid and energy-saving first line of defense against pathogens. Plant AMPs share similar properties, such as small size of the molecules (less than 10 kDa), positive charge and amphiphilicity (Egorov, Odintsova, 2012; Tam et al., 2015; Sarethy, 2017). These structural peculiarities allow AMPs to interact either directly or via receptors with membranes of microorganisms and disturb their permeability that leads to inhibition of growth and development of pathogens. The vast majority of plant AMPs are cysteine-rich peptides; they contain an even number (2, 4, 6, 8 or 10) of cysteine residues that form disulfide bonds conferring high structural stability to AMPs molecules. Based on homology in amino acid sequences, cysteine motifs and three-dimensional structure, AMPs are classified into several families: thionins, defensins, non-specific lipid-transfer proteins, hevein- and knottin-type peptides, hairpinins, and macrocyclic peptides (cyclotides).

In recent years, AMPs have attracted a great deal of interest due to their promising practical applications in agriculture to control crop diseases and in medicine – to develop next-generation pharmaceuticals (de Souza Cândido et al., 2014; Guzmán-Rodríguez et al., 2015).

Thionins

Structural characteristics

Thionins are short (~5 kDa) cysteine-rich peptides, which were first discovered in wheat endosperm (Balls et al., 1942). Later, they were found in many monocotyledonous and dicotyledonous plants. About 100 thionin sequences have been described in 15 plant species (Stec, 2006). In contrast to representatives of the defensin family found in both plants and animals, thionins are plant-specific. Thionins are classified into two main groups according to the number of cysteine residues: 6- or 8-Cys-containing peptides. Based on similarity in amino acid sequences and disulfide bond arrangement, thionins are divided into five structural classes (I–V). Class I thionins are found in seed endosperm of plants belonging to the Poaceae family. They consist of 45 amino acids, 8 of which are cysteines, and have high positive charge of the molecules. Class II thionins occur in leaves and nuts of the parasitic plant *Pyrularia pubera* and in leaves of barley (*Hordeum vulgare*). They are less basic compared to class I thionins and consist of 46–47 amino acid residues. They also have 8 cysteine residues in the molecule. Class III thionins were isolated from different mistletoe species, such as *Viscum album*, *Phoradendron tomentosum*, *Phoradendron liga*, and *Dendrophthora clavata*. They possess 45–46 amino acids and 3 disulfide bonds; the charge of their molecules is the same as in the class II thionins. From *Crambe abyssinica* seeds, thionins of class IV were extracted; they have 46 amino acids and 3 disulfide bonds and are neutral. A wheat thionin, which is a truncated variant of class I thionins, belongs to class V. Amino acid sequences of thionins belonging to different classes display high sequence

similarity. Amino acid sequences of thionins from selected plant species are presented in Fig. 1.

All thionins are synthesized as ~18 kDa preproproteins, which consist of a signal peptide, a basic thionin domain and an acidic C-terminal propeptide. Within one species, the C-terminal propeptides are highly conserved; this especially refers to the position of 6 cysteine residues in the polypeptide chain (Schrader-Fischer, Apel, 1993). Homology in thionin acidic propeptides, although less pronounced, is also observed among acidic propeptides of different plant species. Conservation of the C-terminal prodomain proves its vital functions for the precursor protein. Cleavage of the signal peptide and the C-terminal propeptide occurs during post-translational processing of the precursor. The vacuolar proteinase was isolated from tobacco leaves, which cleaves the signal peptide from the precursor protein. The removal of the signal peptide is necessary for activation of thionin's toxic properties (Romero et al., 1997). From the etiolated barley seedlings, serine proteinase (subtilase) was isolated. This pyrolysins family enzyme performs processing of the thionin precursor by cleaving the C-terminal prodomain (Plattner et al., 2015). The role of the acidic C-terminal prodomain has not been clarified completely so far. It is supposed to serve for directional transport of the mature thionin to its final destination (vacuoles, cell walls, or protein bodies). Moreover, this prodomain neutralizes toxic properties of the mature thionin before it reaches the intercellular space or vacuole, thus protecting plant cells from their own toxin (Bohlmann, 1994). In addition, it may serve as an intramolecular chaperone providing thionin folding.

Upon pathogen attack, expression of thionin genes is regulated by methyl jasmonate; this plant hormone plays a key role in defense reactions. In *Arabidopsis thaliana*, differential regulation of thionin genes *Thi2.1* and *Thi2.2* was shown. *Thi2.1* expression in flowers is induced by *Fusarium oxysporum* infection and regulated by methyl jasmonate, while *Thi2.2* is expressed in seedlings, and its expression is jasmonate-independent (Stotz et al., 2013).

Three-dimensional structures of 6-Cys crambin from *C. abyssinica* seeds 8-Cys thionins from wheat and barley, and viscotoxin A3 from mistletoe leaves were resolved by X-ray crystallography. Some thionin structures were determined by NMR spectroscopy, namely those of phoratoxin A, crambin, viscotoxin A3 and C1, α -hordothionin, purothionin, and heliothionin. In all cases, the amphipathic thionin molecule was shown resembles the Greek letter Γ , in which the long arm is formed by two antiparallel α -helices, while the short one, by two parallel β -strands (Fig. 2). The groove between two structural domains appears to be of considerable importance for thionin functioning (Stec et al., 2004; Oard et al., 2007).

Wheat purothionins

In hexaploid wheat *T. aestivum* (AABBDD), three class I thionins, or purothionins, have been described. Purothionins- β , $-\alpha_b$ and $-\alpha_p$ are encoded by the genes *pur A1*, *pur B1*, and *pur D1* located on the long arms of chromosomes 1A, 1B, and 1D, respectively (Sánchez-Monge et al., 1979). Two β -purothionins have been described in *T. monococcum* and *T. urartu*, which are genome A donors to polyploid wheats. In addition, hexaploid wheat has class V thionins; their genes are

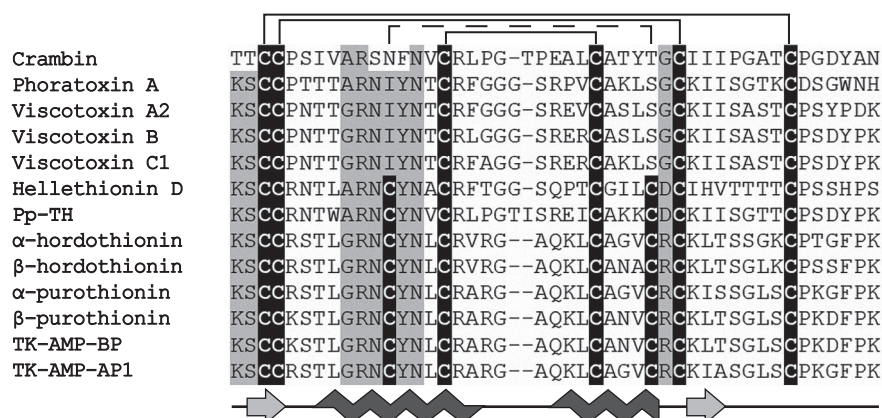


Fig. 1. Amino acid sequences of selected thionins: crambin from *C. abyssinica* (GenBank P01542.2); phoratoxin A from *P. tomentosum* (GenBank P01539.1); viscotoxin A2 (GenBank P32880.1), B (GenBank P08943.2), and C1 (GenBank P83554.1) from *V. album*; hellethionin D from *Helleborus purpurascens* (GenBank P60057.1); Pp-TH from *P. pubera* (GenBank P07504.1); α -hordothionin (GenBank AAA32966.1) and β -hordothionin (GenBank 1206255A) from *H. vulgare*; α -purothionin (GenBank CAA65313.1) and β -purothionin (GenBank CAA65312.1) from *Triticum aestivum*; TK-AMP-BP and TK-AMP-AP1 from *Triticum kiharae* (our unpublished data).

Cysteine residues are highlighted white on the black background. Functionally important residues are highlighted black on the grey background. The lines above sequences denote disulfide bonds. Thionin secondary structure elements are presented below: α -helices and β -strands are shown in grey and light-grey, respectively.

located several kilobases away from the genes of class I thionins on the long arms of chromosomes 1A, 1B, and 1D (Castagnaro et al., 1992). In hexaploid wheat species *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. to be a synthetic allopolyploid produced by crossing of *Triticum timopheevii* and *Aegilops tauschii* which is highly resistant to pathogens, we have also detected three thionins. Two of them, namely Tk-AMP-AP1 and Tk-AMP-BP, were isolated from seeds and sequenced (our unpublished data). The Tk-AMP-BP structure has turned to be identical to β -purothionin from *T. aestivum*. *T. kiharae* transcriptome analysis by high throughput next-generation sequencing (NGS) technology has revealed much greater diversity of purothionins (our unpublished data). In order to search for thionin precursor transcripts, the algorithm based on conservative cysteine motifs characteristic to the C-terminal prodomain and the mature thionin domain was used (Silverstein et al., 2007). As a result, 15 transcripts encoding the precursors with characteristic cysteine motifs have been discovered in wheat seedlings (Fig. 3). All of them possessed thionin-specific and conserved 6-Cys-containing C-terminal prodomain. In one transcript named c32154_g11, the cysteine-rich mature thionin region was deleted. This protein was 100 % similar to the “uncharacterized protein LOG1097596362” from *A. tauschii* subsp. *tauschii* in NSBI database. In two other highly homologous precursors, the mature peptide regions had only 4 cysteine residues that is not typical for thionins. Those proteins are also annotated as “uncharacterized protein” from *A. tauschii* subsp. *tauschii* (99 and 100 % similarity for c41117_g1 and c45947, respectively). The remaining precursors were very similar (64–100 %) to thionins or thionin-like proteins. In each of four precursors, there was a typical for thionins 8-Cys domain with two adjacent cysteine residues in the N-terminal region of the molecule. In other precursors, three successive cysteine residues were found in the thionin domains, and the number of cysteine residues varied from seven to ten.

It is of interest that in lyme grass (*Leymus arenarius* L.), which is another cereal, by transcriptome analysis we have also detected 15 transcripts encoding the precursors with motifs typical for thionins, although only 4 of them were annotated as thionin-like proteins in NCBI database (Slavokhonova et al., 2015). In six hypothetical thionins, just as in typical thionins, there were six or eight cysteine residues in the molecule including the two adjacent cysteine residues located in the

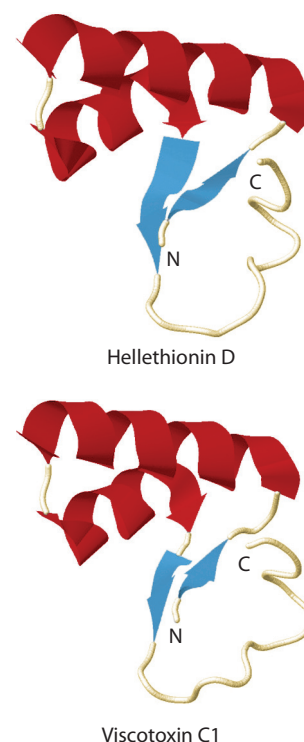


Fig. 2. Three-dimensional structure of thionins: hellethionin D (PDB: 1NBL) from *H. purpurascens* and viscotoxin C1 (PDB: 1ORL) from *V. album*.

α -helices and β -strands are shown in red and blue, respectively. N and C terminal regions of the thionin molecules are shown.

N-terminal region. In other peptides, the number of cysteine residues varied from 5 to 14. It is noteworthy that amino acid sequences of *L. arenarius* thionin-like proteins with three successive cysteine residues in the N-terminal region of the molecule were similar to those of wheat.

Thus, transcriptome analysis has revealed new structural types of thionin-like proteins in wheat and related cereal species *L. arenarius*. Further research will focus on the analysis of antimicrobial activity of these new plant peptides.

Structure-function relationship

By now a number of thionins have been isolated and characterized, making it possible to establish the role of particular amino acid residues in the spatial structure and biological activity of the peptides. Studies on wheat purothionins have shown that modification of all amino groups significantly changes the charge of the molecule and results in loss of toxicity towards yeast cells and

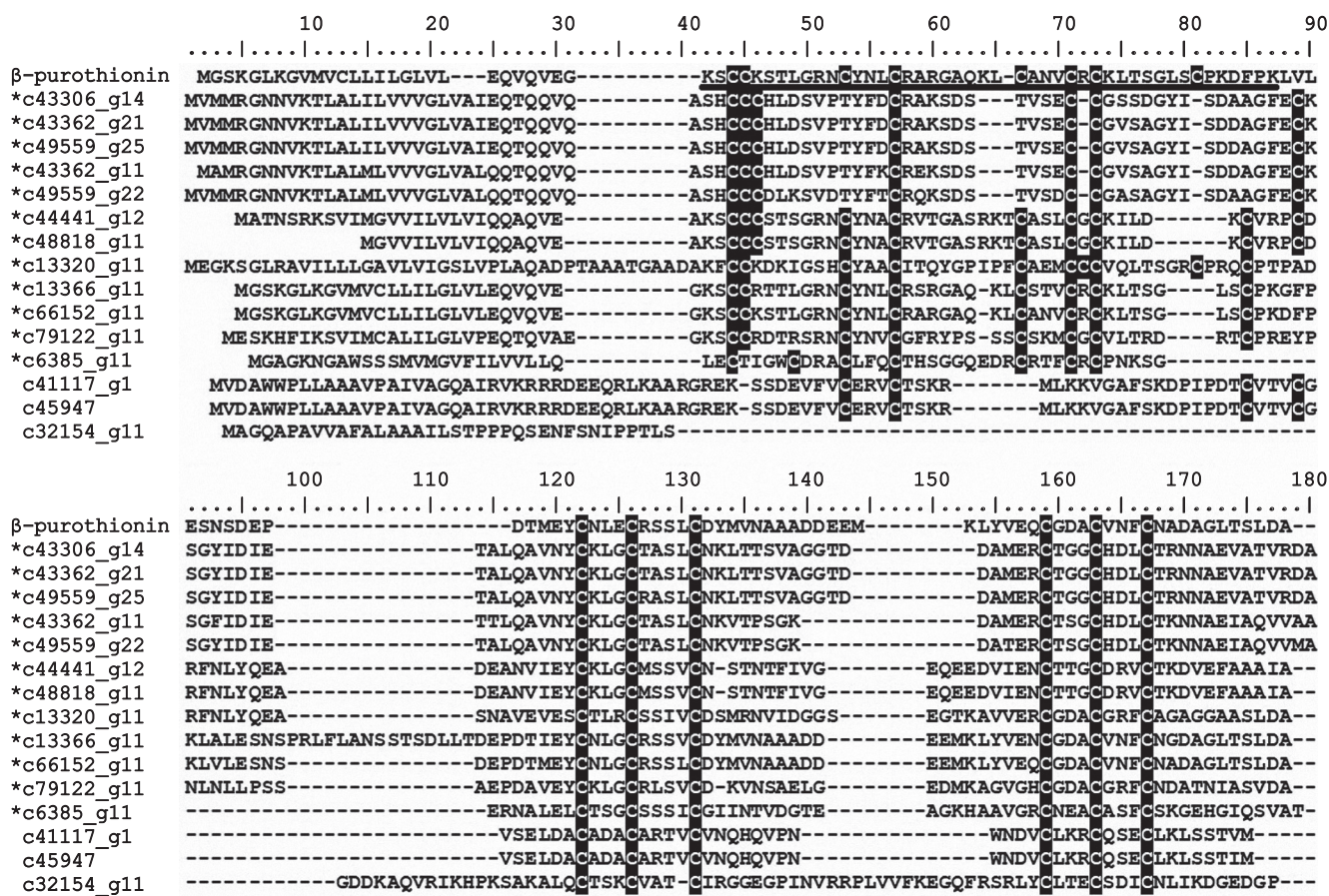


Fig. 3. Multiple alignment of translated sequences encoding *T. kiharae* thionin precursors. Polypeptides annotated as thionins or thionin-like proteins in NCBI database are marked with *.

* In β-purothionin precursor sequence (GenBank CAA65312.1), the mature peptide region is underlined. Cysteine residues are highlighted white on the black background.

mice. Modification of the only conservative tyrosine residue (Tyr-13) considerably diminishes toxicity as well. The data obtained demonstrate the importance of positively charged lysine groups for the interaction with the negatively charged surface of target cells and the role of a tyrosine residue at position 13 in toxic properties of the wheat thionin (Wada et al., 1982). Comparison of amino acid sequences of different thionins showed that not only cysteine residues, but some other amino acids, such as residues 1, 2, 9–14, and Tyr-13 that “cover” the groove between two structural domains of thionins are highly conserved as well, thus suggesting their importance for functioning of thionins. Based on the three-dimensional structure of thionins, it was suggested that this conservative region binds to negatively charged phospholipids of cell membranes and replaces them from membranes, thus causing membrane solubilization and lysis (Stec et al., 2004). A nanopeptide corresponding to residues 7–15 in the thionin sequence was synthesized, in which Cys-12 was replaced by serine. This peptide is supposed to be an active site of the thionin. This short peptide was shown to bind to the “receptor site” (to phosphatidylserine of the phospholipid membrane); however its binding capacity was not as strong as that of the native thionin (Osório e Castro, Vernon, 2003). Lys-1 and

Arg-10 make up a phosphate-binding site, while Ser-2 and Tyr-13 compose a glycerol-binding site. In turn, Asn-11 and Asn-14 stabilize homodimer formation due to intermolecular hydrogen bonds (Oard et al., 2007). L.P. Vernon and colleagues (1985) assume that position 8, Trp-8 in the thionin from *Pyrularia* is also essential for antimicrobial activity.

Comparison of toxic thionin sequences with that of non-toxic crabmin from *C. abyssinica* demonstrated that the conserved residues Lys-1 and Tyr-13 are crucial for toxicity, since in crabmin, Thr-1 and Phe-13 are located in corresponding positions. In addition, Arg-10 is considered to be important for the maintenance of the thionin spatial structure (Rao et al., 1993).

Using *P. pubera* Pp-TH thionin containing four disulfide bonds as an example, it was shown that elimination of one disulfide bond significantly alters peptide folding (Vila-Perelló, Andreu, 2005). A truncated by 45 % Pp-TH was synthesized; it comprised residues from 7th to 32nd of the native peptide, which form two antiparallel α-helices stabilized by two disulfide bonds. The truncated peptide displayed the same antimicrobial activity towards a panel of microorganisms and the same mode of action as the intact Pp-TH (Vila-Perelló et al., 2005). In addition, in Pp-TH thionin from *P. pubera*, position

32 is occupied by Asp-32 instead of Arg-32 characteristic of other 8-Cys thionins. To elucidate the role of this mutation, its analogue Pp-TH(D32R) was synthesized, in which the aspartic acid was replaced by arginine. In the modified peptide, the spatial structure was generally preserved, although some decrease in the content of α -helices was noted. However, this synthetic peptide exhibited stronger inhibitory activity against some gram-negative bacteria, while its activity against other pathogens remained unchanged (Vila-Perelló et al., 2003). The *P. pubera* thionin was used as a template for designing shorter antimicrobial compounds but retaining the same antimicrobial activity as the native peptide (Vila-Perelló et al., 2006).

Biologic activity of thionins

Thionins have long been known for their ability to inhibit growth of bacteria and fungi *in vitro* (Stuart, Harris, 1942). R. Fernandez de Caley and his colleagues (1972) were the first to demonstrate that thionins suppress growth of phytopathogenic bacteria, and they suggested the protective role of these proteins *in planta*. Further research showed that thionins inhibit growth of both gram-positive and gram-negative bacteria, phytopathogenic fungi and oomycetes with IC_{50} (concentration required for 50 % inhibition of pathogen growth) usually from 1 up to 15 $\mu\text{g/ml}$ (Stec, 2006). For wheat and barley thionins (class I thionins), the efficient concentration for 50 % growth inhibition of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Pseudomonas solanacearum* was $2\text{--}3 \times 10^{-7}$ M; for the pathogenic fungi, such as *Rosellinia necatrix*, *Colletotrichum lagenarium*, and *Fusarium solani*, it was $1\text{--}4 \times 10^{-6}$ M (Molina et al., 1993). The wheat purothionin caused lysis of *Rhizoctonia solani* cells (rice pathogen, strain LR172), while visible changes in pathogen membranes were observed at the purothionin concentration of 0.5 μM (Oard et al., 2004).

It is worth noting that thionins inhibit growth not only of plant pathogens, but those of humans and animals as well. For instance, the thionin-like peptides from *Capsicum annuum* were shown to suppress growth of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and *Candida tropicalis*, and bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (Taveira et al., 2014, 2016). A thionin-like peptide (CaThi) from *C. annuum* inhibited growth of the fungus *Fusarium solani* by preventing formation of hyphae. An increase in membrane permeabilization, induction of H_2O_2 production, and activation of caspases were also recorded. The peptide was also shown to penetrate into the cells of the pathogen. In combination with fluconazole, synergism of the two antifungal agents was observed resulting in 100 % death of *F. solani* cells (Taveria et al., 2017). The authors suppose that the pepper thionin causes apoptosis of fungal cells, however intracellular targets cannot be excluded either. In the endothelial cell line BE-E6E7, expression of *Arabidopsis* thionin Thi2.1 inhibited growth of *E. coli*, *Staphylococcus aureus* (including the isolate which causes mastitis in cows), and *C. albicans* (Loeza-Ángeles et al., 2008; Ochoa-Zarzosa et al., 2008a, b). Wheat thionins were shown to kill the cells of the parasitic protozoan *Leishmania donovani* causing visceral leishmaniasis (Berrocal-Lobo et al., 2009). Death of *L. donovani* cells results from a drastic increase in membrane permeability. The examples mentioned

above open an opportunity for the use of thionins in treatment of human and animal diseases.

Apart from being destructive to microorganisms, thionins affect mammalian cell cultures (Carrasco et al., 1981; Loeza-Ángeles et al., 2008), entire animals (mammals), (Coulson et al., 1942), and insect larvae (Kramer et al., 1979; Stec, 2006). During injection of wheat, barley or rye thionins into *Manduca sexta* larvae, the half lethal concentration was 17–46 $\mu\text{g/g}$ (Kramer et al., 1979).

Thionins possess cytotoxic and anticancer activities on mammalian cells (Guzmán-Rodríguez et al., 2015). The thionin from *P. pubera* inhibits growth of mouse melanoma cells (B16) and cervical cancer cells (HeLa) with $IC_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$. This thionin also exhibits cytotoxic activity causing hemolysis. The anticancer activity is due to membrane depolarization which causes activation of endogenous phospholipase A_2 resulting in modifications of membrane structure and cell death. Another group of thionins with anticancer and cytotoxic activities includes viscotoxins. Viscotoxin B2 inhibits growth of rat sarcoma cells with $IC_{50} = 1.6 \mu\text{g/l}$ (Kong et al., 2004). Viscotoxins A1, A2 and A3 display cytotoxic activity on human lymphocytes, which is associated with induction of reactive oxygen species and membrane permeabilization. However, hemolytic properties of viscotoxins are less pronounced compared to other thionins (Coulson et al., 2002). Ligatoxin B from *P. leucae* is toxic to the cells of human lymphoma (U937GTB) and adenocarcinoma (ACHN) at a concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$. This thionin has a DNA-binding domain, and it was suggested that binding to DNA inhibits synthesis of nucleic acids (Li et al., 2002). All phoratoxins (A–F) are toxic to mammalian cells. Phoratoxins A and B are toxic to rats at a concentration of 0.5–1 $\mu\text{g/kg}$. Phoratoxins C–F inhibit growth of different solid tumor cells, while phoratoxin C selectively inhibits growth of breast cancer cells (Johansson et al., 2003). The thionin Thi2.1 from *A. thaliana* has anticancer activity as well; it kills 94 % of MCF-7 and 38 % of HeLa cells. Moreover, this thionin is cytotoxic to bovine endothelial and mammary epithelial cells (Loeza-Ángeles et al., 2008). The results obtained indicate that cytotoxicity of thionins is not selective; however, these peptides are promising candidates for the development of novel anticancer drugs.

Toxicity of thionins to different types of cells points to their defensive role against pathogens *in vivo*. This role is also supported by other data, such as synthesis of thionins in response to pathogen attack (Bohlmann et al., 1998), localization of thionins in “vulnerable” tissues (Orru et al., 1997), enhanced resistance of transgenic plants expressing thionin genes (see below), and decreased resistance to pathogens of thionin-silenced plants (Rayapuram et al., 2008). For example, in barley invaded by aphids *Rhopalosiphum padi*, *Myzus persicae* and *Myzus cerasi*, up-regulation of several thionin genes was revealed by transcriptome analysis, especially in barley plants infected with *M. persicae* and to a lesser extent, after *R. padi* invasion. The ectopic expression of two of these genes in *Nicotiana benthamiana* decreased sensitivity to *M. persicae*, suggesting that thionins do play a role in defense against aphids (Escudero-Martínez et al., 2017). On the other hand, silencing of thionin genes results in decreased resistance. In thionin-silenced *Nicotiana attenuata* plants, more plants were infected with opportunistic *Pseudomonas* species as compared

to wild-type plants and more of them died from infection (Rayapuram et al., 2008).

In the development of novel antimicrobial agents, high toxicity of thionins to various pathogens and insect and mammalian cells forms the basis for their practical application in design of biologically active analogues with more simple structure (Vila-Perelló et al., 2006).

Although the main function of thionins is protection against pathogens, they also serve as storage proteins and participate in such processes as maturation and germination of seeds, packaging of storage proteins into protein bodies and their mobilization during germination.

Mode of action

Toxicity of thionins is considered to be associated with membrane permeabilization (Carrasco et al., 1981) which is inhibited by mono- and bivalent metal ions (Oard et al., 2007). Using barley α -hordothionin as an example, a mechanism of thionin-mediated membrane permeabilization based on molecular modeling was suggested. According to this model, thionin forms a water-selective channel in the membrane, leading to water leakage into the lipid bilayer and local membrane disruption (Oard, 2011). Thionin-triggered changes in membrane permeability lead to a number of other processes, such as membrane depolarization, increased permeability for Ca^{2+} and K^{+} ions, and activation of a number of enzymes (Stec, 2006). All these secondary processes can enhance the primary toxic effect of thionins and lead to complete destruction of cells. Obviously, membrane permeabilization by thionins is based on some universal process and is not mediated by interactions with specific receptors at the surface of target cells. According to P. Hughes and colleagues (2000), thionin toxicity is due to formation of ion channels in cell membranes by direct interaction with the surface of lipids. However, J.A. Richard with colleagues (2002) supposes that thionins partially incorporate into the lipid membrane due to electrostatic interactions that makes membranes more rigid and enhances fluidity at the edges of interphase regions. Electrostatic interaction of thionins with particular groups of phospholipid molecules contributes to the formation of negatively charged patches consisting of phospholipids. These patches formed by toxins increase the fluidity of membranes and withdraw phospholipids, thus intensifying instability of membranes and turning their lysis irreversible (Stec et al., 2004).

Along with membrane permeabilization, thionins affect intracellular targets: they activate endogenous phospholipase A_2 (Vernon, Bell, 1992) and adenylate cyclase (Huang et al., 1994). β -purothionin inhibits protein kinase C and binds calmodulin. Purothionins inhibit ribonucleotide reductase and β -glucuronidase (Diaz et al., 1992). Viscotoxins are suggested to interact directly with DNA or RNA that leads to inhibition of synthesis of nucleic acids and proteins (Woynarowski, Konopa, 1980; Li et al., 2002). Moreover, they were shown to possess immunomodulatory activity (Tabiasco et al., 2002). All the revealed toxic activities of thionins begin with membrane disruption and disturb key cellular processes that may finally result in cell death. The accumulating data indicate that thionins act not only on intracellular targets, but on secreted proteins of pathogens as well. For example, the

study of the mode of action of the antifungal thionin Thi2.4 from *A. thaliana* showed that it binds to the secreted lectin of *Fusarium graminearum*, which induces death of leaf cells, thus protecting the plant from the toxic effect of the lectin (Asano et al., 2013).

The use of thionin genes

for the improvement of disease resistance in plants

Thionin genes have been successfully used for plant transformation and production of transgenic plants with enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. In most cases, thionin genes of cereals served as transgenes. Let us consider some examples.

The gene of wheat β -purothionin under endogenous carbonic anhydrase promoter was introduced into the genome of *A. thaliana* (Oard, Enright, 2006). Even though high-level expression of β -purothionin gene was not observed, the transgenic plants demonstrated enhanced resistance to bacterial and fungal pathogens (*Pseudomonas syringae* strain DC3000 and *F. oxysporum*). β -purothionin expression in transgenic plants caused morphological abnormalities in fungal hyphae, while the extract from leaves of transgenic plant leaves increased membrane permeabilization in *R. solani*.

Expression of the barley α -thionin gene in tobacco plants under 35S promoter of cauliflower mosaic virus increased their resistance to two bacterial pathogens – *P. syringae* pv. *tabaci* and *P. syringae* pv. *syringae* (Carmona et al., 1993).

Black rot of sweet potato is caused by the fungus *Cercotycystis fimbriata*. The disease poses a serious problem for tropical and subtropical regions where sweet potato is cultivated, especially for such countries as India, China and Indonesia. The pathogenic fungus hinders growth and has a detrimental effect on the storage of roots. Transgenic sweet potato plants with incorporated gene of barley α -hordothionin displayed high-level expression of α -hordothionin mRNA in leaves and storage roots. Compared to non-transgenic plants, the transgenic plants showed reduced yellowing of leaves and smaller lesion areas around the sites inoculated with *C. fimbriata* spores. The obtained results demonstrate the vast potential of thionin genes for improving resistance of sweet potato to black rot (Muramoto et al., 2012).

The rice thionin gene OsTH17 was used to produce transgenic rice lines cv. Nipponbare (Ji et al., 2015). The transgenic rice plants were less susceptible to the oomycete *Pythium graminicola* and the nematode *Meloidogyne graminicola*, which are two most damaging root pathogens of rice. Two main bacterial pathogens infecting rice, namely *Burkholderia plantarii* и *Burkholderia glumae*, are also a serious problem for rice cultivation. Endogenous thionin genes are expressed constitutively in the coleoptiles, which is the target organ for the bacteria. However, expression of endogenous thionin genes is not enough for resistance to these pathogens. To cope with this problem, transgenic rice plants with an oat thionin gene were generated, and high-level accumulation of the thionin in cell walls was observed. Germination of seeds from non-transgenic plants in the presence of the bacteria resulted in early yellowing and death of seedlings. On the contrary, transgenic seedlings, in which the oat thionin gene was expressed, grew normally. Thus, this thionin efficiently protected rice plants against bacterial infection (Iwai et al., 2002).

For transformation of apple-trees, the gene encoding barley α -hordothionin was used (Krens et al., 2011). In the field, four of six transgenic lines appeared to be much more resistant to the fungal pathogen *Venturia inaequalis* causing scab. The resistance persisted over four years of observation, and the hordothionin gene expression level was also constant.

The *Arabidopsis* thionin gene Thi2.1 under a fruit-inactive promoter was used to produce transgenic tomato plants with enhanced resistance to bacterial and *Fusarium* wilt. Constitutive expression of the transgene was observed in roots and leaves of tomato plants. Transgenic plants turned to be less susceptible than wild-type plants to both bacterial and *Fusarium* wilt. In transgenic lines, suppression of bacterial pathogen replication was recorded (Chan et al., 2005). The same thionin gene of *Arabidopsis* was used to enhance resistance of the susceptible ecotype Columbia (Col-2) to *F. oxysporum* f. sp. *matthioli* infection. Increased resistance was confirmed by suppression of the fungal growth on transgenic plants. Moreover, growth abnormalities in hyphae, such as hyperbranching, were noted (Epple et al., 1997).

In conclusion, it should be noted that although thionins have been known for a long time, their high toxicity to a wide range of bacteria and fungi pathogenic to plants and humans, insects and cancer cells makes these peptides highly promising for the development of novel pharmaceuticals and plant disease control agents. Further detailed studies of the mode of action of thionins will enable creation of novel molecules with improved properties for practical application in agriculture and medicine.

Acknowledgements

This study was supported by Russian Science Foundation (grant No. 16-16-00032).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Asano T., Miwa A., Maeda K., Kimura M., Nishiuchi T. The secreted antifungal protein thionin 2.4 in *Arabidopsis thaliana* suppresses the toxicity of a fungal fruit body lectin from *Fusarium graminearum*. PLoS Pathog. 2013;9(8):e1003581. DOI 10.1371/journal.ppat.1003581.
- Balls A.K., Hale W.S., Harris T.H. A crystalline protein from a lipoprotein of wheat flour. Cereal Chem. 1942;19:279-288.
- Berrocal-Lobo M., Molina A., Rodriguez-Palenzuela P., Garcia-Olmedo F., Rivas L. *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. Exp. Parasitol. 2009;122:247-249.
- Bohlmann H. The role of thionins in plant protection. Crit. Rev. Plant Sci. 1994;13:1-16.
- Bohlmann H., Vignutelli A., Hilpert B., Miersch O., Wasternack C., Apel K. Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene Thi2.1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. FEBS Lett. 1998;437(3):281-286.
- Carmona M.J., Molina A., Fernandez J.A., Lopez-Fando J.J., Garcia-Olmedo F. Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. Plant J. 1993;3(3):457-462.
- Carrasco I., Vazquez D., Hernandez-Lucas C., Carbonero P., Garcia-Olmedo F. Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. Eur. J. Biochem. 1981;116(1):185-189.
- Castagnaro A., Marañón C., Carbonero P., Garcia-Olmedo F. Extreme divergence of a novel wheat thionin generated by a mutational burst specifically affecting the mature protein domain of the precursor. J. Mol. Biol. 1992;224(4):1003-1009.
- Chan Y.L., Prasad V., Sanjaya, Chen K.H., Liu P.C., Chan M.T., Cheng C.P. Transgenic tomato plants expressing an *Arabidopsis* thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. Planta. 2005;221(3):386-393. DOI 10.1007/s00425-004-1459-3.
- Coulon A., Berkane E., Sautereau A.M., Urech K., Rouge P., Lopez A. Modes of membrane interaction of a natural cysteine-rich peptide: viscotoxin A3. Biochim. Biophys. Acta. 2002;1559(2):145-159. DOI 10.1016/S0005-2736(01)00446-1.
- Coulson E.J., Harris T.H., Axelrod B. Effect on small laboratory animals of the injection of the crystalline hydrochloride of a sulfur protein from wheat flour. Cereal Chem. 1942;19:301-307.
- de Souza Cândido E., e Silva Cardoso M.H., Sousa D.A., Viana J.C., de Oliveira-Júnior N.G., Miranda V., Franco O.L. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. Peptides. 2014;55:65-78. DOI 10.1016/j.peptides.2014.02.003.
- Diaz I., Carmona M.J., Garcia-Olmedo F. Effects of thionins on β -glucuronidase *in vitro* and in plant protoplasts. FEBS Lett. 1992;296(3):279-282. DOI 10.1016/0014-5793(92)80304-Y.
- Egorov T.A., Odintsova T.I. Defense peptides of plant immune system. Russ. J. Bioorg. Khim. 2012;38(1):1-9. DOI 10.1134/S1068162012010062.
- Epple P., Apel K., Bohlmann H. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. Plant Cell. 1997;9(4):509-520. DOI 10.1105/tpc.9.4.509.
- Escudero-Martinez C.M., Morris J.A., Hedley P.E., Bos J.I.B. Barley transcriptome analyses upon interaction with different aphid species identify thionins contributing to resistance. Plant Cell Environ. 2017;40(11):2628-2643. DOI 10.1111/pce.12979.
- Fernandez de Caleyra R., Gonzalez-Pascual B., Garcia-Olmedo F., Carbonero P. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. Appl. Microbiol. 1972;23(5):998-1000.
- Guzmán-Rodríguez J.J., Ochoa-Zarzosa A., López-Gómez R., López-Meza J.E. Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. Biomed. Res. Int. 2015;2015:735087. DOI 10.1155/2015/735087.
- Huang W., Vernon L.P., Bell J.D. Enhancement of adenylate cyclase activity in S49 lymphoma cell membranes by the toxin thionin from *Pyricularia pubera*. Toxicon. 1994;32(7):789-797.
- Hughes P., Dennis E., Whitecross M., Llewellyn D., Gage P. The cytotoxic plant protein, β -purothionin, forms ion channels in lipid membranes. J. Biol. Chem. 2000;275(2):823-827. DOI 10.1074/jbc.275.2.823.
- Iwai T., Kaku H., Honkura R., Nakamura S., Ochiai H., Sasaki T., Ohashi Y. Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. Mol. Plant Microbe Interact. 2002;15(6):515-521. DOI 10.1094/MPMI.2002.15.6.515.
- Ji H., Gheysen G., Ullah C., Verbeek R., Shang C., De Vleeschauwer D., Höfte M., Kyndt T. The role of thionins in rice defence against root pathogens. Mol. Plant Pathol. 2015;16(8):870-881. DOI 10.1111/mpp.12246.
- Johansson S., Gullbo J., Lindholm P., Ek B., Thunberg E., Samuelsson G., Larsson R., Bohlin L., Claesson P. Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells. Cell. Mol. Life Sci. 2003;60(1):165-175. DOI 10.1007/s000180300011.
- Kong J.L., Du X.B., Fan C.X., Xu J.F., Zheng X.J. Determination of primary structure of a novel peptide from mistletoe and its antitumor activity. Acta Pharmaceutica Sinica. 2004;39(10):813-817.
- Kramer K.J., Klassen L.W., Jones B.L., Speirs R.D., Kammer A.E. Toxicity of purothionin and its homologues to the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). Toxicol. Appl. Pharmacol. 1979;48:179-183.

- Krens F.A., Schaart J.G., Groenwold R., Walraven A.E.J., Hesselink T., Thissen J.T.N.M. Performance and long-term stability of the barley hordothionin gene in multiple transgenic apple lines. *Transgenic Res.* 2011;20:1113-1123. DOI 10.1007/s11248-011-9484-z.
- Li S.-S., Gullbo J., Lindholm P., Larsson R., Thunberg E., Samuelsson G., Bohlin L., Claeson P. Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*. *Biochem. J.* 2002;366(2):405-413. DOI 10.1042/bj20020221.
- Loeza-Ángeles H., Sagrero-Cisneros E., Lara-Zárate L., Villagómez-Gómez E., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A. Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnol. Lett.* 2008;30(10):1713-1719. DOI 10.1007/s10529-008-9756-8.
- Molina A., Goy P.A., Fraile A., Sanchez-Monge R., Garcia-Olmedo F. Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. *Plant Sci.* 1993;92:169-177.
- Muramoto N., Tanaka T., Shimamura T., Mitsukawa N., Hori E., Koda K., Otani M., Hirai M., Nakamura K., Imaeda T. Transgenic sweet potato expressing thionin from barley gives resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in leaves and storage roots. *Plant Cell Rep.* 2012;31(6):987-997. DOI 10.1007/s00299-011-1217-5.
- Oard S.V. Deciphering a mechanism of membrane permeabilization by α -hordothionin peptide. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1808(6):1737-1745. DOI 10.1016/j.bbame.2011.02.003.
- Oard S.V., Enright F.M. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Rep.* 2006;25(6):561-572. DOI 10.1007/s00299-005-0102-5.
- Oard S., Karki B., Enright F. Is there a difference in metal ion-based inhibition between members of thionin family: molecular dynamics simulation study. *Biophys. Chem.* 2007;130(1-2):65-75. DOI 10.1016/j.bpc.2007.07.005.
- Oard S., Rush M.C., Oard J.H. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *J. Appl. Microbiol.* 2004;97(1):169-180. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02291.x.
- Ochoa-Zarzosa A., Loeza-Ángeles H., Sagrero-Cisneros E., Villagómez-Gómez E., Lara-Zárate L., López-Meza J.E. Antibacterial activity of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed by bovine endothelial cells against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 2008a;127(3-4):425-430. DOI 10.1016/j.vetmic.2007.08.031.
- Ochoa-Zarzosa A., Loeza-Lara P.D., Torres-Rodríguez F., Loeza-Ángeles H., Mascot-Chiquito N., Sánchez-Baca S., López-Meza J.E. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008b;94(2):199-206. DOI 10.1007/s10482-008-9230-6.
- Orru S., Scaloni A., Giannattasio M., Urech K., Pucci P., Schaller G. Amino acid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. *Biol. Chem.* 1997;378(9):989-996.
- Osório e Castro V.R., Vernon L.P. Stimulation of prothrombinase activity by the nonapeptide Thr-Trp-Ala-Arg-Asn-Ser-Tyr-Asn-Val, a segment of a plant thionin. *Peptides.* 2003;24(4):515-521. DOI 10.1016/S0196-9781(03)00115-3.
- Plattner S., Gruber C., Stadlmann J., Widmann S., Gruber C.W., Altmann F., Bohlmann H. Isolation and characterization of a thionin proprotein-processing enzyme from barley. *J. Biol. Chem.* 2015;290(29):18056-18067. DOI 10.1074/jbc.M115.647859.
- Rao U., Teeter M.M. Improvement of turn structure prediction by molecular dynamics: a case study of alpha 1-purothionin. *Protein Eng.* 1993;6(8):837-847.
- Rayapuram C., Wu J., Haas C., Baldwin I.T. *PR-13/Thionin* but not *PR-1* mediates bacterial resistance in *Nicotiana attenuata* in nature, and neither influences herbivore resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008;21(7):988-1000. DOI 10.1094/MPMI-21-7-0988.
- Richard J.A., Kelly I., Marion D., Pezolet M., Auger M. Interaction between β -purothionin and dimyristoylphosphatidylglycerol: a ^{31}P -NMR and infrared spectroscopic study. *Biophys. J.* 2002;83:2074-2083. DOI 10.1016/S0006-3495(02)73968-4.
- Romero A., Alamillo J.M., Garcia-Olmedo F. Processing of thionin precursors in barley leaves by a vacuolar proteinase. *Eur. J. Biochem.* 1997;243(1-2):202-208. DOI 10.1111/j.1432-1033.1997.0202a.x.
- Sánchez-Monge R., Delibes A., Hernández-Lucas C., Carbonero P., García-Olmedo F. Homoeologous chromosomal location of the genes encoding thionins in wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* 1979;54(2):61-63. DOI 10.1007/BF00265470.
- Sarethy I.P. Plant peptides: bioactivity, opportunities and challenges. *Protein Pept. Lett.* 2017;24(2):102-108. DOI 10.2174/0929866523666161220113632.
- Schrader-Fischer G., Apel K. cDNA-derived identification of novel thionin precursors in *Viscum album* that contain highly divergent thionin domains but conserved signal and acidic polypeptide domains. *Plant Mol. Biol.* 1993;23(6):1233-1242.
- Silverstein K.A., Moskal W.A., Jr., Wu H.C., Underwood B.A., Graham M.A., Town C.D., VandenBosch K.A. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J.* 2007;51(2):262-280. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2007.03136.x.
- Slavokhotova A.A., Shelenkov A.A., Odintsova T.I. Prediction of *Leymus arenarius* (L.) antimicrobial peptides based on de novo transcriptome assembly. *Plant. Mol. Biol.* 2015;89(3):203-214. DOI 10.1007/s11103-015-0346-6.
- Stec B. Plant thionins – the structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006;63(12):1370-1385. DOI 10.1007/s00018-005-5574-5.
- Stec B., Markman O., Rao U., Heffron G., Henderson S., Vernon L.P., Brumfeld V., Teeter M.M. Proposal for molecular mechanism of thionins deduced from physico-chemical studies of plant toxins. *J. Pept. Res.* 2004;64(6):210-224. DOI 10.1111/j.1399-3011.2004.00187.x.
- Stotz H.U., Waller F., Wang K. Innate immunity in plants: The role of antimicrobial peptides. *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity.* Eds. S. Hiemstra, S.A.J. Zaai. Springer, 2013;29-51.
- Stuart L.S., Harris T.H. Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein from unbleached wheat flour. *Cereal Chem.* 1942;19:288-300.
- Tabiasco J., Pont F., Fournie J.J., Vercellone A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 2002;269(10):2591-2600. DOI 10.1046/j.1432-1033.2002.02932.x.
- Tam J.P., Wang S., Wong K.H., Tan W.L. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals (Basel).* 2015;8(4):711-757. DOI 10.3390/ph8040711.
- Taveira G.B., Carvalho A.O., Rodrigues R., Trindade F.G., Da Cunha M., Gomes V.M. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. *BMC Microbiol.* 2016;16:12. DOI 10.1186/s12866-016-0626-6.
- Taveira G.B., Mathias L.S., da Motta O.V., Machado O.L., Rodrigues R., Carvalho A.O., Teixeira-Ferreira A., Perales J., Vasconcelos I.M., Gomes V.M. Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers.* 2014;102(1):30-39. DOI 10.1002/bip.22351.
- Taveira G.B., Mello É.O., Carvalho A.O., Regente M., Pinedo M., de La Canal L., Rodrigues R., Gomes V.M. Antimicrobial activity and mechanism of action of a thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits and combinatorial treatment with fluconazole against *Fusarium solani*. *Biopolymers.* 2017;108(3). DOI 10.1002/bip.23008.
- Vernon L.P., Bell J.D. Membrane structure, toxins and phospholipase A₂ activity. *Pharmacol. Ther.* 1992;54(3):269-295. DOI 10.1016/0163-7258(92)90003-I.
- Vernon L.P., Evett G.E., Zeikus R.D., Gray W.R. A toxic thionin from *Pyrularia pubera*: purification, properties, and amino acid sequence.

- Arch. Biochem. Biophys. 1985;238(1):18-29. DOI 10.1016/0003-9861(85)90136-5.
- Vila-Perelló M., Andreu D. Characterization and structural role of disulfide bonds in a highly knotted thionin from *Pyrularia pubera*. Biopolymers. 2005;80(5):697-707. DOI 10.1002/bip.20270.
- Vila-Perelló M., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A., Andreu D. Synthetic and structural studies on *Pyrularia pubera* thionin: a single-residue mutation enhances activity against Gram-negative bacteria. FEBS Lett. 2003;536(1-3):215-219. DOI 10.1016/S0014-5793(03)00053-X.
- Vila-Perelló M., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A., Andreu D. Structural dissection of a highly knotted peptide reveals minimal motif with antimicrobial activity. J. Biol. Chem. 2005;280(2):1661-1668. DOI 10.1074/jbc.M410577200.
- Vila-Perelló M., Tognon S., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A., Andreu D. A minimalist design approach to antimicrobial agents based on a thionin template. J. Med. Chem. 2006;49(2):448-451. DOI 10.1021/jm050882i.
- Wada K., Ozaki Y., Matsubara H., Yoshizumi H. Studies on purothionin by chemical modifications. J. Biochem. 1982;91(1):257-263.
- Woynarowski J.M., Konopa J. Interaction between DNA and viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 1980;361:1535-1545.

ORCID ID

T.I. Odintsova orcid.org/0000-0002-5563-9755

M.P. Slezina orcid.org/0000-0003-1653-5993

E.A. Istomina orcid.org/0000-0001-6426-6009

Создание линий озимой пшеницы с несколькими генами устойчивости к *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* для использования в селекционных программах России

И.Ф. Лапочкина¹✉, О.А. Баранова², Н.Р. Гайнуллин¹, Г.В. Волкова³, Е.В. Гладкова³, Е.О. Ковалева³, А.В. Осипова¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Немчиновка», Московская область, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

³ Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, Краснодар, Россия

Цель настоящего исследования – создать для Нечерноземной зоны Российской Федерации конкурентоспособные прототипы сортов озимой пшеницы с несколькими генами устойчивости к стеблевой ржавчине на основе новых доноров устойчивости с применением молекулярных маркеров. Разработка исходного материала базировалась на использовании новых источников устойчивости к стеблевой ржавчине, выделенных из коллекции генетических ресурсов растений ВИР и коллекции «Арсенал». Для гибридизации и беккроссирования было отобрано три образца озимой пшеницы (пшенично-эгилопсно-ржаная линия 119/4-06rw, сорт Донская полукарликовая, селекционная линия GT 96/90 из Болгарии) и один образец яровой пшеницы (линия 113/00i-4 с генетическим материалом *Aegilops triuncialis*). Эти образцы были также устойчивы к популяции бурой ржавчины в Московской области и контрастно дополняли друг друга по таким хозяйственно ценным признакам, как высота растения, число дней до колошения и устойчивость к мучнистой росе. Для ускорения селекционного процесса использовали отбор генотипов по генам устойчивости с помощью молекулярных маркеров. В результате были созданы линии озимой мягкой пшеницы, несущие комплекс хозяйственно ценных признаков и от двух до четырех генов устойчивости к стеблевой ржавчине в гомозиготном состоянии. Спектр сочетания генов полученных линий отличается от сочетаний генов, взятых в гибридизацию родительских образцов, и связан с направленною проводимых отборов методом маркер-вспомогательной селекции. У линий озимой пшеницы обнаружено 20 различных комбинаций сочетания генов *Sr2*, *Sr22*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40* и *Sr47*. Чаще всего встречалось сочетание генов *Sr22* и *Sr32* в гомозиготном состоянии. Для дальнейшего испытания в селекционных питомниках Московской области отобраны генотипы с комплексом хозяйственно ценных признаков, приближающихся к стандартному сорту озимой пшеницы Московская 39 или превышающих его. Полученный исходный материал предлагается также для использования в селекции сортов озимой пшеницы, устойчивых к стеблевой ржавчине в различных районах России. Это послужит барьером при распространении новых рас стеблевой ржавчины и повысит устойчивость создаваемых сортов к местным популяциям стеблевой ржавчины.

Ключевые слова: мягкая пшеница; маркер-вспомогательная селекция; стеблевая ржавчина; пирамида генов устойчивости.

The development of winter wheat lines with several genes for resistance to *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* for use in breeding programs in Russia

I.F. Lapochkina¹✉, O.A. Baranova², N.R. Gainullin¹, G.V. Volkova³, E.V. Gladkova³, E.O. Kovaleva³, A.V. Osipova¹

¹ Federal Research Centre "Nemchinovka", Moscow region, Russia

² All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

³ All-Russian Research Institute of Plant Biological Protection, Krasnodar, Russia

The aim of this research is to develop for the Russian Federation Non-Chernozem Zone competitive prototypes of winter wheat cultivars with several genes for resistance to stem rust (including race Ug99) based on new sources of resistance with the use of molecular markers. The individual plants and then lines of winter common wheat with several effective genes for resistance to race Ug99 of stem rust were selected by means of marker assisted selection out of hybrid combinations from the crossing of new donors of resistance to this dangerous disease. The development of initial material was based on the use of new sources of resistance to race Ug99 of stem rust from VIR and "Arsenal" collections. Three accessions of winter wheat (wheat-aegilops-rye line 119/4-06rw, cv. Donskaya Polukarlikovaya, line GT 96|90 from Bulgaria) and one accession of spring wheat (line 113/00i-4 with genetic material from *Aegilops triuncialis*), which supplemented and contrasted each other in such economically valuable features as plant height, number of days before heading, resistance to powdery mildew and leaf rust, were selected for hybridization and backcrossing. To accelerate the breeding process, resistant genotypes with *Sr* genes were selected with the use of molecular markers. As a result the lines of winter common wheat with a set of economically valuable features and the presence of two-four genes for resistance to stem rust in homozygote state were created. The spectrum of the stem rust gene combinations in the created lines differs from the gene combinations in the parental accessions involved in the crossing and is associated with the direction of the selections conducted by the marker assisted selection method. We discovered more

than 20 different combinations of the *Sr2*, *Sr22*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40* and *Sr47* genes in winter wheat lines. The combination of *Sr22* and *Sr32* in homozygote state was most often found. The genotypes with a set of economically valuable features approximating or surpassing the standard cultivar of winter wheat Moskovskaya 39 were selected for further testing in breeding nurseries of the Moscow region. The developed initial material is intended for use in selection of winter wheat cultivars resistant to stem rust in different grain-sowing regions of the Russian Federation. This will serve as a barrier for spread of new races of *Puccinia graminis* and will raise the resistance of selected cultivars to local populations of stem rust.

Key words: bread wheat; marker assistant selection; stem rust; pyramid genes for resistance.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Лапочкина И.Ф., Баранова О.А., Гайнуллин Н.Р., Волкова Г.В., Гладкова Е.В., Ковалева Е.О., Осипова А.В. Создание линий озимой пшеницы с несколькими генами устойчивости к *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* для использования в селекционных программах России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):676–684. DOI 10.18699/VJ18.410

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lapochkina I.F., Baranova O.A., Gainullin N.R., Volkova G.V., Gladkova E.V., Kovaleva E.O., Osipova A.V. The development of winter wheat lines with several genes for resistance to *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* for use in breeding programs in Russia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):676–684. DOI 10.18699/VJ18.410 (in Russian)

Ржавчинные заболевания (бурая, желтая и стеблевая ржавчины) – особо опасные болезни пшеницы, представляющие угрозу продовольственной безопасности. Стеблевая ржавчина (возбудитель – биотрофный гриб *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erik. et Henn.) наиболее вредоносна. При эпифитотийном развитии болезни потери урожая могут достигать от 50–80 % и более (Jin et al., 2008). Появление в 1999 г. в Уганде новой расы стеблевой ржавчины Ug99 и ее новых производных ставит под угрозу производство зерна пшеницы в странах, где она распространена. Усилия генетиков и селекционеров всего мира до сих пор направлены на поиск источников устойчивости к Ug99, создание доноров и сортов, устойчивых к этому опасному патогену. Занос этого заболевания возможен и на территорию России. В связи с редким (спорадическим характером) возникновения эпифитотий *P. graminis* в большинстве регионов нашей страны внимание исследователей к этому патогену до определенного времени было ослабленным. Между тем изменение климата на планете и глобализация мира могут привести к созданию условий для возникновения эпифитотийной ситуации в зерносеющих регионах Российской Федерации. В последние годы наблюдается усиление вредоносности стеблевой ржавчины: постоянное присутствие патогена отмечается на Северном Кавказе (Волкова, Синяк, 2011). Эпифитотийное развитие болезни отмечалось в 2009, 2015, 2016 гг. в Западной Сибири (Shamanin et al., 2016), Центральном регионе европейской части Российской Федерации и Нижнем Поволжье (Sibikeev et al., 2016).

На Северном Кавказе развитию и распространению патогена способствуют благоприятные климатические условия (температура, влажность), наличие промежуточного хозяина (барбариса), повсеместно распространены дикорастущие злаки, на которых гриб способен выживать, возделывание восприимчивых сортов растения-хозяина и занос инфекции. Подавляющее большинство известных генов устойчивости не эффективны против возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы. Исследователями отмечается, что северокавказские популяции ржавчинных грибов

характеризуются высокой вирулентностью и широким разнообразием патотипов. В популяции стеблевой ржавчины встречаются патотипы с 24 генами вирулентности из 39 изученных (Волкова и др., 2015, 2016).

В Западной Сибири, где производится 20 % валового производства зерна России, отмечается ухудшение фитопатологической обстановки, связанной с возделыванием восприимчивых сортов пшеницы и появлением агрессивных рас патогенов. К местной популяции *P. graminis* устойчивы сорта Pavon 76 и Buck Buck с генами (*Sr2*+*Sr23*), Super Seri (*Sr25*), Seri 82 (*Sr31*), Cook (*Sr36*) и линии MEDEA AP9D-SRDP-2 и Мороссо с неустановленными генами устойчивости, которые рекомендуются в качестве доноров в селекционных программах на иммунитет (Шаманин и др., 2016).

На территории Южного Урала периодически складываются благоприятные условия (например, в 2001 и 2005 гг.) для развития стеблевой ржавчины. При сильном развитии болезни недобор урожая может достигать 60–70 % (Мухитов, 2011). В регионы Южного Урала и Западной Сибири занос спор гриба может происходить с Северного Казахстана, где зафиксированы сильно вирулентные патотипы (TFK/R, TKT/C, TPS/H, TKN/RS, TDT/HS, TTH/KQ) стеблевой ржавчины, сходные с патотипом Ug99 (ТТКС) (Рсалиев, 2008). В то же время в 2016 г. в Западной Сибири наряду с другими агрессивными расами патогена была выявлена раса TTTTF (http://wheatrust.org/fileadmin/www.grcc.au.dk/International_Services/Pathotype_SR_Results/Country_report_Russia_-_August2017.pdf).

В Нечерноземной зоне Российской Федерации эпифитотийного развития болезни не наблюдали более 27 лет. Однако в 2010 г. вновь была зафиксирована вспышка заболевания, которая повторилась в 2013 г., а затем в 2016 г. на посевах яровой и озимой пшеницы.

Создание исходного материала и сортов с устойчивостью к стеблевой ржавчине является актуальной задачей для России. Такие сорта озимой пшеницы отсутствуют в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию в Нечерноземной зоне Рос-

сийской Федерации, а устойчивые сорта, рекомендованные к возделыванию в других регионах, защищены в основном генами *Sr31* и *Sr25*.

Большинство современных сортов не устойчиво к возбудителю стеблевой ржавчины. При создании сортов с длительной устойчивостью к ржавчинным грибам придерживаются общепринятой стратегии, включающей комбинирование нескольких генов устойчивости в одном генотипе (это уменьшает вероятность возникновения новых мутантных рас) и использование APR-генов, таких как *Sr2*, *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* и т. п. (Singh et al., 2011; Fetch, 2014; Bhavani, 2015).

Применение надежной маркерной системы к генам устойчивости позволяет значительно ускорить отбор растений с нужными генотипами. В настоящее время к большинству генов устойчивости подобраны молекулярные маркеры (<http://maswheat.ucdavis.edu/Index.htm>), часть из которых используется в маркер-вспомогательной селекции (marker assisted selection – MAS). Применение молекулярно-генетических маркеров позволяет идентифицировать эффективные гены устойчивости в сортах и гибридах, что ускоряет отбор нужных генотипов и повышает эффективность селекционного процесса (Кохметова, Атишова, 2012; Letta et al., 2013). К настоящему времени маркировано около 77 *Lr*-генов и 50 *Sr*-генов. Молекулярные маркеры используются в основном для генотипирования растительного материала, интрогрессии и пирамидирования районов хромосом, содержащих локусы хозяйственно важных признаков, контролируемых главными генами (Miedaner, Korzun, 2012; Леонова, 2013).

Таким образом, быстрое и успешное создание сортов с несколькими генами устойчивости зависит от наличия доноров устойчивости к болезни и специфичных молекулярных маркеров к генам устойчивости. При этом донор должен отвечать определенным требованиям: нести необходимый ген устойчивости и не снижать значительно продуктивность и адаптивность создаваемого исходного материала. Возделывание таких сортов позволит противостоять распространению новых рас патогена.

С учетом вредоносности стеблевой ржавчины и успешного выделения нами новых доноров устойчивости к расе

Ug99 стеблевой ржавчины (Баранова и др., 2015) возникла цель нашего исследования – создать линии озимой пшеницы с различными новыми сочетаниями нескольких генов устойчивости к стеблевой ржавчине для использования в селекционных программах России.

Материалы и методы

Для работы были отобраны два образца озимой пшеницы из коллекции ВИР: сорт Донская полукарликовая и селекционная линия из Болгарии GT 96/90, имеющие в родословной чужеродный материал от *Aegilops squarrosa* и *Triticum miguschovae* соответственно. Из коллекции «Арсенал» отобран озимый трехродовой гибрид (*T. aestivum*/*Ae. speltoides*/*Secale cereale*) – 119/4-06rw и один образец яровой пшеницы – 113/00i-4 с генетическим материалом *Ae. triuncialis* (Lapochkina, 1998). Образцы различались по сочетанию генов устойчивости к стеблевой ржавчине, как было показано в работе (Баранова и др., 2015). Образцы контрастно дополняли друг друга по хозяйственно ценным признакам (табл. 1).

Первые скрещивания родительских генотипов проведены в условиях теплицы в 2011 г. Из-за несовпадения сроков цветения удалось провести гибридизацию только между следующими образцами: (113/00i-4 × GT 96/90), (GT 96/90 × 113/00i-4), (119/4-06rw × GT 96/90), (119/4-06rw × 113/00i-4), (113/00i-4 × 119/4-06rw). Так как популяции от скрещивания озимых образцов с яровой линией 113/00i-4 должны расщепляться на яровые и озимые растения начиная с F₂, то потомство растений этого поколения высеивали на различных почвенных фонах.

Часть семян высевали весной в полевых условиях, в которых яровые генотипы выколашивались, а озимые растения оставались в фазе кушения. Особенности формирования устойчивости к стеблевой ржавчине у яровых линий мягкой пшеницы изложены в работе (Лапочкина и др., 2016). Вторую часть семян высевали в феврале на подогретом почвенном грунте, и после появления всходов (шилец) подогрев отключали. В этом случае озимые растения проходили яровизацию в естественных условиях при пониженных температурах и естественном снежном покрове, а яровые погибали. Отбор устойчивых к бурой

Table 1. Commercial traits of common wheat accessions involved in hybridization

Accession	Identified resistance genes	Reaction to Ug99, score*	Severity		Height, cm	Grain per ear, g	1000 kernels weight, g
			leaf rust, % / damage score	powdery mildew, %			
113/00i-4 (spring)	<i>Sr2</i> , <i>Sr36</i> , <i>Sr39</i> , <i>Sr40</i> , <i>Sr47</i> , <i>Sr15</i>	0; 1	0/0	1	115	1.4	41.0
119/4-06rw (winter)	<i>Sr22</i> , <i>Sr32</i> , <i>Sr9a</i> , <i>Sr17</i> , <i>Sr19</i>	2	0/0	1	100	1.5	42.0
GT 96/90 (winter)	<i>Sr24</i> , <i>Sr36</i> , <i>Sr40</i> , <i>Sr47</i> , <i>Sr31</i> , <i>Sr15</i> , <i>Sr17</i>	0;	0/0	30	70	1.5	42.0
Donskaya polukarlikovaya (winter)	<i>Sr32</i> , <i>Sr9a</i> , <i>Sr17</i> , <i>Sr19</i>	0;	5/2	50	70	1.5	40.0

* in seedlings

ржавчине растений проводили в F_2 на искусственном фоне бурой ржавчины, содержащем расы, характерные для естественной популяции возбудителя Московской области. Эти устойчивые растения кастрировали и опыляли рекуррентными родителями или сортом Донская полукарликовая.

Иммунологическую оценку линий на устойчивость к стеблевой ржавчине проводили в полевых условиях к природной популяции гриба в Центральном регионе, а в Краснодарском крае – на инфекционном фоне развития стеблевой ржавчины. В последнем случае в качестве инфекционного материала использовали северокавказскую популяцию *P. graminis*. В период максимального развития заболевания вели учет пораженности. Критериями оценки служили тип реакции (Stakman, Levine, 1922) и степень поражения растений по шкале, рекомендуемой СИММИТ (Roelfs et al., 1992). Структурный анализ растений выполняли по продуктивности колоса, массе 1000 зерен и высоте по 10 растениям. Достоверность различий показателей от стандартного сорта озимой пшеницы Московская 39 оценивали по результатам однофакторного дисперсионного анализа с использованием алгоритмов статистического анализа Agros 2.09, разработанных С.П. Мартыновым (1999). Содержание белка и клейковины в зерне линий определяли на инфракрасном анализаторе при температуре 21 °С. Содержание клейковины в муке и ее качество анализировали на приборе Глютоматик.

Индивидуальные растения для идентификации генов устойчивости *Sr* отбирали в потомстве растений F_3 , BC_1F_2 , BC_1F_3 , BC_2F_3 , BC_3F_2 . Контроль передачи целевых генов *Sr* осуществляли с использованием маркеров, рекомендованных для MAS (Приложение¹).

Результаты

У индивидуальных растений, отобранных из гибридной популяции, представленной семьями F_3 , BC_1F_2 , BC_1F_3 , BC_2F_3 , BC_3F_2 различного происхождения, было идентифицировано восемь генов, которые по частоте встречаемости в потомстве образуют ряд $Sr2 > Sr32 > Sr36 > Sr22 > Sr31 > Sr47 > Sr39 > Sr40$. Спектр сочетания идентифицированных генов у растений озимой пшеницы отличался от спектра генов, определенных у линий яровой пшеницы (Лапочкина и др., 2016). Это связано с направленностью беккроссов, проводимых у озимой и яровой пшеницы. Сочетание комбинаций генов *Sr* в генотипах озимой пшеницы более разнообразно. У яровой пшеницы мы обнаружили 10 комбинаций сочетания генов устойчивости (Лапочкина и др., 2016), а у озимых линий – 20. Обнаружены растения с сочетанием генов: $Sr2 + Sr22$; $Sr2 + Sr32$; $Sr2 + Sr36$; $Sr36 + Sr47$; $Sr31 + Sr36$; $Sr31 + Sr47$; $Sr22 + Sr47$; $Sr22 + Sr31 + Sr32$; $Sr22 + Sr31$; $Sr22 + Sr36$; $Sr32 + Sr47$; $Sr31 + Sr36 + Sr47$; $Sr36 + Sr39 + Sr47$; $Sr2 + Sr22 + Sr36$; $Sr2 + Sr31 + Sr36$; $Sr22 + Sr32 + Sr40$; $Sr22 + Sr31 + Sr36$; $Sr2 + Sr22 + Sr32$; $Sr2 + Sr22 + Sr32 + Sr40$. Чаще всего встречали растения с сочетанием генов $Sr22$ и $Sr32$ в гомозиготном состоянии (см. Приложение, рисунок). Отмечены особенности в передаче некоторых генов. В частности, не было обнаружено растений с геном *Sr24* об-

разца GT 96/90, несущего этот ген в гетерозиготном состоянии. Вторая особенность связана с геном *Sr2* (ген изначально был идентифицирован только у яровой пшеницы 113/00i-4). У более 70 % растений, устойчивых к стеблевой ржавчине и несущих ген *Sr2*, он находился в гетерозиготном состоянии.

Индивидуальные растения с идентифицированным генотипом устойчивости к стеблевой ржавчине сильно различались между собой по высоте (75–145 см), продуктивности колоса (1.0–2.7 г), массе 1000 зерен (36–60 г) и морфологическим признакам (наличие остей и наличие антоциана на органах). В 2015 г. потомство 373 индивидуальных растений (с идентифицированными генами *Sr* и отобранные по комплексу других хозяйственно ценных признаков) было высеяно для оценки устойчивости к болезням в двух географических точках: в Московской области и Краснодарском крае. Оценку поражения болезнями в Московской области проводили на естественном фоне развития, а в Краснодарском крае – на искусственном инфекционном фоне стеблевой ржавчины.

В 2016 г. в Московской области на посевах пшеницы сложились благоприятные условия для эпифитотийного развития стеблевой ржавчины. Очаг заболевания возник на озимой пшенице в фазе молочной спелости зерна, а затем перешел на посевы яровой пшеницы. Болезнь поразила стандартный сорт озимой пшеницы Московская 39 на 30–40 % с типом реакции на заражение 3–4 балла, это позволило провести четкую дифференциацию генотипов среди высеянного исходного материала по признаку устойчивости, а также оценить яровую коллекцию линий пшеницы с известными генами устойчивости *Sr* по эффективности отдельных генов в Московской области. При оценке коллекции линий с известными генами *Sr* в 2016 г. установлено, что по сравнению с 2013 г. спектр эффективных генов устойчивости к этому заболеванию сузился, что говорит о возможных мутационных процессах в популяции гриба или различных источниках возникновения эпифитотии. Если в 2013 г. эффективными были гены *Sr2*, *Sr9e*, *Sr13*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr28kt*, *Sr30*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr44*, *SrWld1* и сочетание генов $Sr13 + Sr17$ и $Sr31 + Sr38$, то в 2016 г. высокую устойчивость (поражение 0) или устойчивость (поражение до 1 % с типом реакции 1 балл) проявили только линии со следующими *Sr*-генами: *Sr28kt*, *Sr30*, *Sr31*, *Sr32* и *SrWld1*, а линии с генами *Sr9e*, *Sr17*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr33* и *Sr40* были умеренно устойчивы (поражение от 5 до 20 % с типом реакции 2 балла).

Оценка созданных линий озимой пшеницы к грибным болезням показала высокую устойчивость большинства генотипов к возбудителям бурой и стеблевой ржавчины и мучнистой росы. Восприимчивых к популяции *P. graminis* Московской области и расщепляющихся по этому признаку линий оказалось всего 14 из 373 высеянных (около 4 % генотипов). Устойчивых к *P. triticea* было еще больше (98.7 %). Линий, устойчивых к мучнистой росе с поражением до 10 % в тестируемом материале, было 147 (табл. 2). Выделено 136 линий с групповой устойчивостью к трем болезням.

Оценка 367 линий озимой пшеницы такого же происхождения в Краснодарском крае при искусственном заражении северокавказской популяцией стеблевой ржавчины

¹ Приложение см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx11.pdf>

Table 2. Evaluation of winter wheat lines for resistance to leaf and stem rust and to powdery mildew against the natural background in the Moscow region (2016)

Disease	Total number of lines	Number of selected immune and resistant lines	Number of susceptible and segregating lines recognized
Leaf rust	373	368	5
Stem rust	373	359	14
Powdery mildew	373	147	226

позволила выделить 146 иммунных линий (поражение 0) и 22 устойчивых линии (поражение до 5 %, тип реакции 1–2 балла), т. е. 46 % линий проявили устойчивость к этому заболеванию.

При сравнении результатов, полученных в Московской области и Краснодарском крае, выделено 50 генотипов, проявивших устойчивость в обеих географически отдаленных точках испытания.

У линий, высеянных в 2015 г. в Московской области, отмечались маркерные морфологические признаки, характерные для родительских форм скрещивания (наличие антоциана на стебле, ушках листа, пыльниках; наличие остей), а также дата колошения и выравнивание линий по высоте и морфотипу колоса. Только морфологически однородные номера без признаков расщепления вошли в выборку линий для проведения однофакторного дисперсионного анализа. Результаты этого анализа показали, что некоторые из линий достоверно превосходят стандартный сорт Московская 39 по продуктивности колоса. К тому же большинство линий имело более короткий стебель и не полегалло. Линии формировали крупное зерно и выколашивались на один-восемь дней раньше стандарта. В условиях эпифитотийного развития стеблевой ржавчины в Московской области в 2016 г. они проявили устойчивость, в то время как сорт Московская 39 поразила на 30 %. К тому же часть линий была высоко устойчива к *Blumeria graminis* и *P. tritici*.

Из 373 линий озимой пшеницы, созданных в процессе эксперимента, для дальнейшего испытания в селекционных питомниках Московской области отобрано 137, несущих различное сочетание генов устойчивости к грибным патогенам. При отборе ориентировались, в том числе, на высоту 85–100 см, продуктивность колоса 2.0–2.5 г, массу 1 000 зерен 45–59 г. Учитывали число дней до колошения и степень устойчивости к изучаемым болезням. В эту выборку вошло 49 устойчивых генотипов, проявляющих устойчивость к бурой, стеблевой ржавчине и мучнистой росе в Московской области, и устойчивых к бурой и стеблевой ржавчине в Краснодарском крае.

В табл. 3 приведено разнообразие линий по идентифицированным генам устойчивости *Sr* и некоторым хозяйственно ценным признакам в сравнении со стандартным сортом Московская 39 в условиях Московской области.

Предварительная оценка линий по качеству зерна (содержание белка и клейковины в зерне) на инфракрасном анализаторе показала повышенное значение этих показателей по сравнению с сортом Московская 39, который является эталоном качества в Нечерноземной зоне Российской Федерации. Колебание содержания белка в зерне у выделенных линий было в пределах 15.2–20.2 %, а клейковины – от 29.7 до 41.5 % (сорт Московская 39 имел 17.6 % белка и 31.4 % клейковины в зерне). Дополнительная оценка содержания клейковины в муке, проведенная на приборе Глютоматик, подтвердила высокое содержание клейковины у отобранных линий (37–61.3 %), но качество клейковины большинства линий соответствовало III классу (ИДК ед. шкалы прибора 92–114). (см. Приложение). Такая клейковина характеризуется как удовлетворительно слабая. Мука с такими показателями может быть использована в кондитерской промышленности для выпечки бисквитов и сдобного печенья (Быстров, Изосимов, 2007).

Обсуждение

Привлекая чужеродный материал «дикарей», селекционер почти всегда сталкивается с нежелательным генетическим грузом, ухудшающим хозяйственно ценные признаки сорта. Традиционными методами селекции в СИММИТ создано несколько сортов пшеницы с устойчивостью к расе Ug99 стеблевой ржавчины (Singh et al., 2011), которые возделываются в Кении и Эфиопии, однако их продуктивность недостаточно высока. Процесс выведения таких сортов традиционными методами селекции длителен и занимает более 10 лет. Поэтому исследования в этом направлении продолжают, а поиск новых источников устойчивости и избавление от негативных признаков и свойств дикорастущих сороричей, которые привносятся с генами устойчивости, остаются решающим моментом в создании устойчивых сортов. Как правило, сообщается, что устойчивость у выделенных источников и сортообразцов, полученных с их участием, детерминирована одним или двумя генами (Кохметова, Атишова, 2012; Lopez-Vera et al., 2014). Большинство же исследователей сходятся во мнении, что в сорте для придания ему длительной устойчивости необходима пирамида из двух-трех генов, причем должны сочетаться гены устойчивости взрослого растения и гены ювенильной устойчивости (Fetch, 2014; Bhavani, 2015).

В нашем случае на создание конкурентоспособного устойчивого к стеблевой ржавчине исходного материала озимой пшеницы с использованием молекулярных маркеров потребовалось всего шесть лет. Отдельные генотипы превзошли стандартный сорт по некоторым элементам продуктивности и содержанию белка и клейковины в зерне. Наличие двух, трех и более генов устойчивости к *P. graminis* у полученных линий мягкой пшеницы (см. табл. 3), которые включают ген устойчивости взрослого растения *Sr2* в сочетании с генами ювенильной устойчивости *Sr22*, *Sr32*, *Sr39* и *Sr40*, должно предотвратить быструю эволюцию патогена по генам вирулентности и обеспечить будущим сортам длительную устойчивость. Особенную ценность нашим линиям придает наличие мало изученных по отношению к другим расам *P. graminis* и редко используемых в селекционных программах генов

Table 3. Commercially valuable traits in some lines with an identified genotype of resistance to stem rust

Line	Pedigree	Genes	Days to heading	Height, cm	Grain per ear, g	1000 kernels weight, g
1-16	(113/119)/Д/Д	<i>Sr2h</i> ^{**} , 22, 47	257	90*	2.1	50.0
149-16	(113/119)/Д/Д/Д/	<i>Sr2h</i> , 22, 32	262	95	2.2	48.0
198-16	(113/96)/Д	<i>Sr31</i> , 36	268	130	1.9	52.0
167-16	(113/119)/Д/Д	<i>Sr2h</i> , 22, 36	260	83*	1.7	51.0
165-16	(96/113)/Д/96	<i>Sr2h</i> , 36	263	97	2.0	47.0
6-16	(96/113)/96/96	<i>Sr36</i>	265	130	2.5	48.0
38-16	(96/113)/96/96/96	<i>Sr2h</i> , 36	264	102	1.9	47.0
30-16	(96/113)/Д/Д/Д	<i>Sr2h</i> , 31, 47	260	86*	2.0	48.0
16-16	(113/119)/Д/Д/Д	<i>Sr22</i> , 32h, 36h	259	106	1.7	46.0
43-16	(113/96)/Д/Д/Д	<i>Sr2h</i> , 32, 40	259	78*	1.5	48.0
48-16	(113/96)/Д/96	<i>Sr2h</i> , 32h, 36h	260	93	2.4*	51.0
54-16	(113/96)/Д/Д	<i>Sr22</i> , 31, 32h, 36h	259	99	1.9	49.0
76-16	(113/96)/Д/Д	<i>Sr2h</i> , 32	260	76*	1.4*	45.0
85-16	(113/96)/96/96	<i>Sr2h</i> , 36, 47	262	99	2.0	45.0
86-16	(113/96)/96/96	<i>Sr2h</i> , 36	263	98	2.7*	49.0
99-16	(113/96)/119/96	<i>Sr2h</i> , 36, 39, 47	264	97	1.9	54.0
326-16	(113/96)/119	<i>Sr2</i> , 32	264	135	2.1	44.0
103-16	[(119/96) × (113 × 96)]/96	<i>Sr22</i> , 36	264	95	1.8	46.0
108-16	(113/96)/96/Д	<i>Sr2h</i> , 31, 36	260	97	1.0*	40.0
128-16	(113/96)/119/119	<i>Sr2h</i> , 22, 32	261	91	1.9	61.0
138-16	(113/96)/119/96/96	<i>Sr2h</i> , 22, 32	259	98	2.2	57.0
129-16	(119/96)/Д/Д	<i>Sr22</i> , 32	261	84*	2.1	63.0
124-16	(113/96)/Д/96	<i>Sr2h</i> , 31, 32	262	115	2.3	61.0
131-16	(119/96)/Д/96/96	<i>Sr31</i> , 36, 47	263	90*	1.8	49.0
Standard grade Moskovskaia 39			265	115	1.9	49.0
¹ LSD $p < 0.05$			–	25	0.5	***

¹ Least significant difference (LSD)

* Deviation from the reference significant at $p < 0.05$.

** *h*, heterozygous state of the gene.

*** $F_{obs} < F_{exp}$ (Fisher's test).

Sr32, *Sr39* и *Sr40* (Singh et al., 2011) с геном устойчивости взрослого растения *Sr2*, проявляющим эффект “slow rusting”.

В условиях эпифитотийного развития стеблевой ржавчины в 2016 г. при оценке коллекции из 44 яровых линий пшеницы с известными генами устойчивости *Sr* мы выявили гены, определяющие устойчивость к этому заболеванию в Нечерноземной зоне. Это гены: *Sr9*, *Sr10*, *Sr17*, *Sr24*, *Sr26*, *Sr25*, *Sr28*, *Sr30*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr35*, *Sr40*, *SrWld1* и сочетание генов *Sr7a+Sr12+Sr6* и *Sr13+Sr17*. Однако высокую устойчивость к стеблевой ржавчине проявили только шесть генов: *Sr26* ($1/1$), *Sr28* ($1/1$), *Sr31* ($1/0;-1$) и *Sr32* (0), *Sr35* ($1/1$), *SrWld1* ($1/1$), а также сочетание генов *Sr7a+Sr12+Sr6* ($1/1$). Остальные имели поражение от $1/2$ (*Sr10*) до $10/2-15/2-20/2$ (*Sr13+Sr17*, *Sr9e*, *Sr17*, *Sr24*, *Sr30*, *Sr33*) и даже $30/2$ (*Sr36*, *Sr40*). В созданных нами линиях озимой пшеницы присутствуют как высокоэффективные для нашей зоны гены устойчивости к стеблевой ржавчине (*Sr32*, *Sr31*, *Sr2*), гены, детерминирующие умеренную устойчивость к патогену (*Sr36*, *Sr40*), а также гены *Sr22*, *Sr47*, реакцию которых мы не знаем из-за отсутствия их в наборе тестируемой коллекции. Совокупность этих генов определила устойчивость генотипов как в Нечерноземной зоне, так и на Северном Кавказе. Это позволяет предполагать селекционную ценность созданного материала для обоих регионов.

Альтернативный, но дорогостоящий способ повышения иммунитета пшеницы к расе Ug99 стеблевой ржавчины предлагается коллективом исследователей из США, Австралии и Китая. Они делают ставку на использование генов *Sr35* (*T. monoccocum*) и *Sr33* (*Ae. tauschii*). Ген *Sr35* перенесен в геном мягкой пшеницы от *T. monoccocum*, где он сохраняет свою эффективность. Ген вызывает реакцию сверхчувствительности к ТТКСТ расе, однако растения с этим геном остаются восприимчивыми к некоторым другим расам стеблевой ржавчины. Поэтому рекомендуется дополнительно использовать ген *Sr33*, который обеспечивает умеренную устойчивость ко всем расам *P. graminis*. Предлагается объединить оба гена в геноме мягкой пшеницы или путем скрещивания и рекомбинации, или через трансформацию пшеницы с использованием генетической конструкции, включающей оба гена устойчивости (Periyannan et al., 2013; Saintenac et al., 2013; Grens, 2014). На ближайшее время запланировано создание трансгенных растений. Однако следует признать, что традиционная селекция, ускоренная использованием специфичных молекулярных маркеров, остается самым распространенным, доступным и пока наиболее эффективным способом получения генотипов пшеницы с генами устойчивости к ржавчинным болезням.

Успешное создание исходного материала мягкой пшеницы с различной пирамидой генов устойчивости в нашем случае обусловлено, в первую очередь, особенностью взятых в скрещивание образцов пшеницы, которые изначально отличались широким спектром *Sr*-генов, в том числе и эффективных генов к расе Ug99. Таким генетическим разнообразием линии обязаны наличию чужеродного генетического материала в родословной использованных доноров: *Triticum miguschovae* (*T. militinae/Aegilops tauschii*) (GT 96/90), *Ae. speloides*, *S. cereale* (119/96rw),

Ae. squarrosa (Донская полукарликовая), *Ae. triuncialis* и *T. kiharae* (113/00i-4), а в случае с образцами коллекции «Арсенал» – и использованию гамма-облучения пыльцы дикорастущих сородичей пшеницы. Этот подход приводит к возникновению у мягкой пшеницы множественных чужеродных транслокаций (Гайнуллин, Лапочкина, 2007). Ценность созданного исходного материала озимой пшеницы состоит в генетическом разнообразии и комбинации идентифицированных генов устойчивости к стеблевой ржавчине. На последнем этапе отбора протипа(ов) сорта(ов) предполагается верификация идентифицированных генов с использованием дополнительных маркеров. Наличие рецессивного гена устойчивости взрослого растения *Sr2* в гетерозиготном состоянии у большинства линий озимой пшеницы потребует дополнительных усилий для перевода его в гомозиготное состояние. В частности, нами запланированы эксперименты по получению дигаммоидных линий методом андрогенеза. Дополнительным достоинством некоторых линий является их устойчивость и к возбудителям бурой ржавчины и мучнистой росы.

Отобранные линии озимой мягкой пшеницы с несколькими эффективными генами *Sr* к расам стеблевой ржавчины Московской области и Краснодарского края отличаются по комбинации эффективных генов устойчивости и их числу в генотипе от генотипов устойчивости сортов мягкой пшеницы, созданных за рубежом и в России. Так, у сорта Pembina (Канада), устойчивого к Ug99, идентифицирован ген *Sr2*, у сортов из Казахстана (Э-607, Фитон 41) – ген устойчивости взрослого растения *Sr57*. Ряд сортов, выведенных в СИММИТ и возделываемых в Афганистане, Кении, Египте и Индии, содержит комплекс генов *Sr2+* (Baghlan 09, Kakaba, Baz) или *Sr2+SrTnp* (Koshan 09, Robin) или *Sr2+Sr25* (Mugawim 09, Misr1, Misr2, NR356), который обеспечивает умеренный уровень устойчивости к Ug99 (Singh et al., 2011). Линии озимой пшеницы, созданные в Казахском научно-исследовательском институте защиты и карантина растений, имеют единичные гены устойчивости *Sr22* или *Sr24* или сочетание двух генов *Sr22+Sr36* (Кохметова, Атишова, 2012). У сортов яровой пшеницы, выведенных в Западной Сибири и Поволжье, идентифицированы единичные гены *Sr25*, *Sr31*, *Sr36* или сочетание генов *Sr25+Sr31* (Лютесценс 310-00-10, Кинельская нива), *Sr31+Sr36* (Лютесценс 23528) (Шаманин и др., 2015). Гены *Sr25* и *Sr6Ai#2* обеспечивают устойчивость к стеблевой и бурой ржавчине сортам из Самарского НИИ сельского хозяйства и НИИ Юго-Востока благодаря сцепленности с генами *Lr19* и *Lr6Ai#2* (Ауреум 753, Ауреум 757, Линия 199, Линия 610) (Shamanin et al., 2016).

Мы предлагаем скорректировать программы селекционных центров России и вовлечь созданный озимый и яровой исходный материал в скрещивания с местными адаптированными сортами для их улучшения по признаку устойчивости к стеблевой ржавчине в зонах риска распространения и возможных регионах заноса этого заболевания. Для ускоренного получения константного материала индивидуальные отборы следует проводить, начиная с третьего-четвертого поколения с определением эффективных генов устойчивости с использованием специфичных молекулярных маркеров. Такие подходы менее затратны по сравнению с созданием трансгенных форм

растений мягкой пшеницы, а выведенные сорта станут барьером для распространения стеблевой ржавчины расы Ug99 в случае ее проникновения на территорию нашей страны.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research, project 13-04-00922 of 2013–2015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Baranova O.A., Lapochkina I.F., Anisimova A.V., Gajnullin N.R., Iordanskaya I.V., Makarova I.Yu. Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(3):316-322. (in Russian)
- Bhavani S. Presentation: Breeding durable adult plant resistance to stem rust in spring wheat: Progress made in a decade since the bunch of the Borlaug Global Rust Initiative.//BGRI Workshop. 2015. Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=GfWTH7lKiQs>.
- Bystrov A., Izosimov V. Relationship of the properties of wheat flour and the quality of flour confectionery. *Khleboproducty* = *Bread Products*. 2007;7:42-43. (in Russian)
- Fetch T. Surveillance of Ug99 stem rust and the search for new resistance genes, 2014. <https://www.globalrust.org/sites/default/files/fetch.pdf>
- Gainullin N.R., Lapochkina I.F. Identification of chromosome rearrangements in accessions of the “Arsenal” collection using SSR markers for the B genome. *Abstr. II Vavilov Int. Conf. “Genetic Resources of Cultivated Plants in the 21st Century: State, Problems, Perspectives”*. St. Petersburg, 2007; 253-254. (in Russian)
- Grens K. Putting Up Resistance. 2014. Available at: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/40085/title/Putting-Up-Resistance/>
- Jin Y., Szabo L.J., Pretorius Z.A., Singh R.P., Ward R., Fetch T.Jr. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 2008;92:923-926.
- Kokhmetova A.M., Atishova M.N. Identification of sources of resistance to wheat stem rust using molecular markers. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2012;2(6):486-493. DOI 10.1134/S2079059712060081
- Lapochkina I.F. Cytogenetic and morphological features of common wheat hybrids obtained with the use of irradiated pollen of *Aegilops triuncialis* L. *Rus. J. Genetics*. 1998;34(9):1063-1068.
- Lapochkina I.F., Baranova O.V., Shamanin V.P., Volkova G.V., Gainullin N.R., Anisimova A.V., Galinger D.N., Lazareva E.N., Gladkova E.V., Vaganova O.F. The development of initial material of spring common wheat for breeding for resistance to stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), including the Ug99 race, in Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(3):320-328. DOI 10.18699/VJ16.167. (in Russian)
- Leonova I.N. Molecular markers: Implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(2):314-325. (in Russian)
- Letta T., Maccaferri M., Badebo A., Ammar K., Ricci A., Crossa J., Tuberosa R. Searching for novel sources of field resistance to Ug99 and Ethiopian stem rust races in durum wheat via association mapping. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(5):1237-1256. DOI 10.1007/s00122-013-2050-8.
- Lopez-Vera E.E., Nelson S., Singh R.P., Basnet B.R., Haley S.D., Bhavani S., Huerta-Espino J., Xoconostle-Cazares B.G., Ruiz-Medrano R., Rouse M.N., Singh S. Resistance to stem rust Ug99 in six bread wheat cultivars maps to chromosome 6DS. *Theor. Appl. Genet.* 2014;127:231-239. DOI 10.1007/s00122-013-2212-8.
- Martynov S.P. Statistical and biometric-genetic analysis in plant industry and breeding. Program Package AGROS, version 2.09. Tver, 1999. (in Russian)
- Miedaner T., Korzun V. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding. *Phytopathology*. 2012;102:560-566. DOI 10.1094/PHYTO-05-11-0157.
- Mukhitov L.A. Resistance of wheat varieties of Orenburg selection to the major grain crops diseases under the conditions of South Urals forest-steppe zone. *Izvestiya Orenburgskogo Agrarnogo Universiteta* = *Proc. Orenburg Agrarian University*. 2011;4(32):61-63. (in Russian)
- Periyannan S., Moore J., Ayliffe M., Bansal U., Wang X., Huang L., Deal K., Luo M., Kong X., Bariana H., Mago R., McIntosh R., Dodds P., Dvorak J., Lagudah E. The gene *Sr33*, an ortholog of barley *Mla* genes, encodes resistance to wheat stem rust race Ug99. *Science*. 2013;341(6147):786-788. DOI 10.1126/science.1239028.
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. *Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. CIMMYT, Mexico, D.F., 1992.
- Rsaliev Sh.S. The virulence of new stem rust pathotypes in Kazakhstan. The Second All-Russian Conf. “Modern Problems of Immunity to Pests in Plants”. St. Petersburg, 2008;87-90. (in Russian)
- Saintenac C., Zhang W., Salcedo A., Rouse M.N., Trick H.N., Akhunov E., Dubcovsky J. Identification of wheat gene *Sr35* that confers resistance to Ug99 stem rust race Group. *Science*. 2013;341(6147): 783-786.
- Shamanin V.P., Morgunov A.I., Petukhovskiy S.L., Likhenko I.E., Levshunov M.A., Salina E.A., Pototskaya I.V., Trushchenko A.Yu. Breeding of spring soft wheat for resistance to stem rust in West Siberia. Ministry of Agriculture. Omsk Stolypin State Agrarian University, 2015. (in Russian)
- Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Morgunov A.I., Chursin A.S., Shepelev S.S., Pozerukova I.E., Klevakina M.V. Breeding of spring bread wheat for resistance to stem rust in southern forest-steppe of Western Siberia. *Proc. Int. Scientific and Research Conf. with Elements of School for Young Scientists and Students. Bolshie Vyazemy, Moscow oblast.* 2016; 283-288. (in Russian)
- Shamanin V., Salina E., Wanyera R., Zelenski Y., Olivera P., Morgunov A. Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. *Euphytica*. 2016;212:287-296. DOI 10.1007/s10681-016-1769-0.
- Sibikeev S.N., Voronina S.A., Druzhin A.E., Badaeva E.D. Study of resistance to leaf and stem rust in *Triticum aestivum*–*Aegilops speltoides* lines. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2016;6(4):351-356. DOI 10.1134/S2079059716040183.
- Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Jin Y., Bhavani S., Njau P., Herrera-Foessel S., Singh P.K., Singh S., Govindan V. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011;49:465-481. DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095423.

Stakman E.C., Levine M.N. The determination of biologic forms of *Puccinia graminis* on *Triticum* spp. Minn. Agric. Res. Stn. Bull. 1922;8:1-10.

Volkova G.V., Kremneva O.Yu., Shumilov Yu.V., Sinyak E.V., Vaganova O.F., Danilova A.V., Trofimova I.A. Intraspecific and intrapopulational diversity of winter grain pathogens in southern Russia. Modern Mycology in Russia. Proceedings of the III Int. Mycological Forum. 2015;(5):155-156. (in Russian)

Volkova G.V., Shumilov Yu.V., Gladkova E.V., Vaganova O.F. Efficiency of known genes for resistance to North Caucasian populations of yellow, stem, and brown rust agents. Nauka Kubani = Science of Kuban. 2016;(2):17-23. (in Russian)

Volkova G.V., Sinyak E.V. Stem rust of wheat. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2011;11:14-16. (in Russian)

ORCID ID

I.F. Lapochkina orcid.org/0000-0002-2328-2798

O.A. Baranova orcid.org/0000-0001-9439-2102

N.R. Gainullin orcid.org/0000-0002-0970-662X



Characterization of resistance of winter wheat varieties to *Fusarium* head blight

T.Yu. Gagkaeva¹✉, A.S. Orina¹, O.P. Gavrilova¹, I.B. Ablova², L.A. Beshpalova²

¹ All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

² National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

In this study, naturally and artificially inoculated winter wheat varieties were studied with respect to their productivity and resistance to *Fusarium* head blight (FHB). We used the following set of disease assessment parameters: the percentage of visually and latent *Fusarium*-damaged grains (FDG); the DNA content of *Fusarium* fungi; the productivity of inoculated plants compared with non-inoculated plants; and the amount of mycotoxins in the grain. In case of naturally infected grains, the average FDG was found to be about 6.1 % (range of 0–15 %). The amount of DNA of *Fusarium graminearum* was found to be in the range of $(1.1–42.7) \times 10^{-5}$ ng/ng wheat DNA. The mycotoxin deoxynivalenol (DON) was detected in 15 samples of grain from plants that were grown under natural infection. The maximum DON amount was found to be 420 µg/kg. Fumonisin B₁ (FB₁) was not detected in naturally infected grain. In case of artificially inoculated plants, the average FDG was found to be 25.8 % (2–54 %). The amount of *F. graminearum* DNA was found to be significantly higher $(4.24–49.8) \times 10^{-3}$ ng/ng than it was detected in grain of non-inoculated plants. The wheat varieties inoculated with *F. graminearum* contained DON in high amounts from 20255 to 79245 µg/kg. Furthermore, a significant amount of FB₁ was detected in all wheat varieties in the range of 980–20326 µg/kg. Among the analysed wheat varieties, Adel was characterized to be the most resistant to fungal infection as well as to the contamination by mycotoxins. Antonina, Lebed and Pamyat varieties were classified more relatively resistant than that of other varieties, and Utrish variety was found to be the most susceptible to FHB. The similar resistance of wheat varieties against *F. graminearum* and *F. verticillioides* infection was recorded, and the interactions between the fungi during the colonization of grain were shown.

Key words: wheat; varieties; resistance; fungi; *Fusarium*; DNA; mycotoxins; artificial inoculation; quantitative PCR.

Характеристика сортов озимой пшеницы по устойчивости к фузариозу зерна

Т.Ю. Гагкаева¹✉, А.С. Орина¹, О.П. Гаврилова¹,
И.Б. Аблова², Л.А. Беспалова²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

² Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

По продуктивности и устойчивости к фузариозу на естественном фоне инфекции и на фоне искусственной инокуляции грибом *Fusarium graminearum* исследовали 17 сортов озимой пшеницы селекции Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко. Оценка сортов проводили на основании показателей, описывающих различные типы устойчивости: процентное содержание фузариозных зерен, выявленных по внешним признакам и в результате микологического анализа, а также содержание ДНК грибов *Fusarium*; показатели продуктивности инокулированных растений в сравнении с неинокулированными; количество микотоксинов в зерне. На естественном фоне, согласно результатам микологического анализа, зараженность зерна грибами рода *Fusarium* была в среднем 6.1 % (0–15 %), количество ДНК *F. graminearum* варьировало в диапазоне $(1.1–42.7) \times 10^{-5}$ нг/нг ДНК пшеницы, дезоксиниваленол (ДОН) обнаружен в 15 образцах с максимальным содержанием 420 мкг/кг, а фумонизин B₁ (ФВ₁) не выявлен. На искусственном инфекционном фоне зараженность зерна составила 25.8 % (2–54 %), количество ДНК *F. graminearum* было значительно выше, чем в естественных условиях, и варьировало в пределах $(4.24–49.8) \times 10^{-3}$ нг/нг. Образцы зерна всех сортов пшеницы, выращенных на искусственном инфекционном фоне *F. graminearum*, содержали ДОН в высоких количествах – от 20255 до 79245 мкг/кг. Выявлено значительное содержание ФВ₁ в диапазоне от 980 до 20326 мкг/кг. Сорт Адель охарактеризован как высокоустойчивый к заражению грибами и накоплению микотоксинов. К относительно устойчивым отнесены сорта Антонина, Лебедь, Память, а наиболее восприимчивым оказался сорт Утриш. Установлены сходство реакций устойчивости сортов пшеницы к заражению *F. graminearum* и *F. verticillioides* и существующие между грибами взаимодействия в процессе колонизации зерна.

Ключевые слова: пшеница; сорта; устойчивость; грибы; *Fusarium*; ДНК; микотоксины; инфекционный фон; количественная ПЦР.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Gagkaeva T.Yu., Orina A.S., Gavrilova O.P., Ablova I.B., Beshpalova L.A. Characterization of resistance of winter wheat varieties to *Fusarium* head blight. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):685–692. DOI 10.18699/VJ18.411

Received 26.03.2018

Accepted for publication 08.07.2018

© AUTHORS, 2018



e-mail: t.gagkaeva@mail.ru

In ecological farming, one of the major thrusts is the cultivation of crops that are resistant to various biotic and abiotic stress factors. Obtainment and selection of specific plant forms along with the creation of prospective gene pools is a complicated long-term work of scientific teams, bringing a spectrum of high-productive varieties with different amounts of resistance to particular environmental stress factors (Bespalova et al., 2012, 2017; Ablova et al., 2014). Large-scale cultivation essentially helps in the breeding of crop varieties, as they must be both best adapted to the conditions of the site and resistant to some of the most harmful diseases. Thus, potential productivity of that particular variety can be maximized, which helps to increase the gross grain harvest of high-quality wheat.

Fusarium head blight (FHB) of wheat is one of the most destructive diseases in the south of European part of Russia (Gagkaeva et al., 2014). Some widespread species of *Fusarium* fungi produce various mycotoxins which can cause serious health problems in humans and animals who consume contaminated grains. In Northern Caucasus, including the Krasnodar region, severe epidemics of FHB were recorded for wheat in the years 1988, 1992, 1993, 2014, 2016 and 2017, and moderate FHB epidemic cases were also recorded in the years 1984–1987, 1990, 1991, 1997, 1998, 2001, 2004, 2006 and 2012. Scientific research and practical work aimed at preventing the loss of grain quality due to infection with *Fusarium* and contamination with mycotoxins are highly sought after.

The *F. graminearum* Schwabe is the dominant pathogen of wheat grain grown in North Caucasian region. The pathogen produces deoxynivalenol (DON), a major trichothecene mycotoxin that may accumulate in grains at levels considered unsafe for both human and animal consumption. *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg and *F. proliferatum* (The Matsushima) Nirenberg, representatives of *Gibberella fujikuroi* species complex, also infect cereals in the South of Russia. The latter fungi are the main fungal species producing fumonisin mycotoxins, especially fumonisin B₁ (FB₁) comprising up to 70–80 % of the total group of those secondary metabolites (Alexander et al., 2009).

Assessment of plants for their resistance to FHB is a complicated process, since visually detected symptoms of infection are not always distinguishable as they depend on the environmental conditions and peculiarities of the plant morphology. Moreover, host resistance to FHB has been classified into five types, each of which is believed to be independent in assessing a genotype: types I–V. Types I and II refers to the resistance of the plants towards fungal penetration and spread of the disease symptoms in the spike, type III refers to the resistance of the grains to the pathogen, type IV refers to the tolerance, and type V is the ability to mycotoxin accumulation and/or degradation (Mesterhazy, 2002). For the multi-component evaluation of the resistance of wheat to FHB, different techniques have been applied varying by labour input, efficiency and accuracy of the results obtained.

In this study, we aimed to characterize the resistance of naturally and artificially infected winter wheat varieties to FHB. The varieties were evaluated by the disease assessment parameters that describe different types of host resistance: in case of type III resistance, the percentage of *Fusarium*-

damaged grains (FDG) detected by visual and mycological analysis along with the fungal DNA content were used; type IV resistance was evaluated by comparison of the grain yield in inoculated versus non-inoculated plants treated by fungicide and V type resistance was measured by the quantitative analysis of mycotoxins in the grain.

Materials and methods

Grain samples. In this study, the following 17 winter wheat varieties, created by the breeders from the National Center of Grain (Krasnodar, Russia), were used: Adel, Alekseich, Antonina, Bagrat, Bezostaya 100, Brigada, Vassa, Velena, GROM, Gurt, Kurs, Lebed, Morozko, Pamyat, Tanya, Utrish and Yuka. These varieties were grown in the Krasnodarsky region in 2016 under the natural and artificial infections according to the standard crop husbandry practices at the National Center of Grain.

Field tests. With respect to natural infection, wheat varieties were grown after growing sunflower as a previous crop at fungicide-free experimental plots measuring 10 m². In case of artificial infection, the same set of varieties was cultivated on another field after siderating and was artificially inoculated with *F. graminearum* during the flowering period. On the experimental plot where artificial inoculation was performed, the control plants (non-inoculated plants) of each variety with the application of fungicide were undertaken.

When at midanthesis, wheat heads were inoculated with a conidial suspension (total concentration of $3\text{--}5 \times 10^6$ spores/mL) at a rate of 100 mL/m² using a knapsack sprayer (Ablova, Taranenko, 2004). At harvest, grain from all plots were individually bagged and retained for further analyses.

Plant productivity analysis. The wheat varieties were classified based on their height and according to the classification worked out in the National Center of Grain (Bespalova et al., 2017). The productivity characteristics (total grain weight per the head of the main stem and 1000-grain weight) were evaluated (Babayantz et al., 1988). Post-harvest assessment of grain for FHB on the artificially inoculated plants included determination of percentage *Fusarium*-infected grains that were visually detected in the sample by distinguishable signs of damage (shriveled, pale and pink coloured).

Mycological assessment of grain infection. To evaluate the latent *Fusarium* infection and species composition, the grains of each sample were surface sterilized in 5 % sodium hypochlorite and washed by sterilized water. Finally, 100 surface-sterilized grains were placed per Petri plates onto the potato-sucrose agar medium and incubated in the dark at 24 °C. After seven days, the latent fungal infection was registered and *Fusarium* species were identified (Gerlach, Nirenberg, 1982).

Molecular diagnostic assay. The grain samples (20 g) were homogenized in sterilized grinding chambers of a batch mill Tube Mill Control (IKA). Total DNA from 200 mg of ground grains and DNA of *F. graminearum* and *F. verticillioides* fungal mycelium were extracted with the Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). The DNA content of wheat per total DNA sample was evaluated by quantitative PCR (qPCR) method with SYBR Green dye, while fungal DNA was quantified with qPCR with TaqMan probes. The

Table 1. Oligonucleotide primers and probes used in this study

Target object	Primers and probes	Nucleotide sequences (5'→3')	References
Wheat	Hor1,f	TCTCTGGGTTTGAGGGTGAC	Nicolaisen et al., 2009
	Hor2,r	GGCCCTTGTAACAGTCAAGGT	
<i>F. graminearum</i>	TMFg12,f	CTCCGGATATGTTGCGTCAA	Yli-Mattila et al., 2008
	TMFg12,r	CGAAGCATATCCAGATCATCCA	
	TMFg12,p	FAM-TGAGAATGTCTTGAGGCAATGCGAACTTT-BHQ1	
Tri- <i>Fusarium</i> *	TMTrif	CAGCAGMTRCTCAAGGTAGACCC	Halstensen et al., 2006
	TMTrir	AACTGTAYACRACCATGCCAAC	
	TMTrip	Cy5-AGCTTGGTGTGGGATCTGTCCTTACCG-BHQ2	
Fum- <i>Fusarium</i> *	fum1_fw	ATGCAAGAGGCGAGGCAA	Preiser et al., 2015
	fum1_rev	GGCTCTCAGAGCTTGGCAT	
	fum1_probe	Cy5-CAATGCCATCTTCTTGAACCT-BHQ2	

* Tri-*Fusarium* and Fum-*Fusarium* are trichothecene- or fumonisin-producing *Fusarium* species, respectively.

amount of DNA of *F. graminearum*, the group of fungal species producing trichothecene mycotoxins (Tri-*Fusarium*) and of those producing fumonisins (Fum-*Fusarium*), were determined in every total DNA samples. Table 1 presents the sequences of using primers and probes for qPCR. All qPCR assays were run using the CFX 96 Real-Time System (BioRad) thermocycler. DNA solutions of the *Fusarium* strains were diluted to 10 ng/μL and used to construct calibration curves in subsequent dilutions of factors of 10 from 10⁻¹ to 10⁻⁶ ng/μL. Fold-differences and standard error were calculated from Ct values, which were normalized against the DNA of pure cultures of *F. graminearum* and *F. verticillioides* using Bio-Rad CFX Manager 1.6 software package. DNA content was presented as the ratio of fungal DNA to wheat DNA in each sample (ng/ng).

Analysis of mycotoxins. DON and FB₁ were quantified by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Mycotoxins were extracted from 1 g of ground grain with 5 mL of acetonitrile:water mixture (volume proportion 84:16) for 14–16 h by shaking in a horizontal shaker S-3M (ELMI) at 300 rpm. Diagnostic test-systems 'Deoxynivalenol-ELISA' and 'Fumonisin-ELISA' (Russia) were used. Detection limits for both mycotoxins were 20 μg/kg.

Statistical analysis. All samples were analysed at least twice. Data were analysed by using Microsoft Office Excel 2007 and Statistica 10.0 (ANOVA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Height of plants and characteristics of productivity. The height of wheat plants varied substantially from 87 to 125 cm; therefore, based on their heights, wheat varieties were subdivided into four groups: tall, medium, short-stemmed and semi-dwarf. The variety Adel was grouped under the tall category (more than 120 cm); Bagrat, Brigada, Bezostaya 100, Vassa, Kurs, Lebed, Morozko, Pamyat and Yuka were grouped under medium categories (up to 120 cm). The group of short-stemmed varieties (up to 105 cm) comprised Antonina, Velen, Gurt and Utrish, whereas the varieties Alekseich, GROM and Tanya were grouped under semi-dwarf varieties.

In the control samples of every variety after the application of fungicide, the 1000-grain weight varied from 35.8 g (Velen) to 51 g (Vassa); the grain weight per head varied from 1.6 g (Morozko) to 2.95 g (Vassa).

Grain infection with *Fusarium* fungi. In wheat varieties, grain infection with *Fusarium* fungi was determined by two methods: conventional mycological method and visual counting of the number of grains with distinguishable signs of the disease (for artificial infection only). Under natural infection, mycological analysis detected the latent *Fusarium* infection on an average of 6.1 % with the maximum content (15 %) being registered for the variety Utrish (Table 2).

The main representative of fungi in grain was *F. graminearum*; its share of the number of all *Fusarium* fungi was 34.8 %. *F. sporotrichioides* Sherb., *F. tricinctum* (Corda) Sacc., *F. semitectum* Berk. & Ravenel, *F. equiseti* (Corda) Sacc. and *F. verticillioides* infected the wheat grains more rarely.

In case of artificial infection, the number of distinguishable FDG varied from 13.3 to 63.1 % per sample (average, 33.8 %) (Table 3). According to the data of the mycological analysis, latent infection of grain accounted for 2.0–54.0 % (average, 25.8 %). In case of both methods, the maximum values of FDG were recorded for the variety Utrish, and the minimum values were recorded for the variety Adel. Varieties Pamyat, Lebed, Antonina and Velen showed low levels of infection.

In the grains of all varieties of wheat, not only *F. graminearum* infection, which was used to inoculate plants, but also the presence of *F. verticillioides*, was recorded. It is noteworthy that the infection by the latter species was on an average about 11.5 times greater than infection by *F. graminearum*. In addition, single cases of *F. proliferatum* occurrence were recorded (grain infection by less than 1–2 %). This shows that the fungus *F. verticillioides* is the main producer of FB₁. In case of grain of wheat grown under artificial inoculation, other species of *Fusarium* fungi were not detected.

Content of fungal DNA in grain. In case of all wheat varieties grown under natural infection, the amount of *F. graminearum* DNA was found to vary within a range of (1.1–42.7) × 10⁻⁵ ng/ng. Based on this, the varieties were grouped under three categories: the first one comprised relatively

Table 2. Characteristics of wheat varieties grown under natural infection of *Fusarium* fungi

Variety	Grain infection, %	Fungal DNA to wheat DNA $\times 10^{-5}$, ng/ng			DON, $\mu\text{g/kg}$
		<i>F. graminearum</i>	Tri- <i>Fusarium</i> *	Fum- <i>Fusarium</i> *	
Adel	2	1	14	0	0
Alekseich	2	3	21	0	0
Antonina	6	10	41	0	62
Bagrat	5	5	23	3	130
Bezostaya 100	6	6	19	0	43
Brigada	11	43	42	0	421
Vassa	10	5	21	0	134
Velena	6	13	34	0	166
GROM	8	5	19	0	189
Gurt	2	3	28	0	33
Kurs	4	1	16	0	50
Lebed	7	1	17	0	11
Morozko	6	4	15	0	54
Pamyat	6	10	31	2	172
Tanya	4	1	20	0	12
Utrish	15	15	29	0	162
Yuka	3	3	34	0	24
CV, %	57	129	36	294	109

* Tri-*Fusarium* and Fum-*Fusarium* are trichothecene- or fumonisin-producing *Fusarium* species, respectively; CV – coefficient of variation.

Table 3. Characteristics of wheat varieties grown under artificial infection of *F. graminearum*

Variety	1000-grain weight, g	Grain weight per the head, g	<i>Fusarium</i> -damaged grain, %		Fungal DNA to wheat DNA $\times 10^{-3}$, ng/ng*		Mycotoxin, $\mu\text{g/kg}$	
			visible	latent	<i>F. graminearum</i>	Fum- <i>Fusarium</i> *	DON	FB ₁
Adel	38.0	1.9	13	2	7	5	23069	1471
Alekseich	39.6	2.0	31	42	15	17	35330	1800
Antonina	32.4	1.4	24	14	4	5	29557	4435
Bagrat	30.8	1.3	52	12	16	9	73502	5519
Bezostaya 100	38.0	1.9	46	27	15	5	46574	2172
Brigada	29.2	1.4	25	33	11	8	20255	980
Vassa	27.6	1.2	55	38	21	19	50655	5475
Velena	38.6	2.2	24	13	12	7	60901	3800
GROM	31.6	1.1	44	44	23	5	51708	4360
Gurt	31.1	1.2	34	20	15	9	53048	6358
Kurs	30.1	1.1	41	22	22	7	44124	1693
Lebed	32.3	1.6	15	13	14	6	46572	1725
Morozko	27.2	1.5	35	13	10	3	66193	1525
Pamyat	32.7	1.2	13	30	7	7	41174	2898
Tanya	31.9	1.7	25	39	16	9	45471	4105
Utrish	38.0	1.9	63	54	50	45	55019	20326
Yuka	27.7	1.3	33	23	17	9	76401	9288
CV, %	12.7	22.1	43	55	62	95	33	101

* Fum-*Fusarium* – fumonisin-producing species; CV – coefficient of variation.

high-resistant varieties (less than 3×10^{-5} ng/ng) such as Adel, Tanya, Lebed, Kurs, Gurt and Yuka than that of other varieties; The second group was composed of medium-resistant varieties (from 3×10^{-5} to 6×10^{-5} ng/ng) such as Alekseich, Morozko, GROM, Vassa, Bagrat and Bezostaya 100 and the third group included relatively susceptible varieties (more than 6×10^{-5} ng/ng) such as Utrish, Antonina, Pamyat, Velen and Brigada. In case of all samples, the Tri-*Fusarium* DNA was also detected in the range of $(13.9-42.3) \times 10^{-5}$ ng/ng. On the contrary, the Fum-*Fusarium* DNA was detected only in two wheat varieties, namely, Pamyat and Bagrat, with average amounts of DNA of 1.9×10^{-5} ng/ng and 3.3×10^{-5} ng/ng, respectively.

In case of wheat varieties that were artificially inoculated, the grain samples contained significantly more amount of DNA of *F. graminearum* than that of naturally infected wheats; it varied within a range of $(4.24-49.8) \times 10^{-3}$ ng/ng. Varieties Antonina, Pamyat, Adel and Morozko demonstrated the lowest level of fungal DNA than that of other varieties, whereas the largest amount was recorded for Utrish, Vassa, Kurs and GROM varieties. The grain samples of artificially inoculated plants were found to contain $(3.4-44.8) \times 10^{-3}$ ng/ng of Fum-*Fusarium* DNA. Similar to *F. graminearum*, the largest amount of Fum-*Fusarium* DNA was recorded in the grain samples of Utrish, Vassa and Alekseich varieties and the lowest content was recorded for Antonina, GROM, Bezostaya 100 and Morozko varieties.

Content of mycotoxins in grain. In case of natural infection, DON was detected in the grain of 15 wheat varieties, but the other two varieties, namely, Adel and Alekseich did not show its presence. Maximum DON content ($420 \mu\text{g/kg}$) was detected in the grain of Brigada variety, which also contained the maximum amount of *F. graminearum* DNA. In the wheat grown under natural infection, the samples of grain did not show the presence of mycotoxin FB_1 .

Under artificial inoculation with *F. graminearum*, all grain samples showed the presence of DON, varying from 20255 to $79245 \mu\text{g/kg}$. Varieties Yuka and Bagrat showed the maximum levels. FB_1 was present in the range of $980-20326 \mu\text{g/kg}$ in all wheat varieties. The minimum content of FB_1 was detected in Brigada variety, whereas the maximum content was detected in Utrish variety. In grain of Bagrat, Vassa, Gurt and Yuka, the FB_1 content exceeded the average value for this mycotoxin ($4584 \mu\text{g/kg}$) as well.

Discussion

Yield of grains allows us to assess the productivity of wheat varieties and their responses to growing conditions. The productivity of wheat varieties was demonstrated by low coefficients of variation of both the 1000-grain weight (12.7 %) and the grain weight per head (22.1 %). This shows that the breeding of varieties was focused on high crop yields and on this basis they were only slightly different.

The coefficient of variation of *F. graminearum* DNA content in grains under natural infection was found to be about 126.3 %. At the same time, the Tri-*Fusarium* DNA content was found to be more levelled; its coefficient of variation being 36.0 %. Despite the significant amount of correlation between the amounts of Tri-*Fusarium* and *F. graminearum* DNA (+0.68), there is a considerable range in the values of this

parameter, which leads us to the following conclusion: wheat genotypes should be compared not by the total DNA content of all trichothecene-producing *Fusarium* species of different pathogenicity (*F. cerealis* (Cooke) Sacc., *F. culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., *F. langsethiae* Torp et Nirenberg, *F. poae* (Peck) Wollenw., and *F. sporotrichioides*, etc.), but by the DNA content of the highly aggressive species, that is, *F. graminearum*.

In the wheat varieties grown under natural infection, a significant association was established between the infection of the grain revealed on the agar medium and the contents of *F. graminearum* DNA (+0.59) and DON (+0.66) and between the latter two characteristics (+0.90) (Table 4).

The ratio of *F. graminearum* DNA to the total content of Tri-*Fusarium* DNA was found to be more than 1:10 in the relatively resistant varieties, namely, Adel, Tanya, Lebed, Kurs, Gurt and Yuka. They were able to withstand the penetration of less pathogenic species compared to the highly aggressive *F. graminearum*. On the contrary, in the grains of susceptible varieties, significant amounts of DNA of not only *F. graminearum*, but also of Tri-*Fusarium* fungi were found with relatively weak expression of pathogenic activity.

In case of natural infection, with respect to the sum of the FDG characteristics (the type III resistance), the following varieties were categorized as relatively resistant: Adel, Lebed, Tanya, Yuka, Gurt and Kurs; the varieties Utrish and Bagrat appeared to be susceptible. Under natural infection, the DON levels found in the grain were low for the possibility of varieties ranking by the V type of resistance.

However, a substantial correlation between the *F. graminearum* DNA and DON (+0.90) levels and a lower correlation between the Tri-*Fusarium* DNA and DON (+0.55) levels confirm that *F. graminearum* plays a major role in grain infection and mycotoxin contamination under natural infection.

In case of artificial inoculation, a significant and positive correlation was recorded between the number of FDG that were visually revealed as well as detected by the mycological analyses (+0.50) (Table 5). In addition, there was a significant and positive correlation between the aforementioned parameters and the contents of the *F. graminearum* and Fum-*Fusarium* DNA. Nevertheless, only the number of grains with visually detected symptoms showed significant negative correlation with productivity characteristics, namely, the grain weight per head and the 1000-grain weight.

Values of the presence of *F. graminearum* DNA and its metabolite DON in the grain were levelled, the coefficients of variation being 62 and 33 %, respectively. Grain infection by *F. verticillioides* and FB_1 contamination values was much more considerable; the respective coefficients of variation were found to be about 95 and 101 %. The total numbers of FDG (visually damaged and latent) was positive correlated only with the percentage of *F. verticillioides* infection and the latter was correlated with the DNA contents of both Fum-*Fusarium* and *F. graminearum*.

Artificially inoculated varieties – Adel, Pamyat, Morozko and Antonina – appeared to be relatively high-resistant than that of naturally infected varieties, whereas Utrish, Vassa, GROM and Alekseich were found to susceptible to *Fusarium* fungal infection. The lowest amounts of DON and FB_1 were found in the varieties Adel, Brigada and Antonina. The variety

Table 4. Correlation coefficients between measured parameters characterizing wheat varieties under natural infection of *Fusarium* fungi

Parameters	<i>Fusarium</i> -damaged grain	Fungal DNA		
		<i>F. graminearum</i>	Tri- <i>Fusarium</i>	Fum- <i>Fusarium</i>
<i>F. graminearum</i> DNA	+0.59*			
Tri- <i>Fusarium</i> DNA	+0.27	+0.68*		
Fum- <i>Fusarium</i> DNA	–0.07	–0.02	+0.02	
DON	+0.66*	+0.90*	+0.55*	+0.16

* Significant at $p < 0.05$.

Table 5. Correlation coefficients between measured parameters characterizing wheat varieties under artificial infection of *F. graminearum*

Parameters	Height of plants	1000-grain weight	Grain weight per the head	<i>Fusarium</i> -damaged grain		Grain infection		Fungal DNA		DON
				visual	latent	<i>F. graminearum</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. graminearum</i>	Fum- <i>Fusarium</i>	
1000-grain weight	+0.20									
Grain weight per the head	+0.18	+0.82*								
<i>Fusarium</i> -damaged grain										
visual	–0.28	–0.54*	–0.64*							
latent	–0.58*	–0.08	–0.39	+0.50*						
Grain infection by <i>F. graminearum</i>	–0.30	–0.10	–0.30	+0.12	+0.27					
Grain infection by <i>F. verticillioides</i>	–0.51*	–0.19	–0.27	+0.54*	+0.63*	+0.23				
DNA of <i>F. graminearum</i>	–0.26	–0.23	–0.41	+0.75*	+0.66*	+0.09	+0.56*			
DNA of Fum- <i>Fusarium</i> *	–0.25	–0.13	–0.30	+0.60*	+0.65*	–0.25	+0.52*	+0.87*		
DON	–0.32	–0.41	–0.15	+0.47	–0.05	+0.08	+0.48	+0.30	+0.11	
FB ₁	–0.31	–0.14	–0.23	+0.59*	+0.48	–0.08	+0.63*	+0.83*	+0.85*	+0.39

* Significant at $p < 0.05$.

Alekseich appeared to accumulate more DON in its grains, whereas the varieties Tanya and Alekseich accumulated more FB₁. Our study showed some contradictory results with respect to the types of resistance of some varieties. For example, the variety Brigada exhibited a resistance to FDG and accumulation of DON under artificial inoculation, despite its high susceptibility as shown under natural infection. The variety Alekseich was characterized as relatively resistant based on the fungal DNA content and the amount of mycotoxins, although it demonstrates high fungal infection. In case of variety Vassa, no infection with *F. graminearum* was revealed by the mycological analysis, but the *F. graminearum* DNA and DON contents were detected in mean values, whereas the Fum-*Fusarium* and FB₁ contents were found to be high. These differences may be attributed to the interactions of fungi and/or environmental conditions. We did not expect a considerable infection of grains with *F. verticillioides* in case of artificially inoculated plants with *F. graminearum* at midanthesis. Probably, the residues of

maize plants from the neighbouring field may have provided the source of infection. *F. verticillioides* is the most commonly reported fungal species infecting maize and is able to remain long on the crop residues even after harvesting (Dill-Macky, Jones, 2000; Maiorano et al., 2008). The reported measures revealed significant negative correlation between the height of wheat varieties and the *F. verticillioides* infection of the grains (–0.51), which proves the role of plant residues on the soil surface as a source of infection. However, there was no association between the plant height and the *F. graminearum* infection mainly resulting from spraying of wheat varieties by the suspension of conidia. On an average, the *F. verticillioides* infection was more than 10 times as high as the *F. graminearum* one (Figure). Nonetheless, for *F. verticillioides*, the infection correlated with the number of visually FDG (+0.54) and latent *Fusarium* infection of grain (+0.63), but no correlation was detected with *F. graminearum*. *F. verticillioides* infection was also significantly associated with the amounts of both FB₁ (+0.63) and DNA of the analysed fungi (+0.52 and +0.56). On an

average, the *F. graminearum* DNA content was comparable to the Fum-*Fusarium*, although the amount of DON greatly exceeded the amount of FB₁.

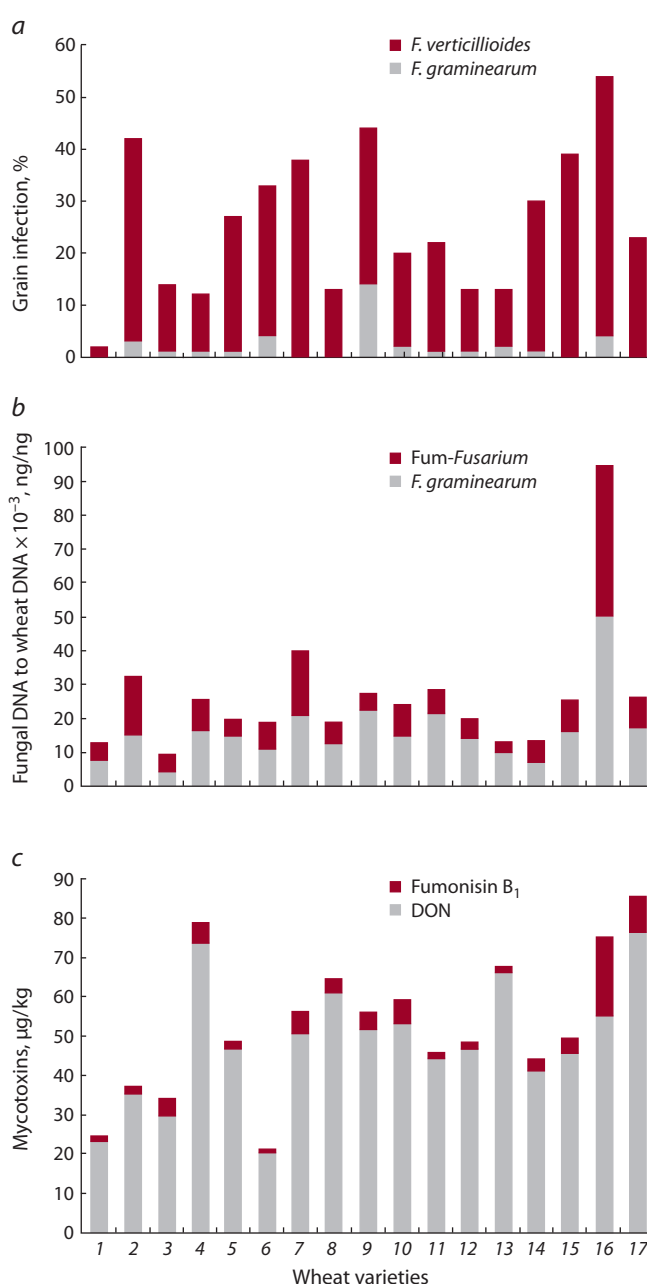
The results demonstrate that in case of high fungal infection, the percentage of grain infection with *F. graminearum* was not associated with as DNA content of this pathogen, nor with the amount of DON. In this case unexpectedly the significant positive correlations between the *F. graminearum* DNA and Fum-*Fusarium* DNA (+0.83) and also FB₁ (+0.87) were detected. Probably, *F. graminearum* contributes to the plant colonization by *F. verticillioides* and its production of the mycotoxin. DON is known to be the aggressiveness factor of *F. graminearum*, which promotes the spread of the pathogen over the plant tissue (Alexander et al., 2009; Audenaert et al., 2013). On the contrary, fumonisins are not so important for *F. verticillioides* infection of maize, as no dependence was found between the aggressiveness of fungal isolates and their ability to the production of fumonisins (Desjardins, Plattner, 2000; Desjardins et al., 2002; Presello et al., 2006; Iglesias et al., 2010). In co-inoculation of maize with *F. graminearum* and *F. verticillioides*, French researchers showed that *F. verticillioides* has competitive advantages over the *F. graminearum* strains and that previous inoculation with *F. graminearum* in maize ears can facilitate subsequent infections by *F. verticillioides* (Picot et al., 2012).

Occurrence of the fungi within a grain sample or even a single grain inevitably leads to their interactions, which influences the production of secondary metabolites. Usually, fumonisins are revealed in maize grain. However, increasing areas of maize cultivation are bound to bring about the increase in importance of fumonisins upon other cultures, including small grain cereals. In spite of growing occurrence of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and their mycotoxins in wheat and barley grain, information regarding the interactions of those fungi and plant species is still unknown (Stanković et al., 2011). Thus, concurrent presence of both trichothecene and fumonisins mycotoxins seriously deteriorates the edibility and forage quality of the grain harvest.

It is essential to enhance breeding of high-resistant cereals to *Fusarium* infection, which do not accumulate mycotoxins in their grains. Cultivation of resistant cultivars is still one of the most efficient methods of plant protection, thus providing abundant high-quality harvest.

Conclusion

From all the studied winter wheats, the variety Adel was found as highly resistant to *F. graminearum* and *F. verticillioides* infection and also to contamination by the mycotoxins DON and FB₁. On the base of sum of measured parameters, varieties Antonina, Lebed and Pamyat can be characterized as relatively resistant, whereas the variety Utrish as the most susceptible to FHB. We observed a similarity in the response of wheat varieties to both *F. graminearum* and *F. verticillioides* infections, and the obvious interaction of the fungi in the process of grain colonization. It is essential to enhance the breeding of high-resistant to FHB wheat varieties and increase their widespread cultivation.



Comparison of parameters characterizing the resistance of winter wheat varieties under the artificial infection: (a) percentage of grains infected by *F. graminearum* and *F. verticillioides*, (b) DNA content of these fungi and (c) content of produced mycotoxins.

The variety: 1 – Adel; 2 – Alekseich; 3 – Antonina; 4 – Bagrat; 5 – Bezostaya 100; 6 – Brigada; 7 – Vassa; 8 – Velena; 9 – GROM; 10 – Gurt; 11 – Kurs; 12 – Lebed; 13 – Morozko; 14 – Pamyat; 15 – Tanya; 16 – Utrish; 17 – Yuka.

Acknowledgements

This study was supported by Russian Science Foundation (project No. 14-26-00067).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ablova I.B., Bespalova L.A., Kolesnikov F.A., Nabokov G.D., Puzyurnaya O.Yu., Filobok V.A. Wheat breeding for disease resistance. *Zemledelie = Agriculture*. 2014;3:19-22. (in Russian)
- Ablova I.B., Taranenko S.A. Methodological aspects of the creation of artificial infection background for Fusarium head blight of winter wheat. *Evolution of Scientific Technologies in Plant Science*. 2004;1:382-390. (in Russian)
- Alexander N.J., Proctor R.H., McCormick S.P. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Rev.* 2009;28(2-3):198-215. DOI 10.1080/15569540903092142.
- Audenaert K., Vanheule A., Höfte M., Haesaert G. Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins*. 2013;6:1-19. DOI 10.3390/toxins6010001.
- Babayants L.T., Meshterkhazhi A., Vekhter V. *Methods of Breeding and Assessment of Disease Resistance of Wheat and Barley in CMEA Countries*. Prague, 1988. (in Russian)
- Bespalova L.A., Romanenko A.A., Kolesnikov F.A., ..., Kalmysh A.P., Ponomarev D.A., Belyakova A.Yu. Varieties of Wheat and Triticale from the Lukyanenko Agricultural Research Institute. Krasnodar, 2017. (in Russian)
- Bespalova L.A., Vasilyev A.V., Ablova I.B., Filobok V.A., Khudokormova Z.N., Davoyan R.O., Davoyan E.R., Karlov G.I., Soloviev A.A., Divashuk M.G., Mayer N.K., Dudnikov M.V., Mironenko N.V., Baranova O.A. The use of molecular markers in wheat breeding at the Lukyanenko Agricultural Research Institute. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2012;2(4):286-290.]
- Desjardins A.E., Munkvold G.P., Plattner R.D., Proctor R.H. *FUM1* – a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2002;11:1157-1164. DOI 10.1094/MPMI.2002.15.11.1157.
- Desjardins A.E., Plattner R.D. Fumonisin B (1)-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:5773-5780.
- Dill-Macky R., Jones R.K. The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. *Plant Dis.* 2000;84:71-76. DOI 10.1094/PDIS.2000.84.1.71.
- Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P. Grain infection by *Fusarium* fungi in the Krasnodar and Stavropol regions. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2014;3:30-33. (in Russian)
- Gerlach W., Nirenberg H. *The Genus Fusarium – a Pictorial Atlas* Mitt. Biol. Bund. Ld. Berlin, 1982.
- Halstensen A.S., Nordby K.C., Eduard W., Klemsdal S.S. Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins. *J. Environ. Monit.* 2006;8:1235-1241. DOI 10.1039/b609840a.
- Iglesias J., Presello D.A., Botta G., Lori G.A., Fauguel C.M. Aggressiveness of *Fusarium* section Liseola isolates causing maize ear rot in Argentina. *Eur. J. Plant Pathol.* 2010;92(1):205-211. DOI 10.4454/jpp.v92i1.31.
- Maiorano A., Blandino M., Reyneri A., Vanara F. Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Prot.* 2008;27:182-188. DOI 10.1016/j.cropro.2007.05.004.
- Mesterhazy A. Theory and practice of the breeding for Fusarium head blight in wheat. *J. Appl. Genet.* 2002;43A:289-302.
- Nicolaisen M., Suproniene S., Nielsen L.K., Lazzaro I., Spliid N.H., Justesen A.F. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *J. Microbiol. Methods*. 2009;76:234-240. DOI 10.1016/j.mimet.2008.10.016.
- Picot A., Hourcade-Marcolla D., Barreau C., Pinson-Gadais L., Caron D., Richard-Forget F., Lannou C. Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathol.* 2012;61:140-151. DOI 10.1111/j.1365-3059.2011.02503.x.
- Preiser V., Goetsch D., Sulyok M., Krska R., Mach R.L., Farnleitner A., Brunner K. The development of a multiplex real-time PCR to quantify *Fusarium* DNA of trichothecene and fumonisin producing strains in maize. *Anal. Methods*. 2015;7:1358-1365.
- Presello D.A., Iglesias J., Botta G., Lori G.A., Eyherabide G.H. Stability of maize resistance to the ear rots caused by *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides* in Argentinean and Canadian environments. *Euphytica*. 2006;147:403-407. DOI 10.1007/s10681-005-9037-8.
- Stanković S., Lević J., Krnjaja V. Fumonisin B₁ in maize, wheat and barley grain in Serbia. *Biotechnol. Animal Husb.* 2011;27(3):631-641. DOI 10.2298/BAH1103631S.
- Yli-Mattila T., Paavananen-Huhtala S., Jestoi M., Parikka P., Hietaniemi V., Gagkaeva T., Sarlin T., Haikara A., Laaksonen S., Rizzo A. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 2008;41:243-260. DOI 10.1080/0323540060060680659.

ORCID ID

T.Yu. Gagkaeva orcid.org/0000-0002-3276-561X

A.S. Orina orcid.org/0000-0002-7657-6618

O. Gavrilova orcid.org/0000-0002-5350-3221

I.B. Ablova orcid.org/0000-0002-3454-9988

L.A. Bespalova orcid.org/0000-0003-3844-9682



Finding *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*-like sequences in conventionally bred potato varieties

O.Y. Antonova¹, N.S. Klimenko¹, Z.Z. Evdokimova², L.I. Kostina¹, T.A. Gavrilenko^{1, 3}

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", Leningrad region, Gatchinsky district, Russia

³ St. Petersburg State University, Biological faculty, St. Petersburg, Russia

The main objectives in potato breeding are increasing yield abilities and improving resistance to numerous pathogens and pests. Among them, the late blight caused by the *Phytophthora infestans* oomycete is one of the most destructive potato diseases both in Russia and worldwide. Wild relatives of cultivated potato are traditionally used in breeding as the source of valuable *R* genes conferring resistance to pathogens. Of particular interest are Mexican wild species because Mexico is the centre of origin and diversity of *P. infestans* and at the same time, it is the centre of potato species diversity. Mexican wild potato species *S. bulbocastanum* and *S. stoloniferum* are an important source of the *R* genes conferring broad-spectrum resistance against various isolates of *P. infestans* (*Rpi-blb1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-sto1*). Recently these genes have been transferred into cultivated potato gene pool using the cisgene approach. At the same time there is a high probability of finding genotypes with the *Rpi-sto1* gene (functional homologues of *Rpi-blb1*) among conventionally bred varieties because for about 40 years *S. stoloniferum* has been used in breeding as a source of the *Ry_{sto}* and *Ry-f_{sto}* genes of the extreme resistance to the most important viral pathogen PVY. In this study 188 potato varieties bred in Russia and in near-abroad countries were screened for the presence of six gene-specific markers of the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* and *Rpi-blb2* genes conferring broad-spectrum resistance against *P. infestans*, and for the markers linked to the *Ry_{sto}* and *Ry-f_{sto}* genes conferring extreme resistance to PVY. In addition, a marker for detecting male sterile mitochondrial DNA type gamma derived from *S. stoloniferum* was used. The genotypes selected through the molecular markers were divided into four groups: (A) 13 PVY resistant varieties carrying diagnostic markers of the *Ry_{sto}*, *Ry-f_{sto}* genes and having sterile mt-type gamma; (B) four varieties possessing mt-type gamma and not having the markers of the *R* genes introgressed from *S. stoloniferum*; (C) eight genotypes carrying five gene-specific markers for the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*; (D) the rest 166 (86.9 %) varieties not possessing any of the diagnostic markers associated with the *S. stoloniferum* genetic material. The sequences of the *Rpi-sto1* and BLB1 F/R-amplicons were identical in all the genotypes of group 'C' and showed respective 99 % and 100 % similarity to the corresponding fragments of the *Rpi-sto1* and *Rpi-blb1* genes from the GenBank database. Among the genotypes of group 'C' various mt-types were detected, and some of them were male fertile.

Key words: potato; *Solanum stoloniferum*; marker assisted selection; *R* genes; *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*; male sterility.

Последовательности, гомологичные участкам гена *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*, у сортов картофеля, созданных методами традиционной селекции

О.Ю. Антонова¹, Н.С. Клименко¹, З.З. Евдокимова²,
Л.И. Костина¹, Т.А. Гавриленко^{1, 3}

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 Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

Традиционные задачи селекции картофеля – повышение урожайности и устойчивости к многочисленным патогенам и вредителям. Из них наибольший ущерб картофелеводству как в России, так и мире наносит фитофтороз, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans*. Дикие виды картофеля используются в селекции в качестве источников *R* генов устойчивости к патогенам. Особый интерес представляют мексиканские виды, поскольку Мексика – центр происхождения и разнообразия *P. infestans* и центр разнообразия видов картофеля. Дикие мексиканские виды картофеля *S. bulbocastanum* и *S. stoloniferum* являются источниками *R* генов устойчивости к широкому спектру рас *P. infestans* (*Rpi-blb1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-sto1*). В последние годы эти гены были интрогрессированы в геном культурного картофеля с использованием методов цис-генетики. В то же время высока вероятность выявления генотипов с геном *Rpi-sto1* (функциональный гомолог *Rpi-blb1*) у сортов, созданных методами традиционной селекции, поскольку уже около 40 лет селекционеры используют *S. stoloniferum* в качестве источника устойчивости к наиболее вредоносному вирусу картофеля – PVY. В настоящей работе проведен молекулярный скрининг 188 сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья с ген-специфичными маркерами *RB/Rpi-blb1*, *Rpi-sto1* и *Rpi-blb2*; маркерами, сцепленными с генами *Ry_{sto}*, *Ry-f_{sto}*, детерминирующими устойчивость к PVY, и маркером митотипа гамма, ассоциированного с мужской стерильностью *S. stoloniferum* гибридов. Отобранные в молекулярном скрининге генотипы могут быть разделены на четыре группы: (A) 13 устойчивых к PVY сортов с диагностическими маркерами генов *Ry_{sto}*, *Ry-f_{sto}* и со стерильным мт-типом гамма; (B) четыре сорта с мт-типом гамма, не обладающие маркерами *R* генов устойчивости, интрогрессированных от *S. stoloniferum*; (C) восемь генотипов, у которых были детектированы все пять ген-специфичных маркеров гена *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*; (D) оставшиеся 166 (86.9 %) сортов выборки, у которых не были выявлены маркеры *R* генов устойчивости *S. stoloniferum* и митотип

гамма. Последовательности ПЦР продуктов, полученные при амплификации с ген-специфичными праймерами Rpi-sto1 и BLBF/R, у всех генотипов группы С были идентичны и имели 99 и 100 % сходства с соответствующими фрагментами референсных последовательностей генов Rpi-sto1 и Rpi-blb1 из GenBank. В группе С выявлены генотипы с различными мт-типами, среди них – образцы с мужской фертильностью.

Ключевые слова: картофель; *Solanum stoloniferum*; маркер-вспомогательный отбор; R гены; RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1; мужская стерильность.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Antonova O.Y., Klimenko N.S., Evdokimova Z.Z., Kostina L.I., Gavrilenko T.A. Finding RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1-like sequences in conventionally bred potato varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):693-702. DOI 10.18699/VJ18.412

The common potato (*Solanum tuberosum* L.) is the first non-grain food crop in the world and in Russia. Potato varieties are susceptible to many diseases and pests so the main objectives in potato breeding are increasing yield abilities and resistance to numerous fungal, viral, bacterial pathogens and pests. Among them, late blight caused by the *Phytophthora infestans* oomycete remains the most destructive disease that decrease potato production both worldwide (Haverkort et al., 2008, 2009, 2016) and in Russia (Elanskij, 2015). To control late blight and prevent yield losses, potato cultivation requires frequent fungicide treatments, e. g. in Northern Europe such treatments are performed from 10 to 15 times a year and up to 25 times – in humid summers (Fact Series..., 2014). Growing of potato varieties with durable resistance against late blight is one of the main strategies of reducing the use of chemical fungicides.

Breeding potatoes resistant to *P. infestans* has been continuing for about 100 years. Various wild potato species have been found to be resistant to late blight and some of them have been actively used in breeding (Hanneman, Bamberg, 1986; Zoteyeva et al., 2012). Among them Mexican potatoes are of particular interest because the central regions of Mexico are considered to be a center of genetic diversity both for *P. infestans* and for wild potato species (Hawkes, 1990; Fry et al., 1993; Goss et al., 2014). *Solanum demissum*, indigenous to Mexico, served as an initial source of late blight resistance genes (named *R1* to *R11*) in potato breeding. These *R* genes conferring race-specific resistance against *P. infestans* were introgressed from *S. demissum* into the gene pool of *S. tuberosum* through interspecific crosses and conventional breeding in the first part of the last century (Malcolmson, Black, 1966). However, this race-specific resistance was quickly overcome by specific *P. infestans* strains (Wastie, 1991; Fry, Goodwin, 1997; Fry, 2008). In the subsequent decades, the efforts of breeders were aimed at a search for new sources of race-non-specific durable resistance against *P. infestans* that were found in many wild potato species (Ross, 1986). However, breeding of new varieties with race-non-specific resistance is time-consuming and laborious because of polygenic inheritance, as QTLs for this type of resistance were mapped on all the twelve potato chromosomes (Simko, 2002).

The *R* genes conferring broad-spectrum resistance against various *P. infestans* isolates have been found in several Mexican species that are highly resistant to late blight but less easy crossable with cultivated potato in comparison with *S. demissum*, e. g. broad spectrum resistance genes were identified in

Mexican diploid species *S. bulbocastanum* – the *RB* gene also known as *Rpi-blb1* (Naess et al., 2000; Song et al., 2003; van der Vossen et al., 2003) and the *Rpi-blb2* (van der Vossen et al., 2005), both encode CC-NB-LRR proteins (Vleeshouwers et al., 2011). The interspecific incompatibility between *S. bulbocastanum* and *S. tuberosum* was overcome using ploidy manipulations, interspecific bridge crosses with the other wild species and subsequent backcrossing of the complex hybrids (Hermesen, Ramanna, 1973). As a result of long-term conventional breeding process that lasted for 46 years, the *Rpi-blb2* gene from *S. bulbocastanum* has been introgressed into a common potato gene pool and two late blight resistant varieties carrying this gene – Bionica and Toluca – have been developed (Haverkort et al., 2009). The *RB/Rpi-blb1* gene was introgressed into the *S. tuberosum* genome through somatic hybridization (Helgeson et al., 1998).

The functional homologues of the *S. bulbocastanum* *RB/Rpi-blb1* gene were detected in Mexican allotetraploid species *S. stoloniferum* (= *S. papita*, *S. polytrichon*): *Rpi-sto1*, *Rpi-plt1*, *Rpi-ptal1*, *Rpi-ptal2* (Vleeshouwers et al., 2008; Wang et al., 2008; Lokossou et al., 2010). M. Wang with colleagues (2008) suggested that *S. bulbocastanum* is one of the progenitors of *S. stoloniferum*.

The *RB/Rpi-blb1* and *Rpi-blb2* from *S. bulbocastanum* and *Rpi-sto1* from *S. stoloniferum* were mapped and cloned (Song et al., 2003; van der Vossen et al., 2003, 2005; Vleeshouwers et al., 2008). After that a transgenic approach using genes from crossable species (cisgenesis) was developed to improve late blight resistance in cultivated potato (Haverkort et al., 2009, 2016). Genetically modified (GM) cisgenic potato clones carrying a single *Rpi*-gene demonstrated only partial resistance to the aggressive isolates of *P. infestans*, whereas cisgenic GM clones containing *Rpi* gene combinations had a high level of broad-spectrum resistance (Haverkort et al., 2016). However, cultivation of such resistant genotypes (e. g. of cisgenic *Phytophthora*-resistant variety 'Fortuna' having the *Rpi-blb1* and *Rpi-blb2* genes) has still been a questionable issue because cisgenic plants remain under GMO regulation in the EU (Haverkort et al., 2016; van Hove, Gillund, 2017). At the same time, conventionally bred varieties Bionica and Toluca with the introgressed *Rpi-blb2* gene can be cultivated in the EU without any limitations.

It is interesting to note that *S. stoloniferum*, a wild Mexican species with functional homologues of the *RB/Rpi-blb1* gene, can be directly crossed with cultivated potato (Jackson, Hanneman, 1999), but this wild species has not been actively

involved in a breeding program the directed on broad-spectrum late blight resistance. The efforts of breeders were usually focused on *S. stoloniferum* as a source of extreme resistance to potato virus Y (PVY) to be the most important viral pathogen of cultivated potato (Ross, 1986). Many West-European varieties have been developed based on interspecific hybrids *S. stoloniferum* × *S. tuberosum*. They inherit the *Ry_{sto}* and/or *Ry-f_{sto}* genes from *S. stoloniferum*, both conferring extreme resistance to PVY (Flis et al., 2005; Song, Schwarzfischer, 2008). According to literature, the gene *Ry_{sto}* has always been associated with mitochondrial type (mt-type) gamma and with maternally inherited male sterility (Song, Schwarzfischer, 2008).

In the Russian Federation are mainly two centers bred potato varieties from interspecific hybrids with *S. stoloniferum*. These are (1) A.G. Lorkh All-Russian Potato Research Institute (VNIKH) located in Moscow region, whose efforts are focused on developing PVY resistant material and (2) Leningrad Scientific Research Institute "Belogorka" (LenNIISKh 'Belogorka') located in north-west region of Russia whose efforts are concentrated on developing of late blight resistant material. Recently, we screened the 39 cultivars and breeding clones developed in the LenNIISKh 'Belogorka' and selected five genotypes carrying gene-specific markers for *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1*; three of these genotypes were bred up to the variety level (Gavrilenko et al., 2018).

The objectives of the present study were to screen a wider subset of 188 potato varieties with the markers of the *R* genes originating from *S. stoloniferum* and to provide evidences of the presence of *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1*-like sequences in the selected varieties and breeding clones.

Material

The one hundred eighty five varieties chosen for this study were obtained from the national potato germplasm collection maintained at VIR. Special attention was paid to the varieties having *S. stoloniferum* hybrids in their pedigrees. The pedigree records were received from different sources (Simakov et al., 2007; Yashina et al., 2010; Russian Varieties..., 2011; Kostina, et al., 2016; Potatoes..., 2016). According to the published data *S. stoloniferum* was involved in the pedigrees of 28 varieties (their names are underlined – see below); most of them show extreme or high resistance to PVY. It was also possible that *S. stoloniferum* had participated in the origin of more than these 28 varieties because many cultivars had unknown ancestors or their pedigree records indicated interspecific hybrids of unknown origin. The following cultivars were subjected to molecular screening: Aksamit, Al'pinist, Alena, Alisa, Ametist, Amur, Antoshka, Arhideja, Arlekin, Avrora, Babushka, Barin, Baron, Belosnezhka, Beluha, Bezhickii, Bol'shevik, Bolvinskij, Borodjanskij rozovyj, Brat-2, Bravo, Brjanskaja novinka, Brjanskij delikates, Brjanskij krasnyj, Brjanskij nadezhnyj, Brjanskij rannij, Bronnickij, Buket, Chaja, Chajka, Divo, Doncovskij, Druznyj, Falenskij, Fermer, Filatovskij, Fioletovij, Fokinskij, Garant, Gart, Golubizna, Gorizont, Gorkjanka, Gornoural'skij, Granat, Gubernator, Hibinskij rannij, Il'inskij, Imandra, Impala, Irbitskij, Iskra, Javar, Jeffekt, Jenergija, Jubilej Zhukova, Jubilejnyj Osetii, Jupiter, Kabardinskij, Kalinka, Kamenskij, Kameraz, Katjusha, Kemerovchanin, Kemerovskij, Kolobok, Kolpashevskij, Komsomolec 20, Korenevskij, Kormilec, Korona, Kortni, Krasavica, Krasnaja gorka,

Krasnaja roza, Krasnaja zarja, Krasnoufimskij, Krepys, Kristall, Kustarevskij, Kuznechanka, Ladozhskij, Lajmdota, Lakomka, Lasunak, Lazar', Lazurit, Lekar', Lider, Ljubava, Ljuks, Lorh, Loshickij, Lugovskoj, Lybid', Manifest, Mats, Matushka, Maugli, Meteor, Moskvoreckij, Murmanskij, Musinskij, Nadezhda, Nakra, Nal'chickij, Naroch', Nart-1, Narymka, Nauka, Nesterovskij, Nezabudka, Nikulinskij, Odissej, Ognivo, Oktjabrenok, Olimp, Parus, Pobeda, Pogarskij, Prestizh, Pribrezhnyj, Priekul'skij rannij, Prigozhij 2, Pri12 (Primorskij), Priobskij, Prizer, Prolosok, Ramzaj, Rapsodija, Rassvet, Resurs, Rezerv, Rjabinushka, Romashka, Rosinka, Rossijanka, Rumjanka, Rusalka, Rusich, Sambo, Saprykinskij, Sarovskij, Sentjabr', Severjanin, Shaman, Shurminskij 2, Sineva, Sintez, Skarb, Skoroplodnyi, Smena, Sokol'skij, Solnyshko, Start, Svenskij, Svetljachok, Tango, Temp, Teshha, Tomich, Udacha, Ukrainskij rozovyj, Uspeh, Utenok, Varmas, Varsna, Vektar belorusskij, Veselovskij 2-4, Veteran, Virazh, Viza, Vjatka, Volzhskij, Vympel, Zagadka, Zarevo, Zaural'skij, Zdabytak, Zhavoronok, Zhigulevskij, Zhivica, Zhukovskij rannij, Zol'skij, Zvezdochka.

One hundred eighty five varieties of the studied subset had been developed and released by different Russian public institutions, and breeding stations of various geographical locations and in neighboring countries. This subset did not include the 33 varieties bred in LenNIISKh 'Belogorka', since the results of their molecular screening had already been published (Gavrilenko et al., 2018).

The analyzed subset also included five additional genotypes selected earlier for having three gene-specific markers – *Rpi-sto1*, 1/1', BLB1F/R (varieties Sudarynja, Evraziya, Baltijskij and breeding clones 1604/16, 1101/10) (Gavrilenko et al., 2018). In the present study these five additional genotypes were involved into sequence analysis and were screened for gene-specific markers covering the other regions of the target gene *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1*. These three varieties and two breeding clones originated from the *S. stoloniferum* hybrids, and they all were bred in LenNIISKh 'Belogorka' (Gavrilenko et al., 2018). New perspective breeding clone 3602/28 of the same origin was also involved in molecular screening. In total experimental subset included 191 genotypes (188 varieties and three breeding clones).

The highly late blight resistant genotype of wild species *S. stoloniferum* (seedling from accession PI 205522) with the diagnostic markers of the *Rpi-sto1*, *Ry_{sto}*, *Ry-f_{sto}* genes (Levy et al., 2017) and variety Toluca with the *Rpi-blb2* gene were used as positive controls.

Methods

DNA isolation and marker assisted selection (MAS). Genomic DNA was isolated from young leaves of the field grown plants following the modified CTAB method (Gavrilenko et al., 2013). Six gene-specific primers for the *Rpi-sto1*, *RB*, *Rpi-blb1*, and *Rpi-blb2* genes developed by different authors (Table 1) were used in this study. This set included one primer pair 1/1' specific for the *Rpi-blb1* functional allele (Colton et al., 2006). The location of *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1* gene-specific primers is indicated in the schematic diagram (Fig. 1).

We also used STS marker YES3-3A and CAPS marker GP122-406 linked with genes *Ry_{sto}* and *Ry-f_{sto}*, respectively. The markers had been earlier validated for MAS of West-

Table 1. Markers of *R* genes and mt-types used in this study

No.	Target resistance gene (chromosome)	Name of the DNA marker	Primer sequences (forward and reverse primer)	T _m , °C	PCR product size, bp	References
Gene-specific markers for the <i>Rpi-sto1</i> , <i>RB</i> , <i>Rpi-blb1</i> , <i>Rpi-blb2</i>						
1	<i>Rpi-sto1</i> (VIII)	Rpi-sto1	F: ACCAAGGCCACAAGATTCTC R: CTGCGGTTCCGGTTAATACA	65	890	Zhu et al., 2012
2	<i>RB</i> (VIII)	1/1'	F: CACGAGTGCCTTTTCTGAC R: ACAATTGAATTTTAGACTT	50	213	Colton et al., 2006
3	<i>Rpi-blb1</i> (VIII)	BLB1 F/R	F: AACCTGTATGGCAGTGGCATG R: GTCAGAAAAGGGCACTCGTG	58	821	Wang et al., 2008
4	<i>Rpi-blb1</i> (VIII)	517/1519	F: CATTCCAAGTAGCCATCTTGG R: TATTGATCGAAAGTACAACG	58	651	»
5	<i>RB/Rpi-blb1</i> (VIII)	RB-629	F: GAATCAAATTATCCACCCAACTTTTAAAT R: CAAGTATTGGGAGGACTGAAAGGT	65	629	Pankin et al., 2011
6	<i>Rpi-blb2</i> (VI)	Blb2F/R	F: GGACTGGGTAACGACAATCC R: AGCAGGAGTCCCCTAATGC	58	773	Lokossou et al., 2010
Markers linked to the genes conferring extreme resistance to PVY originating from <i>S. stoloniferum</i>						
7	<i>Ry_{sto}</i> (XII)	YES3-3A	F: TAACTCAAGCGGAATAACCC R: AATTCACCTGTTTACATGCTTCTTGTC	55	341	Song, Schwarzfischer, 2008
8	<i>Ry_{f-sto}</i> (XII)	GP122-406/EcoRV	F: CAATTGGCTCCCGACTATCTACAG R: ACAATTGCACCACCTTCTCTTCAG	52	406	Flis et al., 2005; Valkonen et al., 2008
Marker used for detection of different mt-types						
9	<i>rps 10</i> locus of mtDNA	ALM_4/ALM_5	AAT AAT CTT CCA AGC GGA GAG AAG ACT CGT GAT TCA GGC AAT	55	alpha – 2400, beta – 1600, gamma – “–”	Lössl et al., 2000

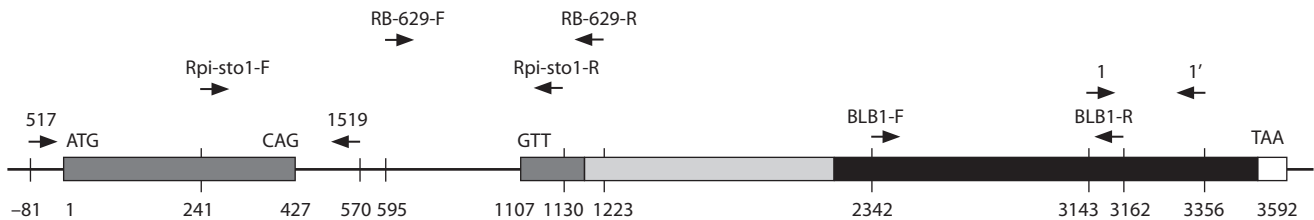


Fig. 1. A structure of the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* gene and location of five gene-specific primers used in this study: Rpi-sto1, BLB1F/R, 1/1', 517/1519, RB-629.

Bold lines indicate exon 1 (1–427 bp) and exon 2 (1107–3592 bp). Thin lines indicate intron, upstream and downstream regions. Nucleotide numbering begins from the start codon and includes the intron sequence. Regions corresponding to the CC-, NBS- and LRR- domains are highlighted in gray, light gray, and black, accordingly. The arrows show the regions of primer annealing; numbers under the arrows correspond to the position of the first nucleotide on the 5' end of the primers. The names of primers are indicated above the arrows.

European PVY resistant varieties (Song, Schwarzfischer, 2008; Valkonen et al., 2008). The different mitochondrial DNA types (mt-types) were identified with the specific primers ALM_4/ ALM_5 developed by A. Lössl et al. (2000) (see Table 1).

The primers were synthesized by Evrogen (Moscow, Russia) (<http://evrogen.ru>). PCR reactions were performed in a total volume of 20 µl containing 40 ng DNA template, 1 × PCR reaction buffer (Dialat, <http://dialat.ru>) with 2.5 mM MgCl₂, 0.6 mM of each dNTP (Dialat), 0.2 µM of forward/reverse primer and 1 U Taq polymerase (Dialat). PCR-conditions for the *RB/Rpi-blb1* and *Rpi-sto1* gene-specific primer pairs were used as described in the original articles (see Table 1). PCR-conditions for primer pairs YES3-3A and GP122-406/ EcoRV were modified by the use of the touchdown option.

Each PCR reaction was repeated at least three times. In the case of positive results with markers for gene *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*, MAS was repeated with independently extracted DNA samples. A reaction mixture with water instead of DNA template was used as a negative control. PCR products were separated by electrophoresis in 2.0 % agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized in UV light.

Sequence analysis. The Rpi-sto1- and BLB1 F/R-amplicons from the genotypes selected in MAS were purified with the Cleanup Standard Kit (Eurogen, #BC022, <http://evrogen.ru>) and sequenced in both directions on 24-capillary 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using equipment of Core Centrum ‘Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology’ in ARRIAM. Alignment of nucleotide sequences and their analysis were conducted using software Unipro UGENE

version 1.29.0 (Okonechnikov et al., 2012) and BioEdit Version 7.1.9 (Hall, 1999). The obtained sequences were compared against the ones of the NCBI nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Results

One hundred ninety one genotypes of the analyzed subset were screened using the DNA markers associated with the *Ry_{sto}*, *Ry-f_{sto}*, *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* genes and with mt-type gamma originating from *S. stoloniferum*. Based on the screening results this subset was divided into four groups A–D (Table 2).

Group A included 13 varieties all carrying the diagnostic markers GP122-406/EcoRV and YES3-3A_321 tightly linked to the *Ry-f_{sto}* and *Ry_{sto}* genes. According to literature, these varieties are either extremely resistant or resistant to PVY; their pedigree records indicate that they descended from the *S. stoloniferum* hybrids (Simakov et al., 2007; Yashina et al., 2010; Biryukova et al., 2015). All the varieties of group A have mt-type gamma (see Table 2) inherited from *S. stoloniferum* (Lössl et al., 2000). These varieties were characterized by male sterility. None of the diagnostic markers for *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* and for *Rpi-blb2* were detected in group A.

Table 2. Molecular screening results in a subset of 191 accessions

No.	Name of variety	Presence (1) or absence (0) of the diagnostic markers associated with the genetic material introgressed from <i>S. stoloniferum</i>							
		<i>Ry-f_{sto}</i>	<i>Ry_{sto}</i>	<i>RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1</i>				mt-type	
		GP122-406/EcoRV	YES3-3A	Rpi–sto1	BLB1F/R	1/1'	517/1519	RB-629	ALM4/5
Group A: varieties with PVY – resistance genes markers and the mt-type gamma inherited from <i>S. stoloniferum</i>									
1	Brjanskij krasnyj	1	1	0	0	0	0	0	gamma
2	Il'inskij	1	1	0	0	0	0	0	gamma
3	Jubilej Zhukova	1	1	0	0	0	0	0	gamma
4	Kolobok	1	1	0	0	0	0	0	gamma
5	Korona	1	1	0	0	0	0	0	gamma
6	Meteor	1	1	0	0	0	0	0	gamma
7	Moskvoreckij	1	1	0	0	0	0	0	gamma
8	Nakra	1	1	0	0	0	0	0	gamma
9	Olimp	1	1	0	0	0	0	0	gamma
10	Pogarskij	1	1	0	0	0	0	0	gamma
11	Resurs	1	1	0	0	0	0	0	gamma
12	Sokol'skij	1	1	0	0	0	0	0	gamma
13	Vektar belorusskij	1	1	0	0	0	0	0	gamma
Group B: varieties with mt-type gamma with no diagnostic <i>R</i> genes markers									
1	Brjanskaja novinka	0	0	0	0	0	0	0	gamma
2	Fokinskij	0	0	0	0	0	0	0	gamma
3	Odissej	0	0	0	0	0	0	0	gamma
4	Zdabytak	0	0	0	0	0	0	0	gamma
Group C: varieties and breeding clones with the gene-specific markers of <i>RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1</i>									
1	Avrora	0	0	1	1	1	1	1	beta
2	Ognivo	0	0	1	1	1	1	1	beta
3	Baltijskij	0*	0*	1*	1*	1*	1	1	beta*
4	Evraziya	0*	0*	1*	1*	1*	1	1	gamma*
5	Sudarynja	1*	1*	1*	1*	1*	1	1	gamma*
6	Breeding clone 3602/28	0	0	1	1	1	1	1	gamma
7	Breeding clone 1604/16	0*	0*	1*	1*	1*	1	1	gamma*
8	Breeding clone 1101/10	0*	0*	1*	1*	1*	1	1	alpha*
Group D: varieties with no DNA markers associated either with <i>R</i> genes or the mt-type introgressed from <i>S. stoloniferum</i> .									
1-166	The rest 166 of 188 varieties of the studied subset	0	0	0	0	0	0	0	49.4 % – alpha, 50.6 % – beta
Control accession									
	<i>S. stoloniferum</i> PI 205522	1	1	1	1	1	1	1	gamma

* Taken from (Gavrilenko et al., 2018).

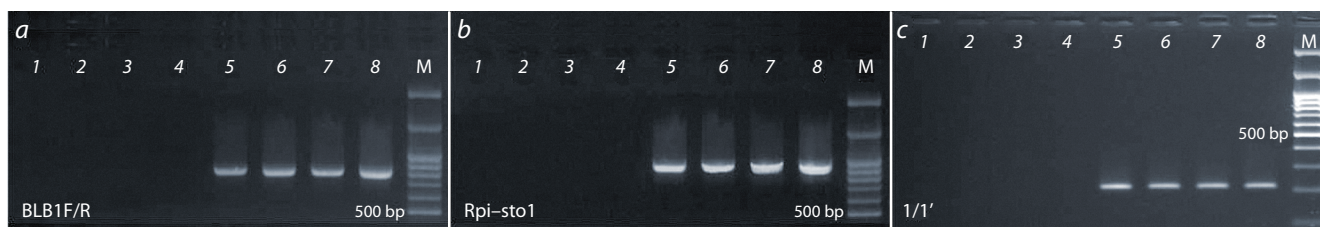


Fig. 2. PCR amplification of 821-bp, 890-bp, 213-bp fragments using gene-specific primers: BLB1F/R (a); Rpi-sto1 (b); 1/1' (c).

Varieties and breeding clones: 1 – Il'inskij; 2 – Meteor; 3 – Nakra; 4 – Pogarskij; 5 – Avrora; 6 – 3602/28; 7 – Ognivo; 8 – sto, PI 205522. M – molecular marker 100 bp + 1.5 Kb + 3 Kb DNA Ladder.

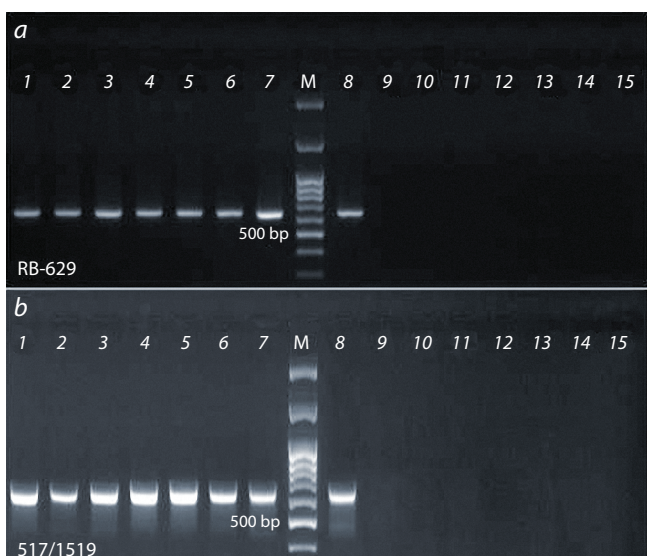


Fig. 3. PCR amplification of 629-bp and 651-bp fragments using RB-629 (a) and 517/1519 (b) gene-specific primers.

Varieties and breeding clones: 1 – Avrora; 2 – 3602/28; 3 – Baltijskij; 4 – Evraziya; 5 – 1604/16; 6 – Ognivo; 7 – Sudarynja; 8 – sto, PI 205522; 9 – Il'inskij; 10 – Meteor; 11 – Nakra; 12 – Pogarskij; 13 – Golubizna; 14 – Zhigulevskij; 15 – Veteran. M – molecular marker 100 bp + 1.5 Kb + 3 Kb DNA Ladder.

Group B included four varieties (Brjanskaja novinka, Fokinskij, Odissej, Zdabytak) that had no *R*-gene diagnostic markers (see Table 2). At the same time, all these varieties had the sterile mt-type gamma which derived from *S. stoloniferum* (Lössl et al., 2000). According to the pedigree records only one variety of group B – Brjanskaja novinka – had originated from the *S. stoloniferum* hybrids.

As group C we marked the genotypes with diagnostic fragments generated by five gene-specific markers of the *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1*. Within the screened subset these markers were found in two varieties: Avrora, Ognivo and in breeding clone 3602/28 (Fig. 2 and 3; Table 2). The breeding material from LenNIISKh 'Belogorka' selected earlier for the presence of three gene-specific markers (Rpi-sto1, BLB1F/R and 1/1') (Gavrilenko et al., 2018) also was MAS-positive: two additional markers 517/1519 and RB-629 covering different regions of the target gene *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1* were detected in varieties Baltijskij, Evraziya, Sudarynja (see Fig. 3) and in breeding clones 1101/10 and 1604/16. As a result, group C included eight genotypes (five varieties and three breeding clones) which all were MAS-positive for the five gene-specific

markers (BLB1F/R, 1/1', 517/1519, RB-629, Rpi-sto1) of *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1* homologues (see Table 2).

The *Rpi-blb2* diagnostic marker was detected in control variety Toluca but was not found in the analyzed subset including the control accession of *S. stoloniferum* PI 205522.

Group D included the most (166 or 86.9 %) varieties of the analyzed subset, which were MAS-negative for all markers associated with *R* genes from *S. stoloniferum* (see Table 2). Genotypes with mt-type gamma were also not found in this group. Eighty two varieties (49.4 %) of this group possessed mt-type alpha and 84 (50.6 %) – mt-type beta (see Table 2). It should be mentioned that several accessions of group D had the *S. stoloniferum*-hybrids in their pedigree records (see the Material part), e. g. there were seven cultivars extremely resistant to PVY (Brjanskij rannij, Effekt, Golubizna, Zhigulevskij, Ramzaj, Skoroplodnyi, Veteran) which had originated from self-fertile hybrid F₂Bn of *S. stoloniferum* (Simakov et al., 2007; Yashina, 2010).

Seven varieties from the analyzed subset had been previously screened for marker GP122_564 of the *Ry-f_{sto}* gene – (Pavlyuchuk et al., 2013) and eight varieties – for YES3-3A marker of the *Ry_{sto}* gene (Biryukova et al., 2015); in the both cases, material from patent holder institutions had been used. The results obtained at present study fully confirmed the data for these 15 varieties.

All the genotypes of group C, each carrying five gene-specific markers for the *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1*, were selected for further sequence analysis.

Sequence analysis

The bands amplified by the Rpi-sto1 primer pairs were purified and sequenced from the eight genotypes of group C: five varieties (Avrora, Baltijskij, Evraziya, Sudarynja, Ognivo), three breeding clones (1101/10, 1604/16, 3602/28) and control genotype *S. stoloniferum* PI205522. The nucleotide sequences data obtained from the partial CC-region amplified with the Rpi-sto1 primer pairs were identical in all the nine genotypes (Fig. 4).

The identified variant of the nucleotide sequence of Rpi-sto1-fragments was not found in the GenBank database, but the sequences had 99 % similarity with the corresponding region of the two *R* gene sequences in the database: (1) *Rpi-sto1* of *S. stoloniferum* (EU884421) and (2) *Rpi-blb1* of *S. bulbocastanum* (AY426259.1). Both reference sequences correspond to the functional alleles (van der Vossen et al., 2003; Vleeshouwers et al., 2008). In comparison with corresponding region in reference sequence EU884421, three single-nucleotide po-

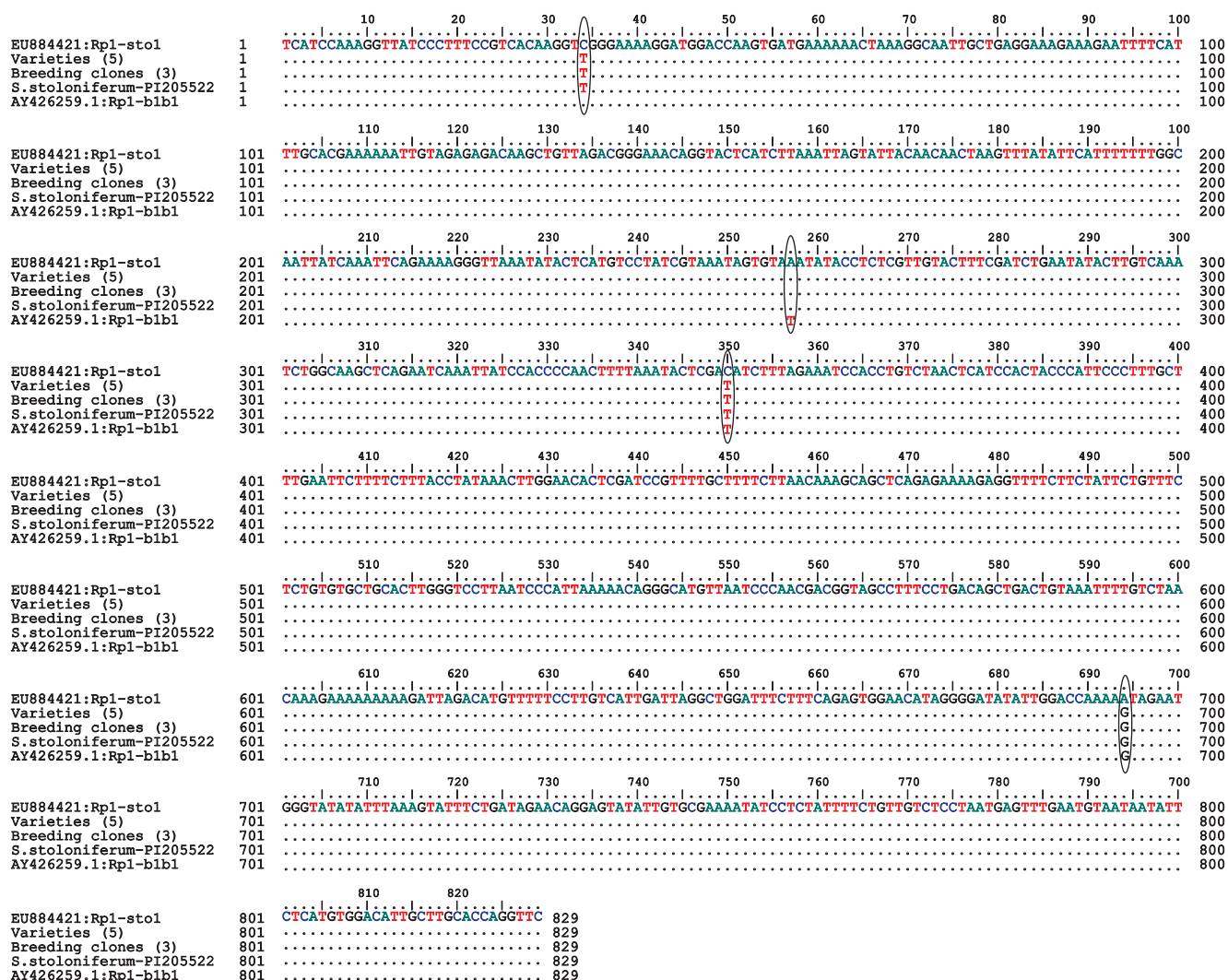


Fig. 4. Alignment of the Rpi-sto1-amplicon sequences from the eight genotypes of group C to the corresponding region of reference sequences (AY426259.1 and EU884421).

Varieties (5): Avrora, Baltijskij, Evraziya, Ognivo, Sudarynja; breeding clones (3): 1101/10, 1604/16, 3602/28. The ovals indicate the SNP-positions which correspond to the sites 315, 538, 631, 975 in the reference sequences.

Table 3. Single-nucleotide polymorphisms in the Rpi-sto1-amplicon sequences from eight MAS-positive genotypes of group C compared to the corresponding region of reference sequences *Rpi-sto1* (AY426259.1) and *Rpi-blb1* (EU884421)

Reference sequences (GenBank #)		8 genotypes selected in MAS:	
SNP position	<i>Rpi-blb1</i> (AY426259.1)	<i>Rpi-sto1</i> (EU884421)	5 varieties (Avrora, Baltijskij, Evraziya, Ognivo, Sudarynja), 3 breeding clones (1101/10, 1604/16, 3602/28) and control – <i>S. stoloniferum</i> PI 205522
315	C	C	T
538	T	A	A
631	T	C	T
975	G	A	G

lymorphisms were detected in the analyzed genotypes: one C → T – in the first exon at site 315 and two SNPs – in the intron part at sites: 631 (C → T) and 975 (A → G) (Table 3, Fig. 4).

Comparison with *S. bulbocastanum* reference sequence AY426259.1 revealed the same 1-bp substitution in the coding region at site 315 and one SNP – in the intron at site 538

(see Fig. 4, Table 3). Single nucleotide change at position 315 in the first exon resulted in synonymous codon substitution (GTC → GTT) that did not alter the encoded amino acid valine.

The amplicons generated by primer pair BLB1F/R from the partial LRR region were sequenced from control genotype *S. stoloniferum* PI 205522, varieties Avrora, Ognivo,

and breeding clone 3602/28. The sequences of BLB1F/R amplicons gave identity score 100 % to a corresponding partial LRR region in both reference sequences EU884421 and AY426259.1 and they were identical to the BLB1F/R fragment sequences from varieties Baltijskij, Evraziya, Sudarynja and breeding clones 1101/10, 1604/16 which had been analyzed earlier (Gavrilenko et al., 2018).

Thus, all the genotypes of group C had the same variant of the *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1*-like sequences to be identical to the corresponding haplotype of *S. stoloniferum* PI 205522.

The sequences of the *Rpi-sto1*- and *Rpi-blb1*-PCR fragments were submitted to GenBank and are available under the accession numbers: MH518315, MH062177 (cv. Sudarynja); MH518316, MH062178 (cv. Evraziya); MH521008 (cv. Baltijskij); MH844527 (*S. stoloniferum* PI 205522) and MH844526 (Avrora).

Discussion

Wild Mexican species *S. stoloniferum* is an important source of *R* genes for extreme resistance to PVY and for durable resistance against late blight as well as for unfavorable abiotic stresses, but the interspecific hybrids with this species are often male sterile that complicate conventional breeding (Ross, 1986; Ortiz, 1998). According to literature, many Western European varieties created by breeders in Germany, Holland and Poland through introgressive hybridization with *S. stoloniferum*, carry *Ry_{sto}* and/or *Ry-f_{sto}* genes conferring extreme resistance to PVY (Flis et al., 2005; Song, Schwarzfischer, 2008). Varieties with the *Ry_{sto}* gene show male sterility associated with mt-type gamma. This is due to the fact that these European varieties originated from a few accessions of *S. stoloniferum* which had been used in initial interspecific crosses as a female parent. The varieties and breeding clones developed from such interspecific hybrids inherited both the valuable *Ry_{sto}* gene and male sterile mt-type gamma (Lössl et al., 2000; Song, Schwarzfischer, 2008; Sanetomo, Gebhardt, 2015). Western European varieties have never been screened for the presence of *Rpi* genes, since the efforts of breeders were aimed at selection of PVY resistant material. An exception is our recent work in which a number of extremely resistant to PVY German varieties (Forelle, Kuba, Kuras, Maxi, Bettina, Amado, Solara) carrying *Ry_{sto}* and mt-type gamma (Song, Schwarzfischer, 2008) were screened for the *Rpi-sto1* and BLB1F/R markers of the *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1* gene, and none of these varieties were MAS-positive (Gavrilenko et al., 2018).

Similar results have been obtained at the present study with PVY resistant domestic varieties from group A carrying simultaneously the markers of the *Ry_{sto}* and *Ry-f_{sto}* genes. Eleven of the thirteen varieties were bred in VNIKH (Moscow region) based on the common sources derived from the Hungarian *S. stoloniferum* hybrid exhibiting extreme resistance to PVY (Simakov et al., 2007; Yashina, 2010). The hybrid maternally transferred its mt-type gamma to the breeding progenies. Cultivar Nakra from the group A had in its pedigree German variety Bison carrying the *Ry_{sto}* gene and mt-type gamma as its female parent (Song, Schwarzfischer, 2008). The varieties of group A did not have the diagnostic markers of the *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1* conferring broad-spectrum late blight resistance. It was obvious that in a breeding process aimed

at the selection of PVY resistant genotypes with *Ry_{sto}* and/or *Ry-f_{sto}* genes (both localized on chromosome XII), the other alien *S. stoloniferum* chromosomes (for example, VIII and VI, in which the *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1* and *Rpi-blb2* genes were mapped as well) would be lost.

The objective of creating varieties with high field resistance to late blight has been a priority for breeders from the north-western part of Russia, because in this region the weather conditions – moderate temperatures and high humidity – contribute to late blight development and often lead to epiphytotic. Seven of the eight selected in the MAS genotypes of group C having gene-specific markers for *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1* were developed by breeders from the North-Western region of Russia – LenNIISKH ‘Belogorka’ (Sudarynja, Evraziya, Baltijskij, 1101/10, 1604/16, 3602/28) and from the Vsevolozhskaya breeding station (Avrora). The patent holder of variety Ognivo is the Falenskaja breeding station located in the central-eastern part of European Russia.

The selected varieties and breeding clones from LenNIISKH ‘Belogorka’ grown without fungicide applications have been tested in the field trials for several years including epiphytotic seasons. The high level of foliar resistance to late blight was reported for Sudarynja, Baltijskij (Gavrilenko et al., 2018) and for 3602/28 (Evdokimova, not published). The Medium to low levels of field resistance was registered for Evraziya, Avrora and Ognivo (Simakov et al., 2009). At the same time all the genotypes of group C (Avrora, Baltijskij, Evraziya, Sudarynja, Ognivo, 1101/10, 1604/16, 3602/28) had an identical variant of the *RB/Rpi-blb1* = *Rpi-sto1*-like sequences with 99 % similarity to the corresponding regions of the *Rpi-sto1* and the *Rpi-blb1* genes from the Genbank database. These six genotypes from LenNIISKH ‘Belogorka’ had similar origin – they all derived from the same hybrid 8889/3 (*S. demissum*-*S. stoloniferum*-*S. andigenum*) (Gavrilenko et al., 2018). The pedigree of variety Avrora is unknown as well as the pedigree of Ognivo hybrids. The differences in the level of their late blight resistance can be influenced by the number of copies of resistance gene(s) or by gene interaction and genetic background. Further research is required to study the late blight resistance types in the genotypes from group C.

The undoubted success of breeders has been creation of the male fertile breeding material derived from the *S. stoloniferum* hybrids. The selected varieties and breeding clones of group C bred in LenNIISKH ‘Belogorka’ had originated from the same male fertile hybrid 8889/3. This hybrid was an effective pollinator and it had been always used in crosses as a male parent (Gavrilenko et al., 2018). Various mt-types in the descendants of hybrid 8889/3 were determined by the different female parents used in crosses. As a result, within the selected breeding material of group C there were male fertile genotypes: cultivar Baltijskij (mt-type beta), breeding clone 1101/10 (mt-type alpha) and genotypes with mt-type gamma exhibiting male sterility (Evrasiya, Sudarynja, 1604/16). Varieties Aurora and Ognivo selected in the present study both had mt-type beta, similar to cultivar Baltijskij from LenNIISKH ‘Belogorka’ (see Table 2). Varieties Avrora and Baltijsky are known as effective pollinators. Recently N. Zoteyeva et al. (2017) have selected male fertile *S. stoloniferum* hybrids with mt-type alpha and shown the possibility of pyramiding *R* genes from different wild Mexican species in breeding material.

As it has been mentioned before two conventionally bred varieties (Toluca and Bionica) possess the *Rpi-blb2* gene introgressed from *S. bulbocastanum* to common potato for a 46-year period (Haverkort et al., 2009). Additionally, the *Rpi-blb2* homolog has been detected in Hungarian cultivar White Lady (Hajianfar et al., 2016). The present paper represents a first report of finding the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*-like sequences in conventional bred varieties. With further investigation of late blight resistant types, co-segregation and expression analysis, the selected breeding material of group C might be used for gene pyramiding through traditional breeding methodologies.

Acknowledgements

The study was supported by the RSF grant (project No. 16-16-04125).

The authors are grateful to Dr. Alexandr Ermishin (Institute of Genetics and Cytology, Belarusian National Academy of Science, Republic of Belarus) for providing an *in vitro* clone of selected genotype *S. stoloniferum* PI 205522 and to Dr. Ramona Thieme (Julius Kühn-Institute, Germany) for the DNA sample of variety Toluca.

Growing of potato plants in VIR field Genbank is supported by the VIR project No. 0662-2018-0005.

Three varieties and three breeding clones from group C were bred in LenNIISKH 'Belogorka' under State Task # 007-00471-18-00.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Biryukova V.A., Shmyglya I.V., Abrosimova S.B., Zapekina T.I., Melleshin A.A., Mityushkin A.V., Manankov V.V. Search for sources of genes for resistance to pathogens among samples of selection and genetic collections of VNIKH using molecular markers. *Zashchita Kartofelya = Potato Protection*. 2015;1:3-7.
- 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.
- Elanskij S. Features of late blight in Russia. *Zashchita Kartofelya = Potato Protection*. 2015;1:8-11.
- Fact Series. A late blight resistance for Europe, 2014. www.vib.be.
- 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.
- Fry W.E. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol. Plant Pathol*. 2008;9(3):385-402. DOI 10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x.
- Fry W.E., Goodwin S.B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Dis*. 1997;81(12):1349-1357. DOI 10.1094/PDIS.1997.81.12.1349.
- Fry W.E., Goodwin S.B., Dyer A.T., Matuszak J.M., Drenth A., Tooley P.W., Sujkowski L.S., Koh Y.J., Cohen B.A., Spielman L.J., Deahl K.L., Inglis D.A., Sandlan K.P. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*; chronology, pathways and implications. *Plant Dis*. 1993;77(7):653-661.
- 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(7):1997-2015. DOI 10.1007/s10722-013-9968-1.
- 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 Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329 (in Russian).
- Goss E.M., Tabima J.F., Cooke D.E., Restrepo S., Fry W.E., Forbes G.A., Fieland V.J., Cardenas M., Grünwald N.J. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(24):8791-8796. DOI 10.1073/pnas.1401884111.
- Hajianfar R., Kolics B., Cernák I., Wolf I., Polgár Z., Taller J. Expression of biotic stress response genes to *Phytophthora infestans* inoculation in White Lady, a potato cultivar with race-specific resistance to late blight. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 2016;93:22-28. DOI 10.1016/j.pmpp.2015.12.001.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser*. 1999;41:95-98.
- Hanneman R.E., Bamberg J.B. Inventory of tuber-bearing *Solanum* species. Madison: Univ. of Wisconsin, WI, USA, 1986.
- Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Visser R.G.F., van der Vossen E.A.G. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Res*. 2008;51(1):47-57. DOI 10.1007/s11540-008-9089-y.
- 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(1):35-66. DOI 10.1007/s11540-015-9312-6.
- Haverkort A.J., Struik P.C., Visser R.G.F., Jacobsen E. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Res*. 2009;52(3):249-264. DOI 10.1007/s11540-009-9136-3.
- Hawkes J.G. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. London: Belhaven Press, 1990.
- Helgeson J.P., Pohlman J.D., Austin S., Haberlach G.T., Wielgus S.M., Ronis D., Zambolim L., Tooley P., McGrath J.M., James R.V., Stevenson W.R. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: A new source of resistance to late blight. *Theor. Appl. Genet*. 1998(6-7):96:738-742. DOI 10.1007/s001220050796.
- Hermens J.G.Th., Ramanna M.S. Double-bridge hybrids of *Solanum bulbocastanum* and cultivars of *Solanum tuberosum*. *Euphytica*. 1973;22(3):457-466. <http://evrogen.ru> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Jackson S.A., Hanneman R.E.Jr. Crossability between cultivated and wild tuber- and non-tuber-bearing *Solanums*. *Euphytica*. 1999; 109(1):51-67. DOI 10.1023/A:1003710817938.
- Kostina L.I., Koroleva L.V., Kosareva O.S., Fomina V.E. Breeding potato varieties from Russia and near-abroad countries. Catalogue. Saint Petersburg, 2016. Issue 829:43.
- Levy A.V., Voronkova E.V., Poljuhovich Ju.V., Ermishin A.P. DNA markers of genes of resistance to late blight and Y-virus in samples of wild allotetraploid species of potato *Solanum stoloniferum*. *Vesci Nacyjanal' naj Akademiі Navuk Belarusi*. 2017;2:46-54. DOI 10.29235/1029-8940-2017-0-2-46-54.
- Lokossou A.A., Rietman H., Wang M.Q., Krenek P., Schoot H., Henken B., Hoekstra R., Vleeshouwers V.G.A.A., Vossen E.A.G., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vosman B. Diversity, distribution, and evolution of *Solanum bulbocastanum* late blight resistance genes. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2010;23(9):1206-1216. DOI 10.1094/MPMI-23-9-1206.
- 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.
- Malcolmson J.F., Black W. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica*. 1966;15(2):199-203.
- Naess S.K., Bradeen J.M., Wielgus S.M., Haberalach G.T., McGrath J.M., Helgeson J.P. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101(5-6):697-704. DOI 10.1007/s001220051533.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012; 28(8):1166-1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Ortiz R. Potato breeding via ploidy manipulations. Ed. J. Janicks. *Plant Breeding Reviews*. New York: John Wiley & Sons, 1998. 16:15-86.
- Pankin A., Sokolova E., Rogozina E., Kuznetsova M., Deahl K., Jones R., Khavkin E. Allele mining in the gene pool of wild *Solanum* species for homologues of late blight resistance gene *RB/Rpi-blb1*. *Plant Genet. Res.* 2011;9(2):305-308. DOI 10.1017/S1479262111000414.
- Pavlyuchuk N.V., Voluevich E.A., Mahanko V.L., Ruseckij N.V. Method of multiplex PCR for the detection of potato genotypes, resistant to PVY and to PVS. [Potato-growing. Proc. RUE "Research and practical center of NAS of Belarus for potato, fruit and vegetable growing"]. 2013;21(1):184-192.
- Potatoes. Selection Potato Varieties of Russia and CIS Countries. Issue 829. Catalog of the world collection of VIR. SPb, 2016. (in Russian)
- Ross H. Potato Breeding – Problems and Perspectives. Berlin: V.P. Parey, 1986.
- Russian Varieties of Potatoes. Catalog. Cheboksary, 2011. (in Russian)
- 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.
- Simakov E.A., Anisimov B.V., Sklyarova N.P., Yashina I.M., Elanskij S.N. Potato Cultivars in Russia. Moscow: Agrosplas, 2009. (in Russian)
- Simakov E.A., Yashina I.M., Sklyarova N.P. Potato breeding in Russia: history, general trends and achievements. Ed. A. Haverkort, B. Anisimov. *Potato Production and Innovative Technologies*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. 2007;353-363. DOI 10.3920/978-90-8686-608-3.
- Simko I. Comparative analysis of quantitative trait loci for foliage resistance to *Phytophthora infestans* in tuber-bearing *Solanum* species. *Am. J. Potato Res.* 2002;79:125-132.
- Song J., Bradeen J.M., Naess S.K., Raasch J.A., Wielgus S.M., Haberalach G.T., Liu J., Kuang H., Austin-Phillips S., Buell C.R., Helgeson J.P., Jiang J. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(16):9128-9133. DOI 10.1073/pnas.1533501100.
- Song Y.-S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Ry_{sto}*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *Am. J. Potato Res.* 2008; 85(2):159-170. DOI 10.1007/s12230-008-9012-8.
- Valkonen J.P.T., Wiegmann K., Hamalainen J.H., Marczewski W., Watanabe K.N. Evidence for utility of the same PCR-based markers for selection of extreme resistance to potato virus Y controlled by *Ry_{sto}* of *Solanum stoloniferum* derived from different sources. *Ann. Appl. Biol.* 2008;152(1):121-130. DOI 10.1111/j.1744-7348.2007.00194.x.
- van der Vossen E.A.G., Gros J., Sikkema A., Muskens M., Wouters D., Wolters P., Pereira A., Allefs S. The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant J.* 2005;44(2):208-222. DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02527.x.
- van der Vossen E.A.G., Sikkema A., Hekkert B., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs J. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 2003;36(6):867-882. DOI 10.1046/j.1365-313X.2003.01934.x.
- van Hove L., Gillund F. Is it only the regulatory status? Broadening the debate on cisgenic plants. *Environ. Sci. Eur.* 2017;29(1):22. DOI 10.1186/s12302-017-0120-2.
- Vleeshouwers V.G.A.A., Raffaele S., Vossen J.H., Champouret N., Oliva R., Segretin M.E., Rietman H., Cano L.M., Lokossou A.A., Kessel G.J.T., Pel M., Kamoun S. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011;49:507-531. DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095326.
- Vleeshouwers V.G.A.A., Rietman H., Krennek P., Champouret N., Young C., Oh S.K., Wang M., Bouwmeester K., Vosman B., Visser R.G.F., Jacobsen E., Govers F., Kamoun S., van der Vossen E.A.G. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS ONE*. 2008;3(8):e2875. DOI 10.1371/journal.pone.0002875.
- Wang M., Sjekke A., van den Berg R.G., Vleeshouwers V.G.A.A., van der Vossen E.A.G., Vosman B. Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theor. Appl. Genet.* 2008;116(7):933-943. DOI 10.1007/s00122-008-0725-3.
- Wastie R.L. Breeding for resistance. Eds. D.S. Ingram, P.H. Williams. *Phytophthora infestans*, the Cause of Late Blight of Potato. Vol. 7. *Advances in Plant Pathology*. London: Academic Press Ltd, 1991.
- Yashina I.M. The importance of variety in modern technologies of potato production. *Actual Problems of the Modern Potato Industry*. Cheboksary: PMC CR "Agro-Innovations", 2010;41-48.
- Zhu S., Li Y., Vossen J.H., Visser R.G., Jacobsen E. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. *Transgenic Res.* 2012;21(1):89-99. DOI 10.1007/s11248-011-9510-1.
- Zoteyeva N., Antonova O., Klimenko N., Apalikova O., Carlson-Nilsson U., Karabitsina Yu., Ukhatova Yu., Gavrilenko T. Facilitation of introgressive hybridization of wild polyploid mexican potato species using DNA markers of R genes and of different cytoplasmic types. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2017; 52(5):964-975.
- Zoteyeva N., Chrzanowska M., Flis B., Zimnoch-Guzowska E. Resistance to pathogens of the potato accessions from the collection of N.I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR). *Am. J. Potato Res.* 2012;89(4):277-293. DOI 10.1007/s12230-012-9252-5.

ORCID ID

O.Yu. Antonova orcid.org/0000-0001-8334-8069
N.S. Klimenko orcid.org/0000-0002-5432-6466
Z.Z. Evdokimova orcid.org/0000-0001-8413-1769
L.I. Kostina orcid.org/0000-0002-6413-9189
T.A. Gavrilenko orcid.org/0000-0002-2605-6569



DNA-marker based identification of the *RPV3* gene determining downy mildew resistance in grapevines

E.T. Ilnitskaya¹✉, M.V. Makarkina¹, S.V. Tokmakov¹, L.G. Naumova²

¹ North-Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Krasnodar, Russia

² All-Russian Research Institute of Viticulture and Winemaking named after Ya.I. Potapenko, Novocherkassk, Russia

Downy mildew is one of the most common fungal diseases of the vine, caused by *Plasmopara viticola*. An effective way to control the spread of the pathogen is to cultivate resistant varieties. Cultivars of *Vitis vinifera*, being the basis of high-quality viticulture, practically do not possess genetic resistance to *P. viticola*, so screening for resistance donors is an important stage in breeding. One of the major resistance loci to downy mildew, the *Rpv3* gene, was identified in the genotype of a complex interspecific hybrid of grapes Bianca. Later, it was found that this gene had seven haplotypes of resistance inherited from North American grape species, and that it was possible to identify the allelic status of the gene using DNA-markers UDV305, UDV737. However, only two haplotypes can be combined in one diploid form. To determine the *Rpv3* gene in the grape gene pool we, using these markers, studied 35 different genotypes of grapevines, most of which are interspecies cultivars. Three varieties with known allelic status of the *Rpv3* gene (Dunavski lazur, Noah, Seyve Villard 12-375) were included in the study as reference genotypes. The genotypes were studied through polymerase chain reaction with separation of amplification products by capillary electrophoresis in automatic genetic analyzer ABI Prism 3130. In the studied grape cultivars DNA marker analysis identified the *Rpv3* gene in sixteen genotypes of interspecific origin, including haplotype *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ found in twelve varieties, *Rpv3*³²¹⁻³¹² – in three, and haplotype *Rpv3*^{null-271} – in one variety. Seyve Villard 12-375 turned out to be the donor of resistance gene in the most of the genotypes carrying *Rpv3* in this study. The obtained data can be useful in selection of mildew resistant grape varieties and screening for hybridization pairs.

Key words: grapevine; resistance to downy mildew; gene *Rpv3*; haplotype; DNA-markers; interspecific hybrids.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ilnitskaya E.T., Makarkina M.V., Tokmakov S.V., Naumova L.G. DNA-marker based identification of the *RPV3* gene determining downy mildew resistance in grapevines. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):703-707. DOI 10.18699/VJ18.413

Received 12.02.2018

Accepted for publication 24.06.2018

© AUTHORS, 2018

ДНК-диагностика гена *RPV3*, определяющего устойчивость винограда к возбудителю милдью

Е.Т. Ильницкая¹✉, М.В. Макаркина¹, С.В. Токмаков¹, Л.Г. Наумова²

¹ Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко, Новочеркасск, Россия

Милдью – одно из наиболее распространенных грибных заболеваний виноградной лозы, вызываемое *Plasmopara viticola*. Эффективным способом контроля распространения патогена является возделывание устойчивых сортов. Сорта *Vitis vinifera*, считаясь основой высококачественного виноградарства, практически не обладают генетической устойчивостью к *P. viticola*. Поиск доноров устойчивости – важный этап в селекции. Один из крупных локусов устойчивости к милдью, ген *Rpv3*, впервые был определен в генотипе сложного межвидового гибрида винограда Бианка. Позже было установлено, что этот ген имеет семь гаплотипов устойчивости, наследуемых от североамериканских видов винограда; идентифицировать аллельное состояние гена можно с помощью ДНК-маркеров UDV305 и UDV737. В одной диплоидной форме могут быть объединены только два гаплотипа. С целью определения гена *Rpv3* в генофонде винограда с использованием указанных маркеров нами проведено изучение 35 генотипов различного происхождения, большинство из которых – межвидовые сорта. Три сорта, аллельное состояние гена *Rpv3* в которых известно, были включены в исследование в качестве референсных генотипов: Дунавски лазур, Ноа, Сейв Виллар 12-375. Работа проведена методом полимеразной цепной реакции с разделением продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза при использовании автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130. В исследуемой выборке сортов винограда, согласно данным проведенного ДНК-маркерного анализа, ген *Rpv3* определен впервые в 16 генотипах межвидового происхождения, в том числе в ДНК 12 сортов идентифицирован гаплотип *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹, в трех – *Rpv3*³²¹⁻³¹², в одном сорте выявлен гаплотип *Rpv3*^{null-271}. В большинстве идентифицированных нами генотипов, несущих *Rpv3*, донором гена является Сейв Виллар 12-375. Сорта винограда, в которых были идентифицированы гаплотипы *Rpv3*, определяющие устойчивость, характеризуются высоким или повышенным уровнем устойчивости к милдью. Полученные данные могут быть полезны в селекции устойчивых сортов винограда при подборе пар для гибридизации.

Ключевые слова: виноград; устойчивость к милдью; ген *Rpv3*; гаплотип; ДНК-маркеры; межвидовые гибриды.

Downy mildew is one of the most widespread and destructive fungal diseases in the grapevine, caused by oomycete *Plasmopara viticola* Berl. et de Toni. The pathogen affects only the vine developing in its every green organ: leaf, shoots, inflorescences, grapes and tendrils. In favorable conditions such as warm temperature and excessive humidity, mildew may cause harvest failure from 50 to 100 % in different grape varieties (Talash, 2010).

Cultivation of resistant varieties remains one of the most effective methods of disease control that allows one to reduce the amount of pesticide sprayings, and in this way improves the ampelocenos, food safety and harvest of grapes.

The success of such cultivation is rooted into the genetic diversity of a culture and in many ways is determined by the level of knowledge about an accumulated genetic pool. Identification of the genotypes to serve as resistance donors has been one of the topical issues in the science of selection. Being the foundation of high-quality vine growing cultivars *Vitis vinifera* have almost no genetic resistance to *Plasmopara viticola*, while downy mildew – resistant genotypes belong to vine species from North America and Asia (*V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. riparia*, *V. rupestris*, etc.) as well as to *Muscadinia rotundifolia* (Alleweldt et al., 1988; Wan et al., 2007).

Molecular genetic methods are widely applied these days for identification and mapping of valuable genes, gene-pool diversity analysis, and DNA-marker selection in different breeding programs. The methods have made it possible to determine around 20 mildew-resistant loci in a vine genome (<http://www.vivc.de>). Many of them have been mapped and given names with their linked DNA-markers identified including those appropriate for DNA marker selection (Eibach et al., 2007; Di Gaspero et al., 2012; Schwander et al., 2012; Venuti et al., 2013; Zini et al., 2014; Ochssner et al., 2016).

The *Rpv3* gene, one of the major loci of resistance, was detected for the first time and mapped at chromosome 18 in the genotype of a complex interspecies hybrid Bianca carrying the geneplasm of *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. lincecumii* (Bellin et al., 2009). Later, in the course of a large-scale study into the North American species and varieties carrying *Rpv3*, one detected the seven conservative haplotypes of this gene responsible for mildew resistance (Di Gaspero et al., 2012). As the mentioned haplotypes were not found in *V. vinifera*, the authors came to the conclusion that *Rpv3* could be found in the varieties, whose pedigree had several North American species. The valuable haplotypes localize in a single locus, that is why in case of traditional breeding, only two haplotypes can be combined in a single diploid cell.

The performed studies have resulted in determination of tightly linked flanking microsatellite markers to identify such *Rpv3* gene haplotypes as UDV305 and UDV737 (Di Gaspero et al., 2012). The resistant haplotypes of the *Rpv3* gene corresponds to the following allele states of the abovementioned loci (UDV305, UDV737, respectively): *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ (inherited from *V. rupestris*), *Rpv3*^{null-297} (*V. rupestris* or *V. lincecumii*), *Rpv3*³²¹⁻³¹² (*V. labrusca* or *V. riparia*), *Rpv3*^{null-271} (*V. labrusca* or *V. riparia*), *Rpv3*³⁶¹⁻²⁹⁹ (*V. rupestris*), *Rpv3*²⁹⁹⁻³¹⁴ (*V. rupestris*), *Rpv3*^{null-287} (*V. rupestris*

or *V. labrusca*). G. Di Gaspero et al. have studied more than 200 grapevine varieties to determine their genotypes and stable *Rpv3*-bearing haplotypes, so their data can be used in screening for hybridization pairs in breeding of downy mildew-resistant cultivars.

The objective of the presented study was using DNA-marker analysis for identification of the allele state of the *Rpv3* gene in different vine cultivars, and comparison of the obtained data against the genotype pedigree.

Materials and methods

The study covered 35 grapevine cultivars from the gene pools of the Anapa ampelographic collection (Anapa) and the collection of Ya.I. Potapenko Research Institute of Viticulture and Winemaking (Novocherkassk). Most of the studied cultivars were interspecies hybrids, whose parents were North American vine varieties and, based on analysis of their pedigree, could carry the resistant haplotypes of the *Rpv3* gene. In the geneplasm of the studied cultivars – potential carriers of the studied gene – were present *V. riparia*, *V. labrusca*, *V. aestivalis*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. lincecumii*. The study also covered a number of genotypes that should have no *Rpv3* gene such as *Vitis vinifera* and its hybrids with *V. amurensis*.

The vines' DNA was extracted from leaves using the CTAB method (Rogers, Bendich, 1985). The genotypes were determined using polymerase chain reaction (PCR) and the DNA-markers recommended for identification of the alleles of the *Rpv3* gene (Di Gaspero et al., 2012). PCR was performed in a finite volume of 25 µl following the standard protocol and using the Sintol reagent kit (Moscow, Russia). DNA amplification was performed in Eppendorf MasterCycler Gradient Thermal Cycler (Germany) with the following protocol for every DNA-marker: 5 minutes at 95 °C for initial denaturation followed by 35 cycles (10 seconds for denaturation at 95 °C, 30 seconds for annealing the primers at 55 °C, 30 seconds for synthesis at 72 °C, and 3 minutes for the last cycle of synthesis at 72 °C). The reaction products were separated using capillary electrophoresis, and the size of the amplified fragments was estimated with the ABI Prism 3130 automatic genetic analyzer using software packages GeneMapper and PeakScanner. The DNA of the Dunavski lazur, Seyve Villard 12-375 and Noah varieties with known allele sizes for the studied loci (Di Gaspero et al., 2012) were used as controls to specify the sizes of the amplified fragments.

The molecular genetic study was carried out using the equipment provided by Shared Equipment Center "Genomic and Postgenomic Technologies" of North-Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking.

Results and discussion

The performed study determined the allele state of downy mildew-resistant gene *Rpv3* in the genotypes of 35 vine cultivars (Table). The gene's resistant haplotypes were identified in 19 varieties: Dunavsky lazur, Noa, Seyve Villard 12-375, Dekabriskiy, Dunavska gymza, Original, Talisman, Kutuzovskiy, Kodryanka, Rusbol, Storgozya, R65, Kishmish 342, Srebrostrui, VIII₂-2-48, Armalaga, Poliuks, Podarok Magaracha, Melody (Figure).

In the studied sample haplotype *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ occurred more often than others: it was detected in 14 genotypes (see Table).

In 12 cultivars this haplotype was identified for the first time.

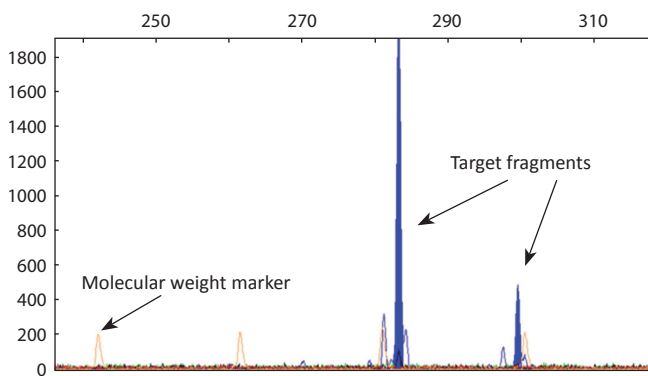
Haplotype *Rpv3*³²¹⁻³¹² was for the first time identified in three cultivars: Armalaga, Poliuks and Podarok Magaracha. DNA-marker analysis identified haplotype *Rpv3*^{null-271} only in the melody species. The Noah variety that we used as one of the reference genotypes, also carried *Rpv3*³²¹⁻³¹² and *Rpv3*^{null-271}.

According to the published data, haplotype *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ we identified in cultivars Dekabrskiy, Dunavska gymza, Original, Talisman, Kutuzovskiy, Kodryanka, Rusbol, Storgozya, R65, Kishmish 342, Srebrostruy, VIII₂-2-48, is inherited from the geneplasm of *V. rupestris*. In the analyzed sample of grapevine cultivars six genotypes carrying *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ out of twelve inherited the resistant allele directly from their parent variety

Results of analysis of vine genotypes of different origin for the SSR loci UDV305 and UDV737 linked with downy mildew-resistant gene *Rpv3**

Species (variety)	Origin	UDV305				UDV737	
		Allele size, bp					
Dunavski lazur	Rkatsitely × Seyve Villard 12-375	299	326	279	295		
Noah	<i>Vitis riparia</i> × <i>Vitis labrusca</i>	321	0	271	312		
Seyve Villard 12-375	Seibel' 6468 × Seibel' 6905	299	361	279	299		
Dekabrskiy	Korna niagra × Seyve Villard 12-375	299		279	285		
Dunavska gymza	(Mavrud × Pinot noir) × Seyve Villard 12-375	299		279	293		
Original	Damasskaya roza × Seyve Villard 20-365	299	322	279			
Talisman	Frumoassa alba × Vostorg	299	326	279	295		
Kutuzovskiy	Moldavskiy × Seyve Villard 20-365	299		279	285		
Kodryanka	Moldova × Marshalskiy	299		279	285		
Rusbol	Seyve Villard 12-375 × Sverkhramniy bessemyanniy	299		279			
Storgozya	(Mavrud × Pinot noir) × Seyve Villard 12-375	299		279	295		
R65	Zala dyoengye × (Gloria × Koroleva vinogradnikov) × Muscat zimniy	299		279	289		
Kishmish 342	Seyve Villard 12-375 × Perlette	299	342	279			
Srebrostruy	Rkatsitely × Seyve Villard	299	326	279	295		
VIII ₂ -2-48	Moldova × {Pobeda × [Katta-Kurgan × (Kishmish rozoviy × Kishmish beliy)]}	299		279			
Armalaga	(Armlong × Malaga)	321	334	271	312		
Poliuks	Oberlen 595 (<i>V. riparia</i> × Game cherniy) × Foster white seedling	229	321	312			
Podarok Magaracha	Rkatsitely × Magarach 2-57-72	321		297	312		
Melody	Seyval blanc × Geneva white 5 (Pinot blanc × Ontario)	0		271			
Vesta	(Avgusta × <i>V. amurensis</i>) × (Kentavr magarachskiy × Levokumskiy)	231	285	293	297		
B 7-2	<i>Vitis vinifera</i> × <i>Vitis labrusca</i>	0		295	312		
Doyna	Korna niagra × (Cabernet Sauvignon × Seyve Villard 23-657)	290		279	285		
Yalovenskiy Stoloviy	Ichkimar × Seyve Villard 20-366	299		281	295		
Agadai	Local cultivar of Dagestan <i>Vitis vinifera</i>	326		289	295		
Alfa	<i>Vitis vinifera</i> × <i>Vitis riparia</i>	296		285	303		
Antaris	Saperavi × Tsimlyanskiy cherniy	326		301	295		
Granatoviy	Saperavi × Cabernet Sauvignon	254		283	285		
Golubok	Severniy × (Vishnyoviy + Odesskiy ranniy + 1-17-54)	322		285	295		
Dmitriy	Varousset × Granatoviy	254		285	295		
Dostoyniy	Phillokseroustoychiviy Dzhemete × Muscat Gamburg	320		293	295		
Krasnostop AZOS	Phillokseroustoychiviy Dzhemete × Krasnostop anapskiy	320		293	295		
Murometc	Severniy × Pobeda	342		285			
Pomoriyskiy biser	Misket cherven × Seyve Villard 12-375	300		293	301		
Cvetochniy	Severniy × pollen of Muscat cultivars	322	333	285			
Fioletoviy ranniy	Severniy × Muscat Gamburg	300		293	301		

* Data for the identified alleles are presented in a way chosen by G. Di Gaspero et al. (2012).



Visualization of the results of PCR – product fragment analysis with the UDV737 marker of the Storgoziya cultivar.

Seyve Villard 12-375. These were cultivars Dekabrskiy, Dunavska gymza, Rusbol, Storgoziya, Kishmish 342, and Srebrostruy. The Seyve Villard series are complex interspecies hybrids that are often used in grapevine breeding as resistance donors, and Seyve Villard 12-375 is one of the most known hybrids in the series that carry the geneplasm of *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. lincecumii*. In the Kodryanka and VIII₂-2-48 varieties, haplotype *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ is inherited from parent variety Moldova (Guzal' kara × Seyve Villard 12-375), which means in this case Seyve Villard 12-375 has also served as a gene donor. According to the pedigree of R65 (Zala dyoengye (Seyve Villard 12-375 × Jemchug Saba) × (Gloria × Koroleva vinogradnikov) × Muscat zimniy) the resistant allele was inherited from Seyve Villard 12-375. However, Seyve Villard 12-375 is also considered one of the parents of the Pomoriyski biser variety, which carries no *Rpv3* gene haplotype making it resistant to downy mildew.

In the genotype of the Talisman cultivar, the resistant allele was inherited from the Frumoassa alba variety, whose parent is Seyve Villard 20-473. Seyve Villard 20-365 served as a gene donor in varieties Original and Kutuzovskiy.

It is considered that resistant haplotype *Rpv3*^{null-271} initially originated from either *V. labrusca* or *V. riparia*. This is the haplotype we identified in American variety Melody. In the beginning, when analyzing its pedigree (Seyval blanc × Geneva white 5 (Pinot blanc × Ontario)) for its inclusion as a potential gene donor we assumed Seyval blanc (another name of Seyve Villard 5-276) to be the resistivity donor since its genetic formula contained *V. rupestris* and *V. aestivalis*. However, if we assume that *Rpv3*^{null-271} is inherited either from *V. labrusca* or from *V. riparia*, the indicated resistance allele in Melody can be inherited from Ontario (25 % *V. vinifera* + 75 % *V. labrusca*).

Haplotype *Rpv3*³²¹⁻³¹² was identified in cultivars Armalaga, Poliuks and Podarok Magaracha. The published data indicate the source of this resistant haplotype to be either *V. labrusca* or *V. riparia*. In variety Armalaga, *Rpv3*³²¹⁻³¹² was inherited from *V. labrusca*, and in Poliuks – from *V. riparia*, which is confirmed by their pedigrees. Meanwhile, the pedigree of Podarok Magaracha remains an open issue. One of the parent varieties it inherited its mildew resistance from was probably Magarach 2-57-72 (Mtsvane × Sochinskiy cherniy). The

Sochinsky cherniy first discovered by P.Ya. Golodriga in the outskirts of Sochi has been lost and its exact genetic origin remains unknown, but its high resistance to fungal pathogens it transfers to its descendants makes it possible to classify it as an interspecies hybrid. The data we collected during the study allow us to assume that the pedigree of this species included either *V. labrusca* or *V. riparia*.

Conclusion

The presented study analyzed 35 vine genotypes of different origin to identify the presence of downy mildew-resistant gene *Rpv3* using DNA markers UDV305 and UDV737. The analysis identified the *Rpv3* gene in 19 grapevine cultivars, including 3 varieties, in which the presence of the gene had been confirmed earlier. The abovementioned markers allow one to identify a certain haplotype of the *Rpv3* gene. That way, for the first time, haplotype *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ has been detected in 12 interspecies varieties; *Rpv3*³²¹⁻³¹² – in three varieties; and *Rpv3*^{null-271} – in one variety. For the first time, the presence of the *Rpv3* gene has been confirmed for such grapevine cultivars as Dekabrskiy, Dunavska gymza, Original, Talisman, Kutuzovskiy, Kodryanka, Rusbol, Storgoziya, R65, Kishmish 342, Srebrostruy, VIII₂-2-48, Armalaga, Poliuks, Podarok Magaracha and Melody. All the genotypes with *Rpv3* are characterized by high or increased level of downy mildew resistance, which has been confirmed by the results of perennial observations (Petrov, Talash, 2010; Troshin, Radchevsky, 2010). The performed DNA analyses has also allowed us to assume that the parent varieties of Podarok Magaracha, whose pedigree remains unclear, are interspecies varieties carrying the geneplasm of either *V. labrusca* or *V. riparia*.

The results obtained can be used for selection of initial varieties to breed cultivars resistant to downy mildew.

Acknowledgements

The study was carried out with the financial support from Russian Foundation for Basic Research and from the Administration of Krasnodar Region (grant No. 16-44-230314 p_a).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Allewelt G., Possingham J.V. Progress in grapevine breeding. Theor. Appl. Genet. 1988;75:669-673.
- Bellin D., Peressotti E., Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Adam-Blondon A.F., Cipriani G., Di Gasparo 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. DOI 10.1007/s00122-009-1167-2.
- Di Gasparo G., Copetti D., Coleman C., Castellarin S.D., Eibach R., Kozma P., Lacombe T., Gambetta G., Zvyagin A., Cindrić P., Kovács L., Morgante M., Testolin R. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. Theor. Appl. Genet. 2012;124:227-286. DOI 10.1007/s00122-011-1703-8.
- Eibach R., Zyprian E., Welter L., Töpfer R. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. Vitis. 2007;46:120-124.

- International Variety Catalogue VIVC. Julius Kuhn-Institut. <http://www.vivc.de>.
- Ochssner I., Hausmann L., Töpfer R. *Rpv14*, a new genetic source for *Plasmopara viticola* resistance conferred by *Vitis cinerea*. Vitis: J. Grapevine Res. 2016;55(2):79-81. DOI 10.5073/vitis.2016.55.79-81.
- Petrov V.S., Talash A.I. Pest Resistance in Grape Varieties. Krasnodar, 2010. (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;19(1):69-76.
- 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. DOI 10.1007/s00122-011-1695-4.
- Talash A.I. Grades of pest harmfulness in vineyards. Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South Russia. 2010;4(3):24-29. (in Russian)
- Troshin L.P., Radchevskiy P.P. Grapevine: Illustrated Catalog. Released, Promising, and Mass-Production Varieties. Rostov n/D., 2010. (in Russian)
- Venuti S., Copetti D., Foria S., Falginella L., Hoffmann S., Bellin D., Di Gaspero G. 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. DOI 10.1371/journal.pone.0061228.
- Wan Y., Schwaninger H., He P., Wang Y. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. Vitis. 2007;46:132-136.
- Zini E., Raffener M., Di Gaspero G., Eibach R., Grando M.S., Letschka T. Applying a defined set of molecular markers to improve selection of resistant grapevine accessions. Acta Horticulturae. 2014;1082:73-78. DOI 10.17660/ActaHortic.2015.1082.9.

Влияние погодно-климатических условий на содержание белка и масла в семенах сои на Северном Кавказе

А.Ю. Новикова^{1, 2}, И.В. Сеферова¹✉, А.Ю. Некрасов³, И.Н. Перчук¹, Т.В. Шеленга¹, М.Г. Самсонова², М.А. Вишнякова¹

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Кубанская опытная станция – филиал Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Краснодарский край, Гулькевичский район, пос. Ботаника, Россия

Для адресного подбора исходного материала в селекции на качество семян сои необходимо знание зависимости соответствующих характеристик семян от погодно-климатических условий в конкретном регионе. Определенное влияние на качество семян оказывает и глобальное изменение климата. Поэтому целью данной работы было выявление связи изменчивости содержания белка и масла в семенах сои с климатическими параметрами на Северном Кавказе, а также трендов этой изменчивости за длительный временной период. На основе изучения 1442 образцов сои из коллекции ВИР оценены тенденции изменчивости содержания белка и масла в семенах в условиях Краснодарского края за период 1987–2015 гг. Методом регрессионного анализа в разностях с последовательным включением переменных построены модели зависимости содержания белка и масла от обобщенных агрометеорологических показателей. В течение 1987–2015 гг. для периода с температурами выше 10 °C наблюдался рост сумм активных температур на 218 °C/10 лет и недостоверное уменьшение осадков на 20.9 мм/10 лет. В динамике содержания белка выявлен тренд к росту на 2.5 % за 10 лет, по содержанию масла достоверной тенденции нет. Наибольшее среднее содержание масла и наименьшее белка было у среднеспелых образцов (22.2 и 38.8 %), а относительно высоким содержанием белка характеризовались ранние (21.6 и 40.0 %) и поздние (20.2 и 39.9 %) образцы. Содержание белка росло с увеличением продолжительности периода с температурами выше 22 °C и уменьшалось с ростом осадков за период с температурами выше 18 °C. Накоплению масла в семенах способствовало увеличение гидротермического коэффициента за период с температурами выше 19 °C, у поздних сортов этому препятствовал длительный осенний период с температурами ниже 15 °C. Многолетний рост содержания белка обусловлен как изменением климата, так и генетическим улучшением сортов.

Ключевые слова: соя; белок; масло; изменения климата; Северный Кавказ.

Impact of weather and climate on seed protein and oil content of soybean in the North Caucasus

L.Yu. Novikova^{1, 2}, I.V. Seferova¹✉, A.Yu. Nekrasov³, I.N. Perchuk¹, T.V. Shelenga¹, M.G. Samsonova², M.A. Vishnyakova¹

¹ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

³ Kuban Experiment Breeding Station, Branch of N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, village Botanika, Gul'kevichskii Region, Krasnodarskii Krai, Russia

For a targeted search of initial breeding material for the quality of soybean seeds, it is necessary to know the patterns of the dependence of the corresponding seed characters on the weather and climatic conditions in a particular region. Global climatic change, the concretization of which is relevant, has a share in this dependence. Thus, the aim of this work was to identify the relationship between the variability of protein and oil content in soybean seeds with climatic parameters in the North Caucasus as well as trends in this variability over a long time period. The study of 1442 soybean accessions from VIR collection in the Krasnodar region during 1987–2015 had been carried out and the tendencies of the variability of protein and oil content in seeds in this environment were estimated. The regression analysis in differences with forward stepwise selection of variables has been used to construct models for the dependence of the protein and oil content on generalized agrometeorological indices. During 1987–2015, for the period with temperatures above 10 °C, the sums of active temperatures increased by 218 °C/10 years and precipitation decreased by 20.9 mm/10 years. In the dynamics of protein content, a trend has been revealed as an increase by 2.5 % over 10 years, while there is no reliable trend in oil content. The maximum average mean of oil content and the smallest protein were in the middle-maturing accessions (22.2 and 38.8 %), and a relatively high protein content was detected, on average, in the early- (21.6 and 40.0 %) and late-maturing (20.2 and 39.9 %) varieties. The protein content had been increasing with a growth of the duration of the period with temperatures above 22 °C and decreasing with a raise in precipitation over a period of temperatures above 18 °C. The accumulation of oil in seeds was promoted by an increase of the hydrothermal coefficient over the period with temperatures above 19 °C, and, in late-maturing varieties, prevented by a prolonged

autumn period with temperatures below 15 °C. Long-term growth in protein content is due to both climatic change and genetic improvement of varieties.

Key words: soybean; protein; oil; climate change; North Caucasus.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Новикова Л.Ю., Сеферова И.В., Некрасов А.Ю., Перчук И.Н., Шеленга Т.В., Самсонова М.Г., Вишнякова М.А. Влияние погодноклиматических условий на содержание белка и масла в семенах сои на Северном Кавказе. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):708-715. DOI 10.18699/VJ18.414

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Novikova L.Yu., Seferova I.V., Nekrasov A.Yu., Perchuk I.N., Shelenga T.V., Samsonova M.G., Vishnyakova M.A. Impact of weather and climate on seed protein and oil content of soybean in the North Caucasus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):708-715. DOI 10.18699/VJ18.414 (in Russian)

Соя (*Glycine max* Merr.) – самая популярная в мире белково-масличная культура, имеющая широкий спектр применения. История сои – это история адаптации вида в условиях различных режимов увлажнения, температуры, длины дня и других климатических параметров. Народная, а затем и научная селекция сои первоначально была нацелена на повышение содержания масла в семенах. На это указывает само историческое название сои – масляничные бобы, а также данные из старых научных публикаций (Врочинский, 1935). За последние десятилетия селекционные усилия во всем мире сместились в сторону повышения содержания белка в семенах (Зеленцов, Мошненко, 2016). Согласно авторитетному источнику – оценочной базе данных коллекции сои Сельскохозяйственного департамента США, насчитывающей около 20 тыс. образцов, содержание белка в семенах культурной сои варьирует в пределах 31.7–57.9 %, масла – 6.5–25.6 % (USDA, 2018). Масштабные исследования коллекционных образцов сои, выполнявшиеся в ВИР, выявляли схожие интервалы этих показателей (Щелко и др., 1990).

Оптимальным для формирования генеративных органов и плодоношения сои считают среднесуточные температуры 18–22 °C (Белолобцев, Сенников, 2012). Наш анализ многолетних данных, основывающийся на регрессионных моделях хозяйственно ценных признаков сорта Комсомолка в условиях Краснодарского края, выявил, что главным погодноклиматическим фактором роста и развития сои является гидротермический коэффициент (ГТК), т.е. соотношение осадков и температур. Показано, что вегетационный период укорачивается с уменьшением ГТК при температурах выше 15 °C, а урожайность и высота растений положительно связаны с ГТК при температурах выше 10 °C (Сеферова и др., 2011).

Известно, что содержание белка и масла в семенах сои подвержено высокой генотипической и модификационной изменчивости. В литературе накоплено множество сведений о зависимости этих показателей от района возделывания культуры, генотипа сорта, группы спелости, использования разных приемов агротехники и т.п. Неоднократно показано, что в разных регионах земного шара гораздо более выражено влияние климата на содержание белка в семенах, чем на содержание масла (Ojo et al., 2002; Sudaric et al., 2006; Ермолина и др., 2011), и оба эти признака значительно варьируют в разных условиях выращивания (Piper, Boote, 1999; Bellaloui et al., 2015; Song et al., 2016).

Результаты, полученные ранее в Краснодарском крае, где проводилось и настоящее исследование, свидетель-

ствуют, что высокое содержание масла наблюдается при повышенном увлажнении и относительно невысокой температуре, а белка – при сухой погоде и повышенной температуре (Енкен, 1953; Мякушко, Баранов, 1984; Степанова, 1985; Баранов, Лукомец, 2005; Петибская, 2012). При этом отмечалось, что межсортовые различия содержания белка и масла у сои могут быть меньше межгодовых (Енкен, 1953). Выявление закономерностей взаимосвязи признаков и среды для определения оптимальных районов производства сои и выбора адаптивных сортов приобретает особую актуальность в связи с явными изменениями климата, отмечаемыми в том числе в районе нашего исследования (Зеленцов, Мошненко, 2012).

Качественный состав семян, кроме условий выращивания, зависит от целого ряда факторов, одним из которых является селекционное улучшение культуры. На современном этапе селекционеры уделяют значительное внимание повышению содержания как белка, так и масла в семенах сои. Получены сорта с содержанием белка в семенах 47–49 %, а в отдельные годы до 50 % при достаточно высокой продуктивности (Кочегура и др., 2005). Учитывая этот, а также ряд других факторов, включая агротехнику, для исследования влияния климата на признаки сельскохозяйственных культур необходимо вычленять именно погодноклиматические зависимости. Для этого используют методы исключения трендов из многолетних наблюдений, позволяющие существенно улучшить качество агрометеорологических регрессионных моделей (Kaukoranta, Nakala, 2008; Per et al., 2017). Одним из методов исключения трендов является анализ в разностях, т.е. анализ годовых приростов признаков (Елисеева, 2007; Сиротенко, 2012), не нашедший пока широкого применения в агрометеорологии. Анализ годовых приростов значений признаков был успешно использован для построения моделей динамики продолжительности вегетации, массы 1 000 семян, высоты растения и урожайности сои в наших предыдущих исследованиях (Сеферова и др., 2011).

Цель данной работы – выявление связи изменчивости содержания белка и масла в семенах сои с агроклиматическими показателями на Северном Кавказе, а также трендов этой изменчивости за длительный временной период.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 1 442 образца сои из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР), происходящих из 35 стран. Выборка представлена преимущественно селекционными сортами. Исследование проводили в 1987–2015 гг. в

Краснодарском крае на филиале ВИР «Кубанская опытная станция» – КОС ВИР (45°13' с. ш., 40°47' в. д.). Ежегодно в исследование включали от 12 до 516 образцов. Каждый образец изучался на протяжении одного-трех лет. Наиболее продолжительными – 14 лет (1987–2000 гг.) были наблюдения за сортом Комсомолка, который являлся стандартом в полевой и биохимической оценке образцов. Измеряли содержание белка и масла в семенах, продолжительность вегетации. Использовали также данные по продуктивности, массе 1000 семян, высоте растений за 1987–2001 гг. Были использованы суточные данные метеопункта КОС ВИР.

Полевую оценку и измерения биохимических показателей проводили в соответствии с методическими указаниями ВИР (Корсаков и др., 1975; Вишнякова, 2010). До 2006 г. белок определяли по Кьельдалю ($N \times 6.25$), масло – по массе сухого обезжиренного остатка в модификации Рушковского (Ермаков, 1987). С 2007 г. белок и масло определяли методом инфракрасной спектроскопии (NIR) на анализаторе Infratec 1241 Grain Analyzer (Швеция). Калибровочные кривые стандартизированы фирмой-производителем.

Рассчитано среднее по коллекции содержание белка и масла за каждый год. Определены тренды среднего по коллекции содержания белка и масла за период исследования, построены регрессионные модели этих показателей. Рассчитаны средние температуры и суммы осадков за месяцы с апреля по октябрь и обобщенные агрометеорологические показатели: даты перехода выше и ниже температур 10, 11, ... 22 °C, продолжительности периодов с температурами выше указанных пределов, суммы активных и эффективных температур, средние активные и эффективные температуры, ГТК этих интервалов. Эти показатели использованы в качестве переменных в регрессионных моделях. Методом регрессионного анализа с последовательным включением переменных построены модели зависимости содержания белка и масла от агроклиматических показателей. Из временных рядов исключен тренд за счет перехода к анализу годовых приростов показателей.

По *t*-критерию Стьюдента оценена достоверность различий биохимических показателей (и других хозяйственно ценных признаков) у образцов трех групп, выделенных по срокам созревания. В исследовании принят уровень значимости 5 %.

Результаты

Среднее содержание белка в семенах образцов в изученной выборке (далее – коллекции) варьировало от 27.2 до 50.0 %, масла – от 15.2 до 26.6 % (рис. 1). Крайние пределы изменчивости составили для белка 23.8–51.1 %, для масла – 13.8–27.2 %. Содержание масла и белка в образцах обратно коррелированы, коэффициент корреляции $r = -0.53$. При увеличении масла в среднем на 1 % белок уменьшался на 1.1 %.

На рис. 1 отображены все выявленные в исследовании сочетания содержания белка и масла в семенах. В них суммируется как генетическая, так и средовая изменчивость образцов. Видно, что самые высокие значения белка соответствуют низким значениям масла. Этот вариант было

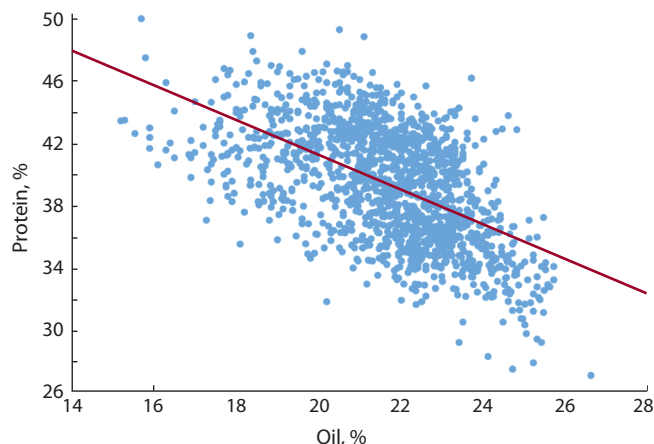


Fig. 1. Distribution of soybean accessions by protein and oil contents in seeds.

предложено называть липидно-деградационным (ЛД) (Зеленцов, Мошненко, 2016). Достаточно высокие значения белка приходятся и на средние значения масла. Небольшое число образцов имеют одновременно высокие значения содержания белка и масла, т. е. относятся по определению цитируемых авторов к углеводно-деградационному варианту (УД), поскольку снижается количество углеводов. Высокое содержание масла выявляется как при УД варианте, так и при средних значениях содержания белка. Наиболее высокие значения масла соответствуют низким значениям по белку. Этот вариант мы предлагаем назвать протеин-дефицитным (ПД).

В 1987–2015 гг. на Кубанской ОС наблюдался достоверный рост сумм активных температур (выше 10 °C) на 218 °C/10 лет и слабое уменьшение осадков – на 20.9 мм/10 лет.

Отмечалась достоверная тенденция к росту среднего по коллекции содержания белка со скоростью 2.5 %/10 лет; доля масла снижалась незначительно – на 0.1 %/10 лет (рис. 2). Рост белка в семенах мог определяться тремя причинами: изменениями климата, обогащением коллекции высокобелковыми образцами современной селекции и агротехникой. Учитывая, что изучение коллекции выполнялось на КОС ВИР все годы по единой методике, возможное влияние изменения агротехники было исключено из рассмотрения.

Для выявления селекционного тренда сравнили динамику среднего по исследуемой выборке и сорта-стандарта Комсомолка в 1987–2000 гг. За этот период содержание белка и масла в семенах сорта Комсомолка не имело достоверных трендов. Среднее по коллекции содержание белка достоверно увеличивалось на 5 % за 10 лет (рис. 3, а). Это свидетельство вклада селекции в увеличение содержания белка и отсутствие такового в увеличение масличности. Для выявления погоднo-климатических зависимостей были рассчитаны приросты всех исследуемых показателей за год (разности) (см. рис. 3, б). Корреляции приростов среднего по коллекции и сорта Комсомолка достигли: для белка $r = 0.90$, для масла $r = 0.88$.

Регрессионный анализ показал, что содержание масла (C_o) положительно зависело от ГТК за период с температурами выше 19 °C ($ГТК_{19}$) и отрицательно – от про-

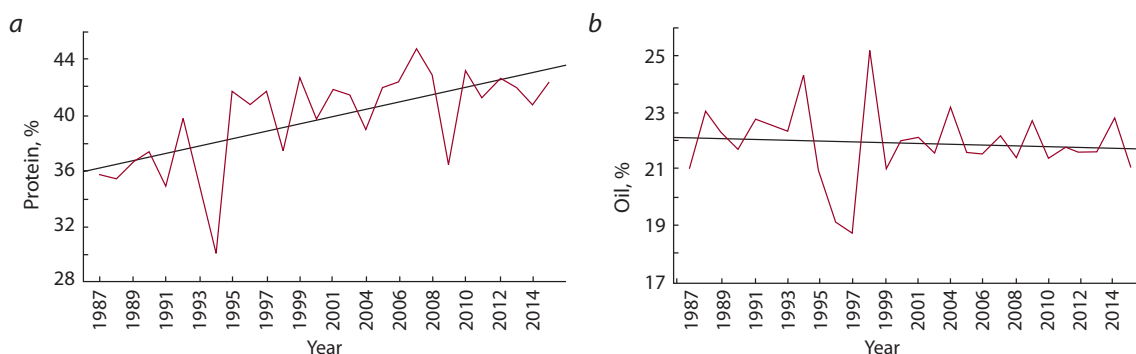


Fig. 2. Time variation of the contents of (a) protein and (b) oil, both averaged over the collection, Kuban experimental farm, 1987–2015.

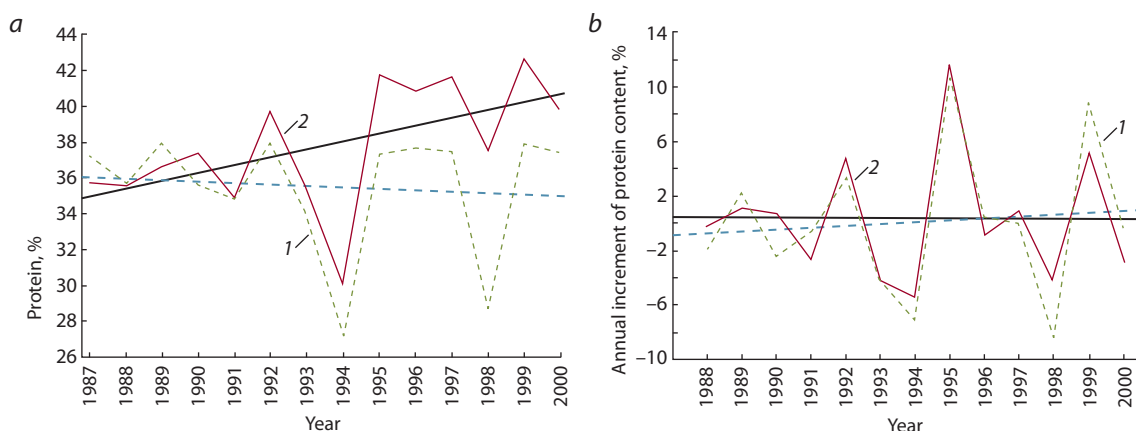


Fig. 3. Time variation of (1) protein content in Komsomolka variety and (2) protein content averaged over the collection: (a) starting levels, (b) annual increments.

должительности вегетации в осенний период при температурах 15–10 °C (L_{15-10}):

$$\Delta C_o = -0.012 + 0.951 \text{ГТК}_{19} - 0.041 L_{15-10}, \quad R^2 = 0.49. \quad (1)$$

Здесь Δ – годовой прирост показателя, R^2 – коэффициент детерминации уравнения.

Главным фактором изменчивости содержания белка (C_p) является продолжительность периода с температурами выше 22 °C (L_{22}). Осадки за период с температурами выше 18 °C (P_{18}) снижают содержание белка:

$$\Delta C_p = -0.201 + 0.092 \Delta L_{22} - 0.010 \Delta P_{18}, \quad R^2 = 0.65. \quad (2)$$

Объясненная уравнением доля межгодовой изменчивости составила 65 %. Расчет частных коэффициентов детерминации показал, что температурный фактор определял 44 % изменчивости, осадки – 21 %. То есть рост осадков при температурах выше 18–19 °C способствует формированию масла и, соответственно, снижению доли белка. В период с температурами выше 22 °C, напротив, накопление масла сокращается и процентное соотношение смещается в сторону белка. Продолжительный период роста при температурах ниже оптимальных 15 °C в осенний период также приводит к уменьшению содержания масла и увеличению процентного содержания белка у поздних сортов. Полученные результаты подтверждают, что накопление масла успешно проходит в интервале

оптимальных для формирования генеративных органов и плодоношения сои температурах 18–22 °C и увеличивается с ростом ГТК₁₉.

По формулам (1) и (2) рассчитаны скорости изменения содержания белка и масла, объясняемые изменениями климата. В 1987–2015 гг. скорости изменения агрометеорологических факторов, значимых для биохимических показателей сои, составили: $\Delta L_{22} = 21.1$ сут/10 лет, $\Delta P_{18} = 31.1$ мм/10 лет; $\Delta L_{15-10} = -1.8$ сут/10 лет, $\Delta \text{ГТК}_{19} = 0.016$ ед./10 лет. Расчетный климато-обусловленный тренд (без учета свободного члена, отражающего неклиматические воздействия) составляет для содержания белка 1.6 % за 10 лет, а для содержания масла – 0.1 %. Таким образом, из фактически наблюдающегося повышения содержания белка на 2.5 %/10 лет, 1.6 % объясняются изменениями климата, а остальные 0.9 % можно отнести к успехам селекции.

Выявленные закономерности изменчивости биохимических показателей семян сои от тепло- и влагообеспеченности, полученные при анализе межгодовой изменчивости, подтверждаются зависимостью содержания белка и масла от продолжительности вегетации. Показано, что эти показатели нелинейно связаны с продолжительностью вегетации образцов (рис. 4).

Для дальнейшего анализа изучаемый набор был разделен на три группы по продолжительности вегетации

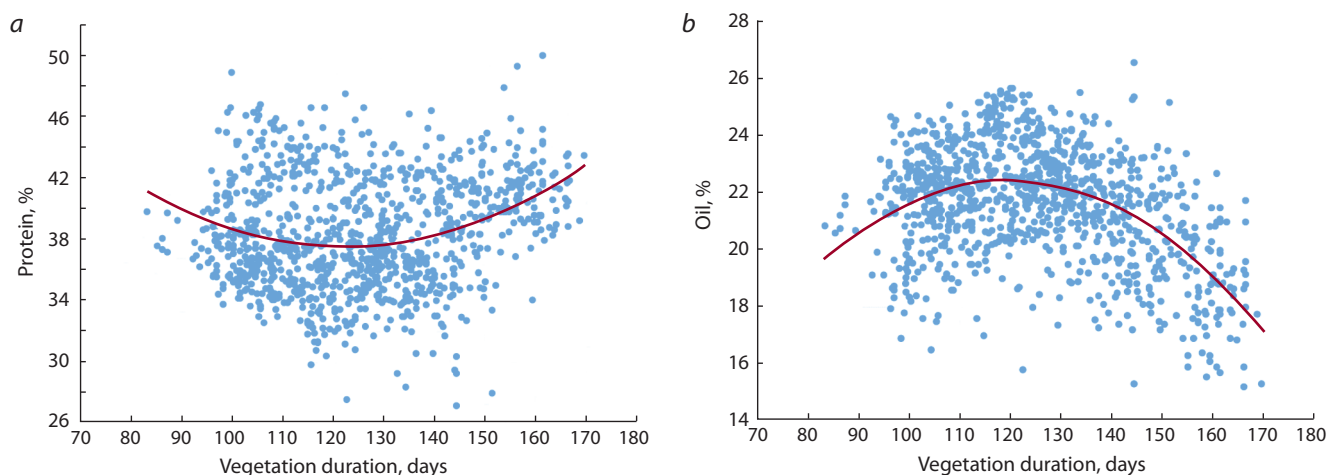


Fig. 4. Dependence of (a) protein content and (b) oil content in soybean seeds on vegetation duration in the Kuban experimental farm, VIR, approximated by a second-order polynomial.

Characterization of groups of soybean varieties differing in ripening time, Kuban experimental farm, VIR, 1987–2001

Vegetation, days	erformance, g/plant	1000 seed weight	Plant height, cm	Protein, %	Oil, %
80–110	20.1 ± 8.0	164.6 ± 23.8	67.3 ± 18.2	40.0 ± 3.6	21.6 ± 1.5
111–140	26.0 ± 8.5	166.8 ± 29.0	83 ± 14.8	38.8 ± 3.8	22.2 ± 1.6
141–170	26.9 ± 11.6	178.8 ± 46.7	88.4 ± 15.9	39.9 ± 3.4	20.2 ± 2.1
Total	24.9 ± 9.8	170 ± 34.9	81 ± 17.8	39.4 ± 3.7	21.7 ± 1.8

Note. Mean values and standard deviations are shown.

(см. таблицу), которые можно определить как скороспелая (вегетация 80–110 сут), среднеспелая (111–140 сут) и позднеспелая (141–170 сут). Наибольшее среднее содержание масла – 22.2 % и наименьшее белка – 38.8 % были у среднеспелой группы, характеризующейся высокой продуктивностью – 26.0 г/растение и средним значением высоты растений – 83 см. Ранние образцы имели самое высокое содержание белка – 40.0 %, более низкое масла – 21.6 %, меньшую высоту растения и продуктивность. Образцы позднеспелой группы характеризовались высоким содержанием белка – 39.9 % и меньшим содержанием масла – 20.2 %, а также наибольшей высотой растений и наибольшей массой 1000 семян, а по продуктивности не отличались достоверно от среднеспелой группы.

Обсуждение

Широкий спектр использования сои требует создания специализированных сортов. Расширение ее производственного ареала, которое произошло в РФ в последние 10–15 лет, вызывает необходимость получения сортов разных групп спелости, оставляя приоритет за скороспелыми. При этом селекция любых сортов ориентирована на высокое качество семян, а именно на высокое содержание белка и масла – признаков, подверженных модификационной изменчивости.

В нашем исследовании, проводившемся на Северном Кавказе в течение 29 лет, выяснилось, что постоянно меняющиеся погодные условия и глобальные изменения климата способствуют повышению содержания белка в семенах. В целом по коллекции рост содержания белка

в семенах происходил со средней скоростью 2.5 % за 10 лет. В этот показатель, несомненно, вносит вклад и селекционное улучшение культуры. Об этом можно судить, сравнивая данные по изученной выборке с данными по сорту Комсомолка, используемому в течение 1987–2000 гг. в качестве стандарта. За этот период содержание белка и масла в семенах данного сорта не имело достоверных трендов. Полученные регрессионные модели содержания белка и масла объясняют 65 и 49 % межгодовой вариативности этих показателей соответственно. Согласно расчетам, вклад климатического фактора в рост белка составил 1.6 % за 10 лет, а 0.9 % можно отнести на счет пополнения коллекции современными сортами с генетически обусловленным более высоким содержанием белка. При этом увеличение содержания белка происходило на фоне роста сумм активных температур выше 10 °C на 218 °C/10 лет.

В США, главной соеосеющей стране мира, при изучении влияния целого ряда факторов на биохимические показатели семян сои было доказано, что среда – самый важный источник изменчивости содержания белка и масла (Bellaloui et al., 2015). В созданной в США унифицированной системе тестирования сортов сои было проведено самое длительное определение долговременных трендов в содержании белка и масла в семенах, продолжавшееся 51 год (1948–1998) (Yaklich et al., 2002). Работа велась на современных для соответствующих периодов сортах из всех регионов производства сои, включая южные провинции Канады, и всех групп спелости по американской классификации, принятой в те годы: с 00 по VIII. К со-

жалению, в исследовании не учитывались многолетние изменения климата, поскольку главной задачей было сравнение трендов в разных регионах и в разных группах спелости. Максимальное содержание белка (41.4 %) было зафиксировано у самых позднеспелых сортов, наибольшее количество масла (21.0–21.1 %) – у сортов II–IV групп спелости, которые при соотношении с нашей системой можно назвать среднеспелыми. Максимальное соотношение белок : масло (2.00–2.04) выявлено у сортов самых скороспелых групп 00–I, что свидетельствует о преобладании белка, а минимальное (1.99) – у самых позднеспелых групп VII и VIII, что свидетельствует о небольшом превышении у них масла по отношению к белку.

Эти результаты находятся в близком соответствии с полученными нами данными в отношении самых скороспелых и среднеспелых групп. В нашем исследовании ранние сорта имели белок на уровне 40.0 ± 3.6 % и сравнительно высокое масло – 21.6 ± 1.5 %. В данных системы тестирования США три самые скороспелые группы имели практически сравнимое с зафиксированным нами содержание белка – 40.4–40.9 %, но меньшее количество масла – 19.8–20.5 %. Наибольшим содержанием масла в Краснодарском крае (22.2 ± 1.6 %) и наименьшим – белка (38.8 ± 3.8 %), как и в работе американских авторов (Yaklich et al., 2002), характеризовалась группа среднеспелых образцов с продолжительностью вегетации 111–140 сут. Однако самые позднеспелые группы в США имели большее значение обоих показателей – 41.4 % белка и 20.9 % масла по сравнению с позднеспелыми в Краснодарском крае – 39.9 и 20.2 % соответственно. Это можно объяснить тем, что при более длительном вегетационном периоде у сортов VII–VIII групп спелости (200–220 сут), к примеру в южном штате Миссисипи, средние суточные температуры ноября – время уборки сои – составляют около 14°C (Usual Planting..., 1997), что сравнимо со среднесуточными температурами начала октября – сезона уборки позднеспелых сортов в Краснодарском крае. То есть синтез белка и масла в США не лимитируется низкими температурами октября–ноября и продолжается на 30–50 сут дольше.

Как в нашем исследовании, так и по данным других авторов содержание белка повышается с ростом температур (Sato, Ikeda, 1979; Wolf et al., 1982; Pipper, Boote, 1999; Song et al., 2016). Показано, что при дневных температурах выше 28°C содержание белка увеличивалось линейно с температурой (Dornbos, Mullen, 1992; Gibson, Mullen, 1996).

Оптимальными среднесуточными температурами для синтеза масла в течение 29 лет наших наблюдений были 18 – 22°C . Рост осадков при температурах выше 18 – 19°C способствует повышению содержания масла в семенах. Температуры выше 22°C и ниже 15°C (в осенний период) приводили к сокращению накопления масла и, соответственно, увеличению процентного содержания белка.

В публикациях американских ученых (Sato, Ikeda, 1979; Wolf et al., 1982) показано, что содержание масла в семенах сои повышалось до температуры 22°C и после этого выходило на плато. Большое значение для синтеза масла имеет увлажнение. Если в условиях засухи повышается содержание белка, то при повышении влаж-

ности при благоприятных для этого температурах (выше 18 – 19°C) увеличивается синтез масла (Лещенко и др., 1985; Dornbos, Mullen, 1992).

В цитируемой нами работе о долговременных трендах качества семян в США (Yaklich et al., 2002) приводятся данные о двадцатилетнем периоде с середины 1950-х до середины 1970-х гг., называемом *benign climate period* – периодом плодоносным, с благотворным или мягким климатом. В эти годы средняя температуры июля–августа была на 2°C ниже средней многолетней, а количество осадков выше. Значительно возросла урожайность многих культур, а у сои, кроме этого, увеличилось более чем на 1.5 % среднее содержание масла в семенах (Andresen et al., 2001). Однако в последующие годы для содержания масла не обнаруживалось какого-либо устойчивого тренда, и, напротив, с 1974 г. оно уменьшалось по необъясненным в публикации причинам (Yaklich et al., 2002).

Различие содержания белка и масла в семенах разных групп спелости можно трактовать, исходя из особенностей метаболизма семян. Синтез белков в семенах сои начинается на 10–15 сут раньше, чем накопление жирных кислот (Кочегура и др., 2005). У скороспелых сортов период налива семян укорочен, и запасные ткани семядолей, как правило, успевают накопить белок, но не полностью реализовать свой масличный потенциал, что определяет меньшее накопление масла и, соответственно, большую долю белка в семенах. Кроме того, налив семян у скороспелых сортов происходит в Краснодарском крае в условиях высоких температур (выше 22°C), что, как мы выявили, неблагоприятно для синтеза масла. Сорта средних сроков созревания наливаются в условиях с меньшими температурами, поэтому содержание масла оказывается наиболее высоким, пропорционально несколько сокращается содержание белка. У позднеспелых образцов низкие температуры сентября–октября (10 – 15°C) снижают накопление масла, поэтому содержание белка повышается. О максимальном накоплении масла в сортах сои среднеспелых групп свидетельствует также исследование, проведенное в Ростовской области РФ (Ермолина и др., 2011). В условиях Аргентины наибольшее содержание масла наблюдалось также у среднеспелых групп II–IV по американской системе (Dardanelli et al., 2006).

В отличие от белка, содержание масла в семенах сои за 29 лет наших наблюдений не показало какого-либо значимого тренда. Аналогичные результаты были получены при испытаниях, проведенных в разных регионах Африки: показано, что независимо от района исследования, влияние климата на содержание белка в семенах сои гораздо более выражено, чем на содержание масла (Ojo et al., 2002).

Итоговая гипотеза, предлагаемая нами как обобщение проанализированных данных, в виде схемы отображена на рис. 5. В благоприятных условиях масло накапливается и достигает генетически обусловленного максимума. Эти условия (среднесуточная температура 18 – 22°C при достаточном увлажнении) соответствуют оптимальным для формирования урожая семян сои (Белолюбцев, Сенников, 2012). В менее благоприятных условиях масло накапливается не полностью, а доля белка в семенах становится больше. Конкретные значения ГТК не были рассчитаны, так как на рост растений влияют не только атмосферные

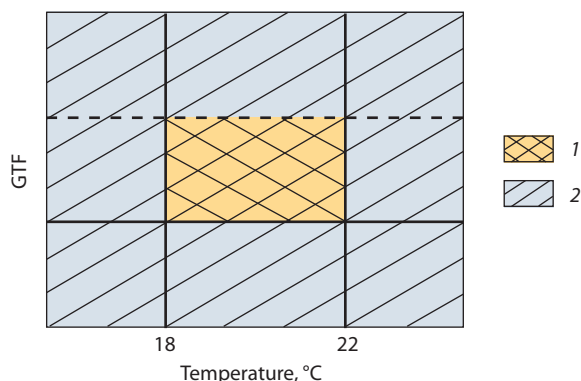


Fig. 5. Oil contents in soybean seeds depending on mean daily temperature and hydrothermal factor: (1) conditions favorable for oil accumulation, (2) unfavorable.

осадки, но и запасы доступной почвенной влаги. Мы предполагаем возможность избыточного увлажнения, но в нашем исследовании такие варианты не были зафиксированы. В генофонде сои имеется изменчивость по чувствительности к учитываемым параметрам, что делает возможным отбор генотипов для селекции в различных регионах.

Зависимость биохимических признаков семян сои, в частности изменчивость содержания белка и масла от погодных условий и изменений климата, показана нами для определенного региона РФ – Северного Кавказа. Выявленные вновь и подтвержденные нами известные ранее закономерности могут быть полезны для выбора регионов производства сои для конкретных целей: получения преимущественно белка или масла. При этом целесообразно подбирать в генофонде соответственно высокобелковые или высокомасличные формы определенных групп спелости.

Acknowledgements

This work was supported by the Federal Targeted Program “Research and development in the top-priority fields of the scientific and technological complex of Russia, 2014–2020”, agreement 14.575.21.0136 of 26.09.2017. Experiments were conducted at the premises of the unique research facility “VIR plant genetic resources gene bank”.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andresen J.A., Alagaraswamy G., Rotz C.A., Ritchie J.T., LeBaron A.W. Weather impacts on maize, soybean, and alfalfa production in the great lakes region. 1895–1996. *Agron. J.* 2001;93:1059–1070. DOI 10.2134/agronj2001.9351059x.
- Baranov V.F., Lukomec V.M. (Ed.). Soybean: Biology and Technology of Cultivation. Krasnodar: Sovetskaya Kuban' Publ., 2005. (in Russian)
- Bellaloui N., Bruns H.A., Abbas H.K., Mengistu A., Fisher D.K., Reddy K.N. Agricultural practices altered soybean seed protein, oil, fatty acids, sugars, and minerals in the Midsouth USA. *Front. Plant Sci.* 2015;6:31. DOI 10.3389/fpls.2015.00031.
- Belolyubcev A.I., Sennikov V.A. Bioclimatic Potential of Ecosystems: Manual. Moscow: Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 2012. (in Russian)

- Dardanelli J.L., Balzarini M., Martinez M.J., Cuniberti M., Resnik S., Ramunda S.F., Herrero R., Baigorri H. Soybean maturity groups, environments, and their interaction define mega-environments for seed composition in Argentina. *Crop Sci.* 2006;46(5):1939–1947. DOI 10.2135/cropsci2005.12-0480.
- Dornbos D.L., Mullen R.E. Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1992;69:228–231. DOI 10.1007/BF02635891.
- Eliseeva I.I. (Ed.). Econometrics. Moscow: Finansy i Statistika Publ., 2007. (in Russian)
- Enken V.B. Soybean. Economic value. In: Grain Legumes. Moscow; Leningrad: Sel'khozgiz Publ., 1953;174–220. (in Russian)
- Ermakov A.I. (Ed.). Methods of Biochemical Evaluation of Plants. Leningrad, 1987. (in Russian)
- Ermolina O.V., Antonov S.I., Korotkova O.V. Change of soybean seed quality during breeding in the Don region. *Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia.* 2011;6:20–28. (in Russian)
- Gibson L.R., Mullen R.E. Soybean seed composition under high day and night growth temperatures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996;73:733–737. DOI 10.1007/BF02517949.
- Iler A.M., Inouye D.W., Schmidt N.M., Høye T.T. Detrending phenological time series improves climate-phenology analyses and reveals evidence of plasticity. *Ecology.* 2017;98(3):647–655. DOI 10.1002/ecy.1690.
- Kaukoranta T., Hakala K. Impact of spring warming on sowing times of cereal, potato and sugar beet in Finland. *Agric. Food Sci.* 2008; 17:165–176. DOI 10.2137/145960608785328198.
- Kochegura A.V., Zelentsov S.V., Moshnenko E.V., Petibskaya V.S. Breeding and genetic improvement of biochemical parameters in soybean. *Maslichnye Kultury. Nauchno-Tekhnicheskii Byulleten VNIIMK = Oil Crops. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oil Crops.* 2005;2(133):24–35. (in Russian)
- Korsakov N.I., Adamova O.P., Budanova V.I. Methodical Guidelines on the Study of the Collection of Grain Legumes. Leningrad: VIR Publ., 1975. (in Russian)
- Leshchenko A.K., Mikhailov V.G., Sichkar V.I. Soybean Breeding, Seed Studies, and Seed Industry. Kiev: Urozhaj Publ., 1985. (in Russian)
- Myakushko Yu.P., Baranov V.F. Soybean. Moscow: Kolos Publ., 1984. (in Russian)
- Ojo D.K., Adebisi M.A., Tijani B.O. Influence of environment on protein and oil contents of soybeans seed (*Glycine max* (L.) Merrill). *Global J. Agric. Sci.* 2002;1(1):27–32. DOI 10.4314/gjass.v1i1.2199.
- Petibskaya V.S. Soy: Chemical Composition and Use. Krasnodar, 2012. (in Russian)
- Piper E., Boote K.I. Temperature and cultivar effects on soybean seed oil and protein concentrations. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999;76(10): 1233–1241. DOI 10.1007/s11746-999-0099-y.
- Sato K., Ikeda T. The growth responses of soybean to photoperiod and temperature. IV. The effect of temperature during the ripening period on the yield and characters of seeds. *Jpn J. Crop. Sci.* 1979;48:283–290. DOI 10.1626/jcs.48.283.
- Seferova I.V., Novikova L.Yu., Nekrasov A.Yu. Assessment of the response of soybean cv. Komsomolka to climate changes in the Krasnodar region. *Maslichnye Kultury. Nauchno-Tekhnicheskii Byulleten VNIIMK = Oil Crops. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oil Crops.* 2011;1(146–147):72–77. (in Russian)
- Shchelko L., Sedova T., Kornejchuk V., Pastukha L., Sinskiy T., Gofirek P., Baresh I., Segalova I. The International Comecon List of Descriptors for the Genus *Glycine* Willd. Leningrad, 1990. (in Russian)
- Sirotenko O.D. Basis of Agricultural Meteorology. Vol. 2: Methods of Calculations and Forecasts in Agricultural Meteorology. Book 1: Mathematical Models in Agricultural Meteorology. Obninsk, 2012. (in Russian)

- Song W., Yang R., Wu T., Wu C., Sun S., Zhang S., Jiang B., Tian S., Liu X., Han T. Analyzing the effects of climate factors on soybean protein, oil contents, and composition by extensive and high-density sampling in China. *J. Agric. Food Chem.* 2016;64(20):4121-4130. DOI 10.1021/acs.jafc.6b00008.
- Stepanova V.M. *Climate and Variety: Soybean*. Leningrad: Gidrometeoizdat Publ., 1985. (in Russian)
- Sudaric A., Simic D., Vratarić M. Characterization of genotype by environment interactions in soybean breeding programmes of Southeast Europe. *Plant Breed.* 2006;125:191-194. DOI 10.1111/j.1439-0523.2006.01185.x.
- USDA (United States Department of Agriculture). Agricultural Research Service. <https://www.ars-grin.gov/npgs/index.html>. Available 08.02.2018.
- Usual Planting and Harvesting Dates for U.S. field crops. Agricultural Statistics Board December. National Agricultural Statistic Service, USDA. 1997. *Agricultural Handbook*.
- Vishnyakova M.A. (Ed.). *Collection of World Genetic Resources of Grain Legumes in VIR: Enlargement, Preservation, and Investigation*. St. Petersburg: VIR Publ., 2010. (in Russian)
- Vrochinskij I.D. Breeding works of the Harbin experimental field of CER. Work of the Agronomical Branch of the Land Department of CER over 12 years (1922–1933). Harbin, 1935;251-299. (in Russian)
- Wolf R.B., Cavins J.F., Kleiman R., Black L.T. Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids, and sugars. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1982;59:230-232. DOI 10.1007/BF02582182.
- Yaklich E.W., Vinyard B., Camp M., Douglass S. Analysis of seed protein and oil from soybean Northern and Southern Region Uniform Tests. *Crop. Sci.* 2002;42:1504-1515. DOI 10.2135/cropsci2002.1504.
- Zelentsov S.V., Moshnenko E.V. Ways of adaptation of Russian agriculture to global climatic changes by the example of soybean ecological breeding. *Nauchnyi Dialog = Scientific Dialogue*. 2012; 7:40-59. (in Russian)
- Zelentsov S.V., Moshnenko E.V. Prospects of the breeding of high-protein soybean varieties: modeling of mechanisms increasing protein content in seeds: Report 1. *Maslichnye Kultury. Nauchno-Tekhnicheskiiy Byulleten VNIIMK = Oil Crops. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oil Crops*. 2016;2(166):34-41. (in Russian)

ORCID ID

L.Yu. Novikova orcid.org/0000-0003-4051-3671
I.V. Seferova orcid.org/0000-0003-3308-9198
A.Yu. Nekrasov orcid.org/0000-0001-7332-1209
I.N. Perchuk orcid.org/0000-0001-6568-5248
T.V. Shelenga orcid.org/0000-0003-3992-5353
M.G. Samsonova orcid.org/0000-0001-8170-1260
M.A. Vishnyakova orcid.org/0000-0003-2808-7745

Recent advances in genetics of aggressive behavior

J.D. Davydova¹✉, S.S. Litvinov¹, R.F. Enikeeva¹, S.B. Malykh², E.K. Khusnutdinova^{1, 3}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS, Ufa, Russia

² Psychological Institute, Russian Academy of Education, Moscow, Russia

³ Department of Genetics and Fundamental Medicine, Bashkir State University, Ufa, Russia

One of the most important problems of modern neurobiology and medicine is an understanding of the mechanisms of normal and pathological behavior of a person. Aggressive behavior is an integral part of the human psyche. However, environmental risk factors, mental illness and somatic diseases can lead to increased aggression to be the biological basis of antisocial behavior in a human society. An important role in development of aggressive behavior belongs to the hereditary factors that may be linked to abnormal functioning of neurotransmitter systems in the brain yet the underlying genetic mechanisms remain unclear, which is due to a large number of single nucleotide polymorphisms, insertions and deletions in the structure of genes that encode the components of the neurotransmitter systems. The most studied candidate genes for aggressive behavior are serotonergic (*TPH1*, *TPH2*, *HTR2A*, *SLC6A4*) and dopaminergic (*DRD4*, *SLC6A3*) system genes, as well as the serotonin or catecholamine metabolizing enzyme genes (*COMT*, *MAOA*). In addition, there is evidence that the hypothalamic-pituitary system genes (*OXT*, *OXTR*, *AVPR1A*, *AVPR1B*), the sex hormone receptors genes (*ER1*, *AR*), neurotrophin (*BDNF*) and neuronal apoptosis genes (*CASP3*, *BAX*) may also be involved in development of aggressive behavior. The results of Genome-Wide Association Studies (GWAS) have demonstrated that *FYN*, *LRRTM4*, *NTM*, *CDH13*, *DYRK1A* and other genes are involved in regulation of aggressive behavior. These and other evidence suggest that genetic predisposition to aggressive behavior may be a very complex process.

Key words: aggression; aggressive behavior; behavior genetics; neurotransmitter systems; polymorphisms.

Современные представления о генетике агрессивного поведения

Ю.Д. Давыдова¹✉, С.С. Литвинов¹, Р.Ф. Еникеева¹, С.Б. Малых², Э.К. Хуснутдинова^{1, 3}

¹ Институт биохимии и генетики, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, Россия

² Психологический институт Российской академии образования, Москва, Россия

³ Кафедра генетики и фундаментальной медицины, Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

Понимание механизмов нормального и патологического поведения человека представляет собой одну из актуальных проблем современной нейробиологии и медицины. Агрессивное поведение является неотъемлемой частью человеческой психики, однако стрессовые воздействия окружающей среды, предрасполагающие психические расстройства и перенесенные соматические заболевания могут служить причиной развития повышенной агрессивности, которая, в свою очередь, рассматривается как биологическая основа антисоциального поведения в человеческом обществе. Немаловажное значение в развитии агрессивного поведения принадлежит наследственным факторам, среди которых ключевая роль отводится нарушениям нейромедиаторного обмена в головном мозге, однако генетические механизмы, лежащие в его основе, до сих пор не ясны. Это обусловлено большим количеством однонуклеотидных замен, инсерций и делеций в структуре генов, кодирующих компоненты нейромедиаторных систем, каждый из которых привносит лишь небольшой вклад (1–2 %) в формирование признака. Среди ключевых генов-кандидатов развития агрессивного поведения традиционно рассматриваются гены серотонинергической (*TPH1*, *TPH2*, *HTR2A*, *SLC6A4*) и дофаминергической (*DRD4*, *SLC6A3*) систем, а также гены ферментов их метаболизма (*COMT*, *MAOA*). Кроме того, имеются данные об участии генов гипоталамо-гипофизарной системы (*OXT*, *OXTR*, *AVPR1A*, *AVPR1B*) и рецепторов половых гормонов (*ER1*, *AR*), генов семейства нейротрофинов (*BDNF*) и нейронального апоптоза (*CASP3*, *BAX*) в развитии агрессивности. Результаты полногеномных анализов ассоциаций (GWAS) позволяют говорить о вовлеченности в развитие агрессивного поведения генов нерецепторной тирозинкиназы *FYN*, трансмембранного белка нервной системы *LRRTM4*, нейротримина *NTM*, кадгерина *CDH13*, участвующего в клеточной адгезии, и фермента *DYRK1A*, участие которого отмечено в пролиферации клеток и синаптической пластичности. Эти и другие литературные данные дают возможность предположить, что формирование генетической предрасположенности к агрессивному поведению – весьма сложный процесс, затрагивающий функционирование большого числа генов. Кроме того, ни один из наиболее изученных генов-кандидатов не объясняет значительной вариабельности по данному признаку, по причине чего в этой области до сих пор существует ряд открытых вопросов.

Ключевые слова: агрессия; агрессивное поведение; генетика поведения; нейромедиаторные системы; полиморфные варианты.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Davydova J.D., Litvinov S.S., Enikeeva R.F., Malykh S.B., Khusnutdinova E.K. Recent advances in genetics of aggressive behavior. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):716-725. DOI 10.18699/VJ18.415

Received 29.03.2018

Accepted for publication 02.07.2018

© AUTHORS, 2018

According to recent data, the social, economic, biological, and ecological instabilities of today's fast-paced society have a significant effect on the psychological state of an individual and may act as precursors for development of a mental pathology of various natures. Aggressive behavior (AB) is a complex trait, which is an indicator of experienced stress and implies actions aimed at inflicting moral, physical, or any other harm to another living being, an object or self (self-aggression or suicidal behavior). A reasonable degree of aggression remains an important component of social life in humans, since it is necessary to achieve one's stated goals, maintain and increase an individual's social standing, and overcome interpersonal conflicts (Baron, Richardson, 2001). However, anomalous or increased aggression often becomes the driving cause behind criminal acts of various degrees. The data of the Ministry of Internal Affairs of the Russian Federation show that about 2 mln crimes were committed in Russia in 2017, with murders and intended grievous bodily harm accounting for 9.7 and 24.6 thousand cases respectively (Rosstat, 2017). Similar picture may be observed in most regions, aside from South and Central American, as well as South African countries, where criminal rates are 2–3 times as high (UNODC, 2017). Thus, increased aggression is one of the most important social problems in human society.

Phenomenology of aggressive behavior

Nowadays, all forms of AB of both large and small scale (bullying, criminal behavior, terrorism, etc.) are seen as very complex multi-aspect phenomena, and the body of knowledge available is open to multiple interpretations and classifications. Most of them, however, agree that AB is an action intended to harm individuals who are motivated to avoid such harm (Baron, Richardson, 2001). Hence, AB may be impulsive or well thought-through, intended to harm the victim, or instrumental to achieving specific goals. It may also be considered a response to other person's negative actions or an attempt to prevent them (Tkachenko, 2016). The ways aggression manifests itself are also different, which may be illustrated by dichotomous classifications, i. e. physical and verbal, active and reactive, direct and indirect aggression. Aggression is often associated with a wide variety of negative emotions (anger or hatred), motives (intentions to insult or harm), and negative mindsets (racial and ethnic prejudices). However, despite the fact that all these factors have a significant part to play in AB, their presence is not a necessary condition for this type of behavior (Baron, Richardson, 2001).

It is worth noting that AB may manifest itself in both mentally healthy people and the ones with mental disorders. Apparently, in the latter category there is the whole series of factors affecting the development of AB and realization of aggression, the predominant one being presence of a specific psychopathological syndrome (Dmitrieva, Shostakovich, 2002). Among those, the researchers emphasize twilight consciousness, bipolar disorder, alcohol addiction, hallucinatory, delusional or affective forms of

psychopathy, and schizophrenia (Dmitrieva, Shostakovich, 2002; Blanco et al., 2018; Waleewong et al., 2018). It is also noted that people suffering from schizophrenia have the highest risk of committing violence due to rapidly developing systematized delusions that overcome self-control mechanisms (Dmitrieva, Shostakovich, 2002; Blanco et al., 2018). It is commonly known that AB may also be preceded by short-circuiting depressive response or suicidal tendencies motivated by self-accusation and search for redemption (Dmitrieva, Shostakovich, 2002).

When it comes to healthy individuals, it is necessary to mention the traits making it possible to assume a predisposition towards AB. These primarily include anxiety and fear of social disapproval, hostility attribution bias, excessive irritation and emotional sensitivity (Baron, Richardson, 2001). In addition, AB may be caused by negative nature of child-parent relationships in the upbringing (King et al., 2018). Also of interest are the data implying evolutionary nature of differences in aggression levels in males and females, which encouraged researching the effects of hormonal state on AB (Baron, Richardson, 2001; Georgiev et al., 2013).

Despite significant advancements in AB research, the wide variety of definitions, theories, and factors prevents the researchers from developing an integral approach to describing aggression development and its individual and sex- and age-dependent features. Although there is noteworthy evidence of linkage between psychopathological states, individual and social demographic factors and the risk of AB available, the cause-effect aspect remains to be further studied.

Methods and approaches to studying aggressive behavior

Psychological assessment of aggressive behavior

Nowadays, there are designated sets of methods available to identify the nature of aggressive manifestations in humans, which prioritize experimental approach making it possible to indirectly judge on aggression levels based on independent variables. A multitude of questionnaires dedicated to studying general aggressiveness, AB in particular, and specific aggression phenotypes, such as anger and hostility, have been developed for this purpose.

The most popular of them include: Buss–Durkee Hostility Inventory (BDHI), Buss–Perry Aggression Questionnaire (BPAQ), Spielberger Aggression Expression Scale, Assinger's Assessment of Aggressiveness in Relationships, a method of personal aggression and conflict by E.P. Ilin and P.A. Kovalev, etc. Projective techniques that are also used to study aggression, include thematic apperception test (TAT) and Rorschach Inkblot Test (Gurskaya, 2008).

Neurophysiological research of aggressive behavior

Interaction between the designated structures in human brain responsible for providing an adequate response of the body to changes in external and internal environment plays a major part in AB determination within the

neurophysiological approach. Here, the methods, such as positron emission tomography (PET), functional magnetic resonance imaging (fMRI), electroencephalography (EEG), invoked potential technique (IP), etc., are used.

The results obtained show that individuals with high AB levels tend to have reduced amygdaloid complex (Pardini et al., 2014) and grey matter volumes in orbitofrontal cortex (Gansler et al., 2009), deviations in EEG pattern and coherence (Ragozinskaya, 2015), as well as reduced P300 VP component amplitudes, which is also peculiar for schizophrenia patients (Gusev et al., 2009).

Investigation of hereditary factors in aggressive behavior regulation

Numerous twin studies have been performed to date that prove the role of heredity in AB development by comparing monozygotic twins raised under different conditions in their postembryonic period. It was found that heritability factor for aggressiveness is about 50 % (from 30 to 81 % for particular aggressiveness phenotypes, including antisocial behavior) (Viding et al., 2005; Tuvblad et al., 2011). This scatter in values may be explained by nonuniformity of the studied groups, as well as a wide range of environmental factors taken into account in specific studies. However, the twin method may only provide a general estimate of heritability without identifying specific markers associated with the development of the trait.

One of the earlier hypotheses to explain the hereditary nature of AB was the assumption that aggression level was affected by anomalous sex chromosome count. This hypothesis was considered by Meyer-Bahlburg, who noted that the presence of a redundant Y-chromosome led to increased aggression level (for example, 47XYY syndrome, as it is encountered more often in people in prison confinement), whereas a redundant X-chromosome (for example, 47XXX in females) resulted in reduced aggression level (Meyer-Bahlburg, 1981, quoted after: Baron, Richardson, 2001), however the support for this hypothesis was far from unequivocal. Furthermore, there are the data available that show increased aggression in males with 47XXY karyotype (Klinefelter syndrome) (Stochholm et al., 2012). In addition, the linkage between various chromosome anomalies and AB may be explained by low intelligence or high impulsiveness in the individuals considered, which supposedly resulted in criminal acts (Baron, Richardson, 2001).

In recent decades, molecular-genetic research becomes increasingly important in studying predisposition towards AB. Key studies are the ones focused on search for candidate genes based on their functional significance, which implies investigation of associations between traits and gene alleles involved in functioning of various systems, and genome-wide association studies (GWAS), under which hundreds of thousands of single nucleotide polymorphic (SNP) loci covering the genome are studied. However genetic nature of this trait remains understudied, despite the numerous research results available. There are a number of theories, in which the major part in AB development is attributed to cerebral neurotransmitter system disorders

associated with a large number of single nucleotide polymorphisms, insertions, and deletions in the structure of genes that encode the components of the neurotransmitter systems. However, precise identification of genes involved in AB regulation is complicated since each of them only slightly contributes (1–2 %) to the development of the trait (Kazantseva, Khusnutdinova, 2017).

Molecular-genetic markers of predisposition towards aggressive behavior

Neurotransmitter system genes

As of today, the genetic role of the serotonergic and dopaminergic systems in AB development in humans has been studied to a significant extent. It was found that increased serotonergic system activity results in lower aggression levels, whereas activation of the catecholaminergic system, in turn, stimulates aggression (Miczek et al., 2007). Thus, genes that encode proteins involved in serotonin and dopamine metabolism are candidate genes for aggressive behavior.

Tryptophan hydroxylase, which catalyzes tryptophan hydroxylation to 5'-hydroxytryptophan with further decarboxylation to serotonin on the first limiting stage, acts as a key serotonin biosynthesis enzyme. There are two typical isoforms for this enzyme, namely tph-1 and tph-2, encoded by the *TPH1* (11p15.1) and *TPH2* (12q21.1) genes respectively. One of the better studied polymorphic sites in the *TPH1* gene is single nucleotide polymorphism *218A > C* (*rs1800532*) in the 7th intron causing reduced gene expression level due to its localization in the GATA transcription factor linkage site. A series of studies show the link between highly active **A* allele and/or **A/*A* genotype with self-aggression (Beden et al., 2016), and **C/*C* genotype with high general and verbal aggression levels in people with depressive disorders (Koh et al., 2012). Polymorphism *–703G > T* (*rs4570625*) is a widely studied polymorphism in the *TPH2* gene, which determines reduction in the gene's transcription activity. The results of association studies of *–703G > T* locus alleles in terms of aggressiveness are rather contradictory, because both the data indicating the absence of **T* allele association with AB (Yoon et al., 2012) and showing the contrary are available (Laas et al., 2017). Many researchers believe that contradictions like this may be caused by differences in the studied samples associated with sample volumes, ethnogeographic and social and economic factors, as well as psychological states and sex of individuals (Kazantseva, Khusnutdinova, 2017).

Investigations of the polymorphisms of the *SLC6A4* (5-HTT or SERT; 17q11.2) serotonin transporter gene, which acts as the main serotonergic neurotransmission regulator in various regions of brain, made it possible to discover a variable 44 base pair-length segment in the gene promotor (5-HTTLPR) associated with presence (**L*) or absence (**S*) of the considered fragment. In addition, presence of another polymorphism, *rs25531* (*A > G*), is observed in the 5-HTTLPR **L* insertion form, which has stimulating effect

on the *SLC6A4* gene transcription activity, which allows some researchers to consider them as a single three-allele locus ($*L_A$, $*L_G$, $*S$) (Wendland et al., 2006).

In course of studying self-aggression and violent behavior genetics in male inmates it was found that the $*L_A/*L_A$, $*L_A/*L_G$, $*S/*L_A$ genotype carriers demonstrating high and intermediate *SLC6A4* gene activity are more prone to self-aggression compared to the low-activity $*L_G/*L_G$, $*S/*L_G$, $*S/*S$ genotype carriers (Gorodetsky et al., 2016). At the same time, a confident association between the $*S$ allele and/or $*S/*S$ genotype and AB, violent and self-aggressive tendencies were shown in a series of papers both in children (Cicchetti et al., 2012) and adults (Lopez-Castroman et al., 2014). It may be explained by cumulative negative effects peculiar for short alleles making the $*S$ -allele carriers more perceptive to negative environmental effects (van Ijzendoorn et al., 2012).

VNTR polymorphism of *STin2* (17 base pairs) in the 2nd intron is another *SLC6A4* gene polymorphism possibly associated with AB. It is noted that presence of 12 repeats (*STin2*12*), as opposed to 9 and 10, leads to increased gene transcription activity (MacKenzie, Quinn, 1999), which many researchers believe to be associated with increased aggressiveness in combination with the *5-HTTLPR*S* allele (Hemmings et al., 2018).

The *DRD4* (11p15.5) receptor gene in the dopaminergic system, along with the *SLC6A3* (or *DAT*; 5p15.33) dopamine transporter gene, is the most commonly studied candidate gene in terms of AB. The *DRD4* gene includes in its 3rd exon a variable region with 2 to 11 repeats with 48 base pair length, the highest linking ability of the receptor is observed for 4 repeats, whereas expression level decreases significantly for 7 repeats (VanNess et al., 2005). It was found in course of studying aggressive and antisocial behavior that the $*7R$ repeats were more often encountered in people convicted for violent crimes (Cherepkova et al., 2016), especially the ones, who experienced stress factors in their childhood (Schlomer et al., 2015). At the same time, it was shown for the Russian sample of inmates that the $*5R$ allele carriers also demonstrated high aggression levels similar to those of the $*7R$ allele carriers (Cherepkova et al., 2015), which agrees with the data on identical functional changes in the *DRD4* receptor with 5 or 7 repeats (Takeuchi et al., 2015).

Tandem repeat of *VNTR40* (from 3 to 11 times) is found in the *SLC6A3* gene, however, the presence of a link between the repeat count and gene expression activity remains unconfirmed. Numerous papers show associations between the $*10R$ allele (Cherepkova et al., 2016), as well as the $*9R$ allele (Qadeer et al., 2017), and antisocial behavior. Furthermore, the association between the $*9R$ allele and increased aggressiveness was earlier confirmed by the longitudinal twin study (Young et al., 2002).

Recent studies confirm the role of monoamine oxidase-A (*MAOA* gene; 11.3 chromosome), i. e. the enzyme that catalyzes oxidative deamination of serotonin, dopamine, and noradrenaline, in AB regulation. Several polymorphisms in

human gene *MAOA* have been identified to date, including *VNTR30*, for which six repeat patterns were described, the $*3R$ (or $*L$) allele being the least functional, as it ensures transcription 5 times as low compared to $*4R$ ($*H$). Most researchers report the $*L$ allele to be associated with impulsiveness and AB (Schlüter et al., 2016; Zhang et al., 2016) caused in particular by abusive treatment in childhood (Holz et al., 2016).

Catechol-O-methyl transferase (*COMT*; 22q11.21) is another enzyme involved in catecholamine degradation. Functional locus *Val158Met*, which reduces enzyme activity by 40 % is found in its gene's encoding part. The data are available that indicate the $*Met$ allele to be associated with increased aggression level in individuals aged under 18 (Albaugh et al., 2010), and there is a meta-study assuming that this polymorphism increases the risk of AB in males suffering from schizophrenia by approximately 50 % (Singh et al., 2012). In addition, a significant effect of the $*Met$ allele on aggressiveness in children raised under adverse conditions was shown by Hygen B.W. et al. (2015), however aggressiveness in the allele carriers from functional families was lower than in the $*Val$ allele carriers.

The role of GABA in AB development, as the main neurotransmitter involved in central nervous system (CNS) inhibition, was initially proven by models, because mice with low GABA levels and increased concentration of GABA-degrading enzyme ABAT demonstrated significantly higher aggressiveness (Jager et al., 2017). The effect on AB in humans was noted via the *GABRA2* (4p12) gene polymorphisms, which encoded the α_2 subunit of GABA_A-receptor, specifically increased aggression was observed in the *rs279826*A* and *rs279858*A* allele carriers (Kiive et al., 2017).

Hypothalamic-pituitary system genes

The hypothalamic-pituitary system is another critical link in psychic function regulation. Key role in this system is played by oxytocin responsible for birth- and lactation-related functions and vasopressin with antidiuretic and vasopressor effects, which in addition to the classical variety of effects have non-classical ones. For example, it was found that balance between oxytocin and vasopressin concentrations determines various social and emotional reactions, whereas its derangement was described under depression, anxiety, and autism (Tyuzikov et al., 2015).

The effect of oxytocin (*OXT* gene; 20p13) depends primarily on its interaction with the *OXTR* receptor (3p25.3). It was found that decreased *OXT* gene expression, low oxytocin concentration cerebrospinal fluid, as well as the high linking ability of *OXTR* receptor cause increased aggressiveness in both rodents and humans (Lee et al., 2009; Calcagnoli et al., 2014), however the data on links between polymorphic loci in *OXT* and *OXTR* genes and AB were not that decisive. One of the studies dedicated to aggressive tendencies showed the *OXT-rs6133010*A/*A* $\times$ *OXTR-rs2254298*G/*G* $\times$ *OXTR-rs53576*A/*G* genotypes to be associated with a high level of physical aggression (Yang et al., 2017), however another paper, while not confirming

this association, admitted the role of *rs1042778*T/T* genotype in development of antisocial behavior in males (Waller et al., 2016).

In addition, some authors analyzed *OXTR* gene polymorphisms in children with AB. Hovey D. et al. (2016) showed the *rs4564970*C/C*, *rs53576*G/A*, and *rs7632287*A/A* genotypes to be associated with AB in boys, whereas the *rs2254298*G/G* genotype was associated with aggression in girls. Another paper showed the *rs237898*A* and *rs237902*C* allele frequencies to be higher in the group of boys with AB, and *rs6770632*T* – in the group of girls (Malik et al., 2014).

Numerous data indicate that increased *AVPR1A* (12q14.2) vasopressin receptor gene expression in hypothalamic paraventricular nuclei often accompanies anxiety and AB in rodents (Gutzler et al., 2010). Apart from that, additional evidence of the role of *AVPR1A* in aggression regulation was obtained by studying candidate genes (Pappa et al., 2015), as well as in one of the recent meta-analyses (van Donkelaar et al., 2018). Functional model-based studies also indicate an important role of the *AVPR1B* gene in AB development. In particular, mice with *AVPR1B* (1q32) gene knockout showed a significant decrease in aggressiveness in the experiments (Wersinger et al., 2002), while association studies in human populations showed the polymorphic loci of *rs35369693* and *rs28676508* to be involved in aggression regulation in children (Zai et al., 2012).

Genes of neurotrophic factor system

In addition to classical ways of neurotransmission, genetic research of the enzymes and receptors involved in regulation of neurotoxic and neuroprotective responses to stress seem to be of interest. Neurotrophic factors (neurotrophins) are a large group of polypeptides, which play a critical role in developing and maintaining CNS structures (Popova et al., 2017), the BDNF factor encoded by homonymous *BDNF* (11p14.1) gene being the most wide-spread in the human brain.

The analysis of *BDNF* gene structure in human revealed functional locus *Val66Met* (*196G > A*; *rs6265*), which causes reduced neurotrophin protein secretion (Hong et al., 2011). It is shown in several papers that the **Met/*Met* genotype carriers are characterized with high aggression level (Kretschmer et al., 2014), whereas other researchers were not able to discover this link (Guan et al., 2014; Nagata et al., 2014). It was also noted that modulating effect of the **Met/*Met* genotype was largely defined by interaction with such environmental factors as chronic stress, negative parental upbringing, abusive treatment or sexual violence in childhood, which in turn facilitate development of aggressive phenotype (Wagner et al., 2010; Kretschmer et al., 2014; Avinun et al., 2018).

Role of sex hormone genes and their receptors

It has been mentioned earlier that persuasive evidence exists in favor of evolutionary gender specifics of aggression, which may be validated by global criminal statistics, according to which the vast majority of antisocial acts are

committed by males (Baron, Richardson, 2001; Georgiev et al., 2013). Thus, studying sex hormone effects on mental health in humans becomes increasingly popular in psychoendocrinology.

Estrogens are a general group of female sex hormones, whose cerebral activity is determined by their interaction with the ER α and ER β estrogen receptors encoded by the *ESR1* (6q25.1) and *ESR2* (14q23.3) genes respectively. Human gene *ESR1* includes the [TA]_n repeat as one of its functional loci, which is imbalanced with –397T > C (*rs2234693* or *PvuII*, for which alternative *P and *p allele designations may be encountered) and –351A > G (*rs9340799*; *XbaI* – *X and *x alleles) loci. Rare studies indicate the link between the [TA]_n repeat count and physical aggressiveness in males (Vaillancourt et al., 2012), as well as the *rs2234693*P* and *rs9340799*X* alleles and anger in girls (Vermeersch et al., 2013).

Androgens are male sex hormones potentially involved in CNS activity regulation as well. It was found that lengthy polyglutamine segments ([CAG]_n) in the *AR* (Xq12) androgen receptor gene reduce its functional activity. In addition, a significant negative link is observed between repeat count and aggressiveness in males (Butovskaya et al., 2015), which was further confirmed by studies in the individuals convicted for violent crimes and rape. For example, average [CAG]_n-repeat counts in murderers and rapists were 17.59 and 18.44 respectively, whereas in a control group it didn't exceed 21.19 (Rajender et al., 2008).

Neuronal apoptosis genes

Investigation of neurogenesis as a key phenomenon behind maintaining cell homeostasis in the nervous system becomes increasingly topical due to the rise of mental disorders in the society. It has been established by now that neuronal apoptosis disorders are revealed under ageing and various forms of neuropathology accompanied by changes in the psychological state of individuals. In addition, rare model-based studies are available indicating that neural apoptosis processes are linked to AB, which may be used as a basis for further molecular-genetic research in humans (Bragin et al., 2017).

For example, highly aggressive rats demonstrate increased *CASP3* caspase gene expression in hypothalamus and mRNA expression of antiapoptotic *BCL-XL* gene in suture nuclei, as well as decreased proapoptotic *BAX* gene expression in hippocampus (Ilchibaeva et al., 2016). It was noted in another study that rats with AB had increased expression of hypoxia-inducible factor-3 genes *EGLN3*, proteoglycan chondroitin sulfate *ACAN*, tyrosine hydroxylase *TH*, and *NTS* neuropeptide, as well as decreased expression of *MEF2C* and *SOX2* transcription factors, *ERBB3* tyrosine kinase receptor, *EZR* actin-linking cytoskeletal protein, *VIP* vasoactive intestinal peptide in ventral tegmental midbrain, whereas increased expression of *KIRREL3* protein genes and *NOS1* nitric oxide synthase was observed in periaqueductal gray (Bragin et al., 2017). Meanwhile, *NOS1* involvement

in AB development in humans has been proven earlier (Rujescu et al., 2008).

Genome-wide association study (GWAS)

Genome-wide association study analyzing thousands of SNPs simultaneously appears to be among the most promising methods for studying complex behavioral traits at the present stage of psychogenetic development. However, only a small number of GWAS have been performed to study AB in humans.

In 2015, a team of scientists within the EAGLE consortium performed GWAS analysis of AB associations in 18 988 children from two age groups, i. e. preschool age of 3–7 years and primary school/teenage of 8–15 years. The analysis performed revealed the most significant association both in general sample ($p = 5.30 \cdot 10^{-8}$) and preschool age ($p = 1.27 \cdot 10^{-5}$) and primary school/teenage ($p = 6.32 \cdot 10^{-7}$) samples being with the *rs11126630* polymorphic locus, which, according to the authors, is located in the intergenic region space of *LRRTM4* and *SNAR-H* (Pappa et al., 2015). The data are available indicating that the 2p12 chromosome region, where the *LRRTM4* and *SNAR-H* genes are localized, is associated with self-aggression risk (Willour et al., 2007). It was also confirmed by GWAS analysis of suicidal behavior, in which the *LRRTM4* gene was associated with risk of suicidal tendencies in females (*rs10170138*, $p = 9.27 \cdot 10^{-7}$) (Willour et al., 2012), which makes it possible to assume that it is involved in mechanisms of outgoing aggression.

The product of *LRRTM4* gene belongs to the family of cell adhesion molecules. It is expressed in the dentate gyrus in the hippocampus and is involved in regulation of excitatory synapse development via its interaction with presynaptic heparan sulfate proteoglycans (HSPG) (Siddiqui et al., 2013). In addition to the *rs11126630* polymorphic locus, polymorphisms *rs10169036*, *rs1176317*, *rs12613157*, *rs1542677*, and *rs1542678* are discovered in the vicinity of this gene, differences by which reached significant levels both in general sample ($p < 1.02 \cdot 10^{-6}$), and samples of preschool-aged and primary school/teenage children ($p < 2.90 \cdot 10^{-6}$) (Pappa et al., 2015). In turn, *SNAR-H* is a gene that belongs to the family of small RNA associated with the NF90 nuclear factor involved in transcription regulation and expressed in neurons (Parrott, Mathews, 2007). However, its role in behavior regulation is not fully studied and requires further research.

It is well-known that individuals with attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) often demonstrate hostility and aggression traits, in addition to inattentiveness and increased impulsiveness, which is why these traits are often analyzed together. When AB was investigated in 1060 adults with ADHD, the strongest association was observed with *rs10826548* locus (lncRNA transcript; $p = 1.07 \cdot 10^{-6}$), as well as with *rs35974940* in *NTM* neurotrimin gene ($p = 1.26 \cdot 10^{-6}$) involved in cell adhesion and neurite growth in neurons (Brevik et al., 2016).

In addition, several GWAS studies were performed for individual AB phenotypes. The sample of 8747 people

aged 45–64 in one of these studies showed the *rs2148710* polymorphic locus ($p = 2.9 \cdot 10^{-8}$) to be associated with anger manifestations, according to Spielberger's STAXI scale. It was found that this locus was located in the 6q21 chromosome region in the *FYN* gene that encodes non-receptor tyrosine kinase, whose activity may be related to mood dysregulation. Since postsynaptic linkage of brain-derived neurotrophic factor BDNF with tyrosine kinase receptor B activates non-receptor tyrosine kinase responsible for phosphorylation of NMDA receptors and inositol-1,4,5-triphosphate-linked channels, these signaling pathways, through which intracellular calcium homeostasis is regulated (which is particularly important for CNS functioning and neuron survival), may be involved in formation of emotional traits in humans, including anger traits (Mick et al., 2014).

When genetic foundations of antisocial behavior were studied using genome-wide analysis in 543 Finnish criminals and 9616 individuals from general population, the strongest signals were discovered in the 6p21.2 chromosome region for *rs4714329* ($p = 1.6 \cdot 10^{-9}$) and *rs9471290* ($p = 2.9 \cdot 10^{-7}$) in the vicinity of the *LINC00951* and *LRFN2* genes, whose expression was primarily observed in the cerebellum (Rautiainen et al., 2016). Apart from that, functioning disorders in the *LRFN2* gene product involved in cellular adhesion and plasticity, as well as in excitatory synapse development, are traditionally attributed to a series of cognitive disorders (Bereczki et al., 2018).

It is worth noting that the GWAS analysis performed by Rautiainen M.R. et al. is not the only study of violent and antisocial behavior. For example, Tiihonen J. et al. used the same sample to establish a significant association with *rs11649622* polymorphism ($p = 4.19 \cdot 10^{-6}$) located on the long chromosome arm 16 (q23.3) in the intron region of cadherin gene (*CDH13*) involved in cell adhesion, while additional analysis of gene polymorphisms made it possible to reveal the association of **A/*A* (*rs11649622*, *rs7190768*; $p = 6.2 \cdot 10^{-7}$) and **G/*G/*A/*A* (*rs12919501*, *rs4075942*, *rs11649622* and *rs7190768*; $p = 7.0 \cdot 10^{-6}$) haplotypes with extremely violent behavior in criminals (Tiihonen et al., 2015).

The study by Tielbeek J.J. et al. (2017), in which the results are presented with gender taken into account, may be considered as another example. Here, the associations with the *rs2764450* locus ($p = 4.8 \cdot 10^{-8}$) on chromosome 1 and with *rs11215217* ($p = 2.1 \cdot 10^{-8}$) on chromosome 11 are found in females. Association analysis in males with antisocial behavior showed the strongest signal for *rs41456347* ($p = 2.0 \cdot 10^{-8}$) on chromosome X (Tielbeek et al., 2017). Earlier, the same author noted the association of antisocial behavior with the *rs12106331*, *rs2835702*, and *rs2835771* loci ($p = 8.7 \cdot 10^{-5}$) in the *DYRK1A* (21q22.13) gene that encodes the enzyme critical for the cell proliferation signaling pathway and linked to synaptic plasticity. In addition, *DYRK1A* is a candidate gene for studying risks of mental retardation development, since it is localized in the chromosome region critical for Down syndrome development (Tielbeek et al., 2012).

Conclusions

Thus, aggressive behavior is a complex multifactor trait, and its development is affected by both environmental and genetic factors. Most research on studying genetic foundations of AB are limited to candidate gene approach and analysis of linkage between the gene loci primarily involved in the neurotransmitter system. In addition, the results are available for a number of association studies of a series of genes that encode key neuropeptides and hormones and are also involved in synaptic plasticity and neuronal apoptosis, which indicates that development of genetic predisposition towards AB is a rather complex process, which includes disruptions in the whole cascade of reactions and in functioning of genes, which individually only slightly contribute (1–2 % of the total variability) to the development of pathological aggressiveness. It is worth noting that the effect of gene-environment interactions, ethnogeographic, social, and cultural factors, as well as sex-dependent peculiarities on the degree of manifestation of the aggressive phenotype is not discarded as well. Thus, taking these characteristics into account in future research may possibly solve the existing contradictions and lead to a deeper understanding of the nature of AB.

Although quite a lot of genetic studies of AB both in normal health and under pathology have been performed in recent decades, the number of genome-wide studies remains small. The GWAS results generalized in this survey are rather contradictory and barely replicated in papers by other authors, however, they agree that cell adhesion, synaptic plasticity, and neurogenesis are key processes in development of aggressive phenotype, while changes in these processes were conventionally considered in the context of main causes of cognitive and neurodegenerative disorders. Hence, the genes involved in these processes may be considered as potential genetic markers for further research of foundations of AB, since they have not been studied using the candidate gene approach before.

Presumably, integrated studies of epigenetic factors, such as methylation and acetylation of DNA and histones, as well as microRNA, involved regulation of target gene expression, may contribute significantly to understanding development mechanisms of AB. In addition, constructing and analyzing gene networks to describe interactions between molecular-genetic markers associated with aggressiveness, which would make it possible to identify new candidate genes for further experimental research of mechanisms of AB appears to be a topical problem.

Acknowledgements

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research under ofi-m project “Genomics of Aggressive and Depressive Behavior in Humans”, no. 17-29-02195.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Albaugh M.D., Harder V.S., Althoff R.R., Rettew D.C., Ehli E.A., Lengyel-Nelson T., Davies G.E., Ayer L., Sulman J., Stanger C., Hudziak J.J. COMT Val158Met genotype as a risk factor for problem behaviors in youth. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* 2010;49(8):841-849. DOI 10.1016/j.jaac.2010.05.015.
- Avinun R., Davidov M., Mankuta D., Knafo-Noam A. Predicting the use of corporal punishment: Child aggression, parent religiosity, and the BDNF gene. *Aggress. Behav.* 2018;44(2):165-175. DOI 10.1002/ab.21740.
- Baron R., Richardson D. (Eds.) *Human Aggression*. New York: Plenum Publ., 1994. Russ. ed.: Baron R., Richardson D. *Aggression*. St. Petersburg: Piter Publ., 2001. (in Russian)
- Beden O., Senol E., Atay S., Ak H., Altintoprak A.E., Kiyan G.S., Petin B., Yaman U., Aydin H.H. TPH1 A218 allele is associated with suicidal behavior in Turkish population. *Leg. Med. (Tokyo).* 2016;21:15-18. DOI 10.1016/j.legalmed.2016.05.005.
- Bereczki E., Branca R.M., Francis P.T., Pereira J.B., Baek J.H., Hortobágyi T., Winblad B., Ballard C., Lehtio J., Aarsland D. Synaptic markers of cognitive decline in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Brain.* 2018;141(2):582-595. DOI 10.1093/brain/awx352.
- Blanco E.A., Duque L.M., Rachamalla V., Yuen E., Kane J.M., Gallego J.A. Predictors of aggression in 3,322 patients with affective disorders and schizophrenia spectrum disorders evaluated in an emergency department setting. *Schizophr. Res.* 2018;195:136-141. DOI 10.1016/j.schres.2017.10.002.
- Bragin A.O., Saik O.V., Chadaeva I.V., Demenkov P.S., Markel A.L., Orlov Yu.L., Rogayev E.I., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Role of apoptosis genes in aggression revealed using combined analysis of ANDSystem gene networks, expression and genomic data in grey rats with aggressive behavior. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017; 21(8):911-919. DOI 10.18699/VJ17.312. (in Russian)
- Brevik E.J., van Donkelaar M.M., Weber H., Sánchez-Mora C., Jacob C., Rivero O., Kittel-Schneider S., Garcia-Martínez I., Aebi M., van Hulzen K., Cormand B., Ramos-Quiroga J.A., Lesch K.P., Reif A., Ribasés M., Franke B., Posserud M.B., Johansson S., Lundervold A.J., Haavik J., Zayats T. Genome-wide analyses of aggressiveness in attention-deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2016;171(5):733-747. DOI 10.1002/ajmg.b.32434.
- Butovskaya M.L., Lazebny O.E., Vasilyev V.A., Dronova D.A., Karelin D.V., Mabulla A.Z., Shibalev D.V., Shackelford T.K., Fink B., Ryskov A.P. Androgen receptor gene polymorphism, aggression, and reproduction in tanzanian foragers and pastoralists. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136208. DOI 10.1371/journal.pone.0136208.
- Calcagnoli F., de Boer S.F., Beiderbeck D.I., Althaus M., Koolhaas J.M., Neumann I.D. Local oxytocin expression and oxytocin receptor binding in the male rat brain is associated with aggressiveness. *Behav. Brain Res.* 2014;261:315-322. DOI 10.1016/j.bbr.2013.12.050.
- Cherepkova E.V., Aftanas L.I., Maksimov N., Menshanov P. Frequency of 3' VNTR polymorphism in the dopamine transporter gene *SLC6A3* in humans predisposed to antisocial behavior. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016;162(1):82-85. DOI 10.1007/s10517-016-3551-7.
- Cherepkova E.V., Maksimov V.N., Aftanas L.I., Menshanov P.N. Genotype and haplotype frequencies of the *DRD4* VNTR polymorphism in the men with no history of ADHD, convicted of violent crimes. *J. Crim. Justice.* 2015;43(6):464-469. DOI 10.1016/j.jcrimjus.2015.10.002.
- Cicchetti D., Rogosch F.A., Thibodeau E. The effects of child maltreatment on early signs of antisocial behavior: genetic moderation by tryptophan hydroxylase, serotonin transporter, and monoamine oxidase-a-genes. *Dev. Psychopathol.* 2012;24(3):907-928. DOI 10.1017/S0954579412000442.
- Dmitrieva T.B., Shostakovich B.V. *Aggression and Mental Health*. St. Petersburg: Yuridichesky Center Publ., 2002. (in Russian)
- Gansler D.A., McLaughlin N.C., Iguchi L., Jerram M., Moore D.W., Bhadelia R., Fulwiler C. A multivariate approach to aggression and

- the orbital frontal cortex in psychiatric patients. *Psychiatry Res.* 2009;171(3):145-154. DOI 10.1016/j.psychres.2008.03.007.
- Georgiev A.V., Klimczuk A.C.E., Traficante D.M., Maestripieri D. When violence pays: a cost-benefit analysis of aggressive behavior in animals and humans. *Evol. Psychol.* 2013;11(3):678-699.
- Gorodetsky E., Carli V., Sarchiapone M., Roy A., Goldman D., Enoch M.A. Predictors for self-directed aggression in Italian prisoners include externalizing behaviors, childhood trauma and the serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR. *Genes Brain Behav.* 2016;15(5):465-473. DOI 10.1111/gbb.12293.
- Guan X., Dong Z.Q., Tian Y.Y., Wu L.N., Gu Y., Hu Z.Q., Zhang X. Lack of association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and aggressive behavior in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2014;215(1):244-245. DOI 10.1016/j.psychres.2013.10.017.
- Gurskaya I.Y. Methodological problems in the research of aggressive behavior. *Uchenye Zapiski Pedagogicheskogo Instituta Saratovskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Ser. Psichologiya. Pedagogica = Scientific Reports of the Chernyshevskiy Pedagogical Institute, Saratov State University, Ser: Psychology. Pedagogics.* 2008;1(3-4):13-17. (in Russian)
- Gusev E.I., Konvalova A.N., Skvortsova V.I., Geht A.B. *Neurology: The National Guide.* Moscow: GJeOTAR-Media Publ., 2009. (in Russian)
- Gutzler S.J., Karom M., Erwin W.D., Albers H.E. Arginine-vasopressin and the regulation of aggression in female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Eur. J. Neurosci.* 2010;31(9):1655-1663. DOI 10.1111/j.1460-9568.2010.07190.x.
- Hemmings S.M.J., Xulu K., Sommer J., Hinsberger M., Malan-Muller S., Tromp G., Elbert T., Weierstall R., Seedat S. Appetitive and reactive aggression are differentially associated with the STin2 genetic variant in the serotonin transporter gene. *Sci. Rep.* 2018;8: 6714. DOI 10.1038/s41598-018-25066-8.
- Holz N., Boecker R., Buchmann A.F., Blomeyer D., Baumeister S., Hohmann S., Jennen-Steinmetz C., Wolf I., Rietschel M., Witt S.H., Plichta M.M., Meyer-Lindenberg A., Schmidt M.H., Esser G., Banaschewski T., Brandeis D., Laucht M. Evidence for a sex-dependent *MAOA* × Childhood stress interaction in the neural circuitry of aggression. *Cereb. Cortex.* 2016;26(3):904-914. DOI 10.1093/cercor/bhu249.
- Hong C.J., Liou Y.J., Tsai S.J. Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain Res. Bull.* 2011;86(5-6):287-297. DOI 10.1016/j.brainresbull.2011.08.019.
- Hovey D., Lindstedt M., Zettergren A., Jonsson L., Johansson A., Melke J., Kerekes N., Anckarsäter H., Lichtenstein P., Lundström S., Westberg L. Antisocial behavior and polymorphisms in the oxytocin receptor gene: findings in two independent samples. *Mol. Psychiatry.* 2016;21(7):983-988. DOI 10.1038/mp.2015.144.
- Hygen B.W., Belsky J., Stenseng F., Lydersen S., Guzey I.C., Wichstrøm L. Child exposure to serious life events, COMT, and aggression: Testing differential susceptibility theory. *Dev. Psychol.* 2015; 51(8):1098-1104. DOI 10.1037/dev0000020.
- Ilchibaeva T.V., Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Naumenko V.S. Expression of apoptosis genes in the brain of rats with genetically defined fear-induced aggression. *Molecular Biology (Moscow).* 2016;50(5):719-724. DOI 10.1134/S0026893316030079.
- Jager A., Amiri H., Bielczyk N., van Heukelum S., Heerschap A., Aschrafi A., Poelmans G., Buitelaar J.K., Kozicz T., Glennon J.C. Cortical control of aggression: GABA signalling in the anterior cingulate cortex. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2017. DOI 10.1016/j.euroneuro.2017.12.007.
- Kazantseva A.V., Khusnutdinova E.K. *Genes vs Environment, or What Controls Our Behavior.* Ufa: Bashkirian State University, 2017. (in Russian)
- Kiive E., Laas K., Vaht M., Veidebaum T., Harro J. Stressful life events increase aggression and alcohol use in young carriers of the *GABRA2* rs279826/rs279858 A-allele. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2017;27(8):816-827. DOI 10.1016/j.euroneuro.2017.02.003.
- King A.R., Ratzak A., Ballantyne S., Knutson S., Russell T.D., Poggals C.R., Breen C.M. Differentiating corporal punishment from physical abuse in the prediction of lifetime aggression. *Agress. Behav.* 2018;44(3):306-315. DOI 10.1002/ab.21753.
- Koh K.B., Kim C.H., Choi E.H., Lee Y.J., Seo W.Y. Effect of tryptophan hydroxylase gene polymorphism on aggression in major depressive disorder and undifferentiated somatoform disorder. *J. Clin. Psychiatry.* 2012;73(5):e574-e579. DOI 10.4088/JCP.11m07342.
- Kretschmer T., Vitaro F., Barker E.D. The association between peer and own aggression is moderated by the BDNF Val-Met polymorphism. *J. Res. Adolesc.* 2014;24(1):177-185. DOI 10.1111/jora.12050.
- Laas K., Kiive E., Mäestu J., Vaht M., Veidebaum T., Harro J. Nice guys: Homozygosity for the TPH2 -703G/T (rs4570625) minor allele promotes low aggressiveness and low anxiety. *J. Affect Disord.* 2017;215:230-236. DOI 10.1016/j.jad.2017.03.045.
- Lee R., Ferris C., Van de Kar L.D., Coccaro E.F. Cerebrospinal fluid oxytocin, life history of aggression, and personality disorder. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34(10):1567-1573. DOI 10.1016/j.psyneuen.2009.06.002.
- Lopez-Castroman J., Jausent I., Beziat S., Guillaume S., Baca-Garcia E., Genty C., Olié E., Courtet P. Increased severity of suicidal behavior in impulsive aggressive patients exposed to familial adversities. *Psychol. Med.* 2014;44(14):3059-3068. DOI 10.1017/S0033297114000646.
- MacKenzie A., Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96(26):15251-15255.
- Malik A.I., Zai C.C., Berall L., Abu Z., Din F., Nowrouzi B., Chen S., Beitchman J.H. The role of genetic variants in genes regulating the oxytocin-vasopressin neurohumoral system in childhood-onset aggression. *Psychiatr. Genet.* 2014;24(5):201-210. DOI 10.1097/YPG.0000000000000044.
- Meyer-Bahlburg H.F.L. Sex chromosomes and aggression in humans. In: Brain P.P., Benton D. (Eds.) *The Biology of Aggression.* Rockville: MD, 1981;109-123.
- Mick E., McGough J., Deutsch C.K., Frazier J.A., Kennedy D., Goldberg R.J. Genome-Wide Association Study of proneness to anger. *PLoS One.* 2014;9(1):e87257. DOI 10.1371/journal.pone.0087257.
- Miczek K.A., de Almeida R.M., Kravitz E.A., Rissman E.F., de Boer S.F., Raine A. Neurobiology of escalated aggression and violence. *J. Neurosci.* 2007;27(44):11803-11806. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3500-07.2007.
- Nagata T., Kobayashi N., Shinagawa S., Yamada H., Kondo K., Nakayama K. Plasma BDNF levels are correlated with aggressiveness in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *J. Neural. Transm. (Vienna).* 2014;121(4):433-441. DOI 10.1007/s00702-013-1121-y.
- Pappa I., St Pourcain B., Benke K., Cavadino A., Hakulinen C., Nivard M.G., Nolte I.M., Tiesler C.M., Bakermans-Kranenburg M.J., Davies G.E., Evans D.M., Geoffroy M.C., Grallert H., Groen-Blokhuis M.M., Hudziak J.J., Kemp J.P., Keltikangas-Järvinen L., McMahon G., Mileva-Seitz V.R., Motazed E., Power C., Raitakari O.T., Ring S.M., Rivadeneira F., Rodriguez A., Scheet P.A., Seppälä I., Snieder H., Standl M., Thiering E., Timpson N.J., Veenstra R., Velders F.P., Whitehouse A.J., Smith G.D., Heinrich J., Hypönen E., Lehtimäki T., Middeldorp C.M., Oldehinkel A.J., Pennell C.E., Boomsma D.I., Tiemeier H. A genome-wide approach to children's aggressive behavior: *The EAGLE consortium.* *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2015;171(5):562-572. DOI 10.1002/ajmg.b.32333.
- Pardini D.A., Raine A., Erickson K., Loeber R. Lower amygdala volume in men is associated with childhood aggression, early psychopathic traits, and future violence. *Biol. Psychiatry.* 2014;75(1):73-80. DOI 10.1016/j.biopsych.2013.04.003.
- Parrott A.M., Mathews M.B. Novel rapidly evolving hominid RNAs bind nuclear factor 90 and display tissue-restricted distribution. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(18):6249-6258. DOI 10.1093/nar/gkm668.
- Popova N.K., Ilchibaeva T.V., Naumenko V.S. Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain.

- Biochemistry (Moscow). 2017;82(3):308-317. DOI 10.1134/S0006297917030099.
- Qadeer M.I., Amar A., Mann J.J., Hasnain S. Polymorphisms in dopaminergic system genes; association with criminal behavior and self-reported aggression in violent prison inmates from Pakistan. *PLoS One*. 2017;12(6):e0173571. DOI 10.1371/journal.pone.0173571.
- Ragozinskaya V.G. Features of EEG spectral power in autoaggression. *Izvestiya Vysshih Uchebnykh Zavedenij. Ural'skij Region = Proceedings of Higher Educational Institutions. Ural Region*. 2015; 2:97-104. (in Russian)
- Rajender S., Pandu G., Sharma J.D., Gandhi K.P., Singh L., Thangaraj K. Reduced CAG repeats length in androgen receptor gene is associated with violent criminal behavior. *Int. J. Legal Med*. 2008; 122(5):367-372. DOI 10.1007/s00414-008-0225-7.
- Rautiainen M.R., Paunio T., Repo-Tiihonen E., Virkkunen M., Ollila H.M., Sulkava S., Jolanki O., Palotie A., Tiihonen J. Genome-wide association study of antisocial personality disorder. *Transl. Psychiatry*. 2016;6(9):e883. DOI 10.1038/tp.2016.155.
- Rosstat: Russian Federal State Statistics Service. 2017. Available at: http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/population/ (in Russian)
- Rujescu D., Giegling I., Mandelli L., Schneider B., Hartmann A.M., Schnabel A., Maurer K., Möller H.J., Serretti A. NOS-I and -III gene variants are differentially associated with facets of suicidal behavior and aggression-related traits. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 2008;147B(1):42-48. DOI 10.1002/ajmg.b.30569.
- Schlomer G.L., Cleveland H.H., Vandenbergh D.J., Feinberg M.E., Neiderhiser J.M., Greenberg M.T., Spoth R., Redmond C. Developmental differences in early adolescent aggression: a gene $\times$ environment $\times$ intervention analysis. *J. Youth Adolesc*. 2015;44(3):581-597. DOI 10.1007/s10964-014-0198-4.
- Schlüter T., Winz O., Henkel K., Eggermann T., Mohammadkhani-Shali S., Dietrich C., Heinzl A., Decker M., Cumming P., Zerres K., Piel M., Mottaghy F.M., Vernaleken I. MAOA-VNTR polymorphism modulates context-dependent dopamine release and aggressive behavior in males. *Neuroimage*. 2016;125:378-385. DOI 10.1016/j.neuroimage.2015.10.031.
- Siddiqui T.J., Tari P.K., Connor S.A., Zhang P., Dobie F.A., She K., Kawabe H., Wang Y.T., Brose N., Craig A.M. An LRRTM4-HSPG complex mediates excitatory synapse development on dentate gyrus granule cells. *Neuron*. 2013;79(4):680-695. DOI 10.1016/j.neuron.2013.06.029.
- Singh J.P., Volavka J., Czobor P., Van Dorn R.A. A meta-analysis of the Val158Met COMT polymorphism and violent behavior in schizophrenia. *PLoS One*. 2012;7(8):e43423. DOI 10.1371/journal.pone.0043423.
- Stochholm K., Bojesen A., Jensen A.J., Juul S., Gravholt C.H. Criminality in men with Klinefelter's syndrome and XYY syndrome: a cohort study. *BMJ Open*. 2012;2:e000650. DOI 10.1136/bmjopen-2011-000650.
- Takeuchi H., Tomita H., Taki Y., Kikuchi Y., Ono C., Yu Z., Sekiguchi A., Nouchi R., Kotozaki Y., Nakagawa S., Miyauchi C.M., Iizuka K., Yokoyama R., Shinada T., Yamamoto Y., Hanawa S., Araki T., Hashizume H., Kunitoki K., Sassa Y., Kawashima R. Cognitive and neural correlates of the 5-repeat allele of the dopamine D4 receptor gene in a population lacking the 7-repeat allele. *Neuroimage*. 2015; 110:124-35. DOI 10.1016/j.neuroimage.2015.01.053.
- Tielbeek J.J., Johansson A., Polderman T.J.C., Rautiainen M.R., Jansen P., Taylor M., Tong X., Lu Q., Burt A.S., Tiemeier H., Viding E., Plomin R., Martin N.G., Heath A.C., Madden P.A.F., Montgomery G., Beaver K.M., Waldman I., Gelernter J., Kranzler H.R., Farrer L.A., Perry J.R.B., Munafò M., LoParo D., Paunio T., Tiihonen J., Mous S.E., Pappa I., de Leeuw C., Watanabe K., Hammerslag A.R., Salvatore J.E., Aliev F., Bigdeli T.B., Dick D., Faraone S.V., Popma A., Medland S.E., Posthuma D. Genome-Wide Association Studies of a broad spectrum of antisocial behavior. *JAMA Psychiatry*. 2017;74(12):1242-1250. DOI 10.1001/jamapsychiatry.2017.3069.
- Tielbeek J.J., Medland S.E., Benyamin B., Byrne E.M., Heath A.C., Madden P.A., Martin N.G., Wray N.R., Verweij K.J. Unraveling the genetic etiology of adult antisocial behavior: a genome-wide association study. *PLoS One*. 2012;7(10):e45086. DOI 10.1371/journal.pone.0045086.
- Tiihonen J., Rautiainen M.R., Ollila H.M., Repo-Tiihonen E., Virkkunen M., Palotie A., Pietiläinen O., Kristiansson K., Joukamaa M., Lauerma H., Saarela J., Tyni S., Vartiainen H., Paananen J., Goldman D., Paunio T. Genetic background of extreme violent behavior. *Mol. Psychiatry*. 2015;20(6):786-792. DOI 10.1038/mp.2014.130.
- Tkachenko O.N. Genetic correlations of a person's aggression: literature review. *Sotsialno-Ekologicheskie Tekhnologii = Environment and Human: Environmental Studies*. 2016;3:68-86. (in Russian)
- Tuvblad C., Narusyte J., Grann M., Sarnecki J., Lichtenstein P. The genetic and environmental etiology of antisocial behavior from childhood to emerging adulthood. *Behav. Genet*. 2011;41(5):629-640. DOI 10.1007/s10519-011-9463-4.
- Tyuzikov I.A., Kalinchenko S.Yu., Vorslov L.O., Tishova Yu.A. Vasopressin: nonclassical effects and the role in the development of age-related diseases. *Effektivnaya Farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*. 2015;26:38-50. (in Russian)
- United Nations Office on Drugs and Crime "UNODC": Reports on world crime trends. 2017. Available at: <https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/statistics/crime/reports-on-world-crime-trends.html>
- Vaillancourt K.L., Dinsdale N.L., Hurd P.L. Estrogen receptor 1 promoter polymorphism and digit ratio in men. *Am. J. Hum. Biol*. 2012; 24(5):682-689. DOI 10.1002/ajhb.22297.
- Van Donkelaar M.M.J., Hoogman M., Pappa I., Tiemeier H., Buitelaar J.K., Franke B., Bralten J. Pleiotropic contribution of *MECOM* and *AVPR1A* to aggression and subcortical brain volumes. *Front. Behav. Neurosci*. 2018;12:61. DOI 10.3389/fnbeh.2018.00061.
- Van Ijzendoorn M.H., Belsky J., Bakermans-Kranenburg M.J. Serotonin transporter genotype 5HTTLPR as a marker of differential susceptibility? A meta-analysis of child and adolescent gene-by-environment studies. *Transl. Psychiatry*. 2012;2:e147. DOI 10.1038/tp.2012.73.
- VanNess S.H., Owens M.J., Kilts C.D. The variable number of tandem repeats element in *DAT1* regulates *in vitro* dopamine transporter density. *BMC Genet*. 2005;6:55. DOI 10.1186/1471-2156-6-55.
- Vermeersch H., T'sjoen G., Kaufman J.M., Van Houtte M. ESR1 polymorphisms, daily hassles, anger expression, and depressive symptoms in adolescent boys and girls. *Horm. Behav*. 2013;63(3):447-453. DOI 10.1016/j.yhbeh.2012.11.017.
- Viding E., Blair R.J., Moffitt T.E., Plomin R. Evidence for substantial genetic risk for psychopathy in 7-year-olds. *J. Child Psychol. Psychiatry*. 2005;46(6):592-597. DOI 10.1111/j.1469-7610.2004.00393.x.
- Wagner S., Baskaya Ö., Dahmen N., Lieb K., Tadić A. Modulatory role of the brain-derived neurotrophic factor Val⁶⁶Met polymorphism on the effects of serious life events on impulsive aggression in borderline personality disorder. *Genes Brain Behav*. 2010;9(1):97-102. DOI 10.1111/j.1601-183X.2009.00539.x.
- Waleewong O., Laslett A.M., Chenhall R., Room R. Harm from others' drinking-related aggression, violence and misconduct in five Asian countries and the implications. *Int. J. Drug Policy*. 2018;56:101-107. DOI 10.1016/j.drugpo.2018.03.015.
- Waller R., Corral-Frias N.S., Vannucci B., Bogdan R., Knodt A.R., Hariri A.R., Hyde L.W. An oxytocin receptor polymorphism predicts amygdala reactivity and antisocial behavior in men. *Soc. Cogn. Affect Neurosci*. 2016;11(8):1218-1226. DOI 10.1093/scan/nsw042.
- Wendland J.R., Martin B.J., Kruse M.R., Lesch K.P., Murphy D.L. Simultaneous genotyping of four functional loci of human *SLC6A4*, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol. Psychiatry*. 2006;11(3):224-226. DOI 10.1038/sj.mp.4001789.
- Wersinger S.R., Ginns E.I., O'Carroll A.M., Lolait S.J., Young W.S. Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol. Psychiatry*. 2002;7:975-984. DOI 10.1038/sj.mp.4001195.

- Willour V.L., Seifuddin F., Mahon P.B., Jancic D., Pirooznia M., Steele J., Schweizer B., Goes F.S., Mondimore F.M., Mackinnon D.F., Bipolar Genome Study Consortium, Perlis R.H., Lee P.H., Huang J., Kelsoe J.R., Shilling P.D., Rietschel M., Nöthen M., Cichon S., Gurling H., Purcell S., Smoller J.W., Craddock N., Depaulo J.R., Schulze T.G., McMahon F.J., Zandi P.P., Potash J.B. A genome-wide association study of attempted suicide. *Mol. Psychiatry*. 2012;17(4):433-444. DOI 10.1038/mp.2011.4.
- Willour V.L., Zandi P.P., Badner J.A., Steele J., Miao K., Lopez V., MacKinnon D.F., Mondimore F.M., Schweizer B., McInnis M.G., Miller E.B., Depaulo J.R., Gershon E.S., McMahon F.J., Potash J.B. Attempted suicide in bipolar disorder pedigrees: evidence for linkage to 2p12. *Biol. Psychiatry*. 2007;61(5):725-727. DOI 10.1016/j.biopsych.2006.05.014.
- Yang L., Wang F., Wang M., Han M., Hu L., Zheng M., Ma J., Kang Y., Wang P., Sun H., Zuo W., Xie L., Wang A., Yu D., Liu Y. Association between oxytocin and receptor genetic polymorphisms and aggression in a northern Chinese Han population with alcohol dependence. *Neurosci. Lett.* 2017;636:140-144. DOI 10.1016/j.neulet.2016.10.066.
- Yoon H.K., Lee H.J., Kim L., Lee M.S., Ham B.J. Impact of tryptophan hydroxylase 2 G-703T polymorphism on anger-related personality traits and orbitofrontal cortex. *Behav. Brain Res.* 2012;231(1):105-110.
- Young S.E., Smolen A., Corley R.P., Krauter K.S., DeFries J.C., Crowley T.J., Hewitt J.K. Dopamine transporter polymorphism associated with externalizing behavior problems in children. *Am. J. Med. Genet.* 2002;114(2):144-149.
- Zai C.C., Muir K.E., Nowrouzi B., Shaikh S.A., Choi E., Berall L., Trépanier M.O., Beitchman J.H., Kennedy J.L. Possible genetic association between vasopressin receptor 1B and child aggression. *Psychiatry Res.* 2012;200(2-3):784-788. DOI 10.1016/j.psychres.2012.07.031.
- Zhang Y., Ming Q., Wang X., Yao S. The interactive effect of the *MAOA*-VNTR genotype and childhood abuse on aggressive behaviors in Chinese male adolescents. *Psychiatr. Genet.* 2016;26(3):117-123. DOI 10.1097/YPG.0000000000000125.

ORCID ID

J.D. Davydova orcid.org/0000-0003-3508-4710

S.S. Litvinov orcid.org/0000-0002-5999-149X

R.F. Enikeeva orcid.org/0000-0002-4301-5283

S.B. Malykh orcid.org/0000-0002-3786-7447

E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

Анализ мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* при каротидных параганглиомах

Е.Н. Лукьянова¹, А.В. Снежкина¹, Д.В. Калинин², А.В. Покровский², А.Л. Головюк², О.А. Степанов¹, Е.А. Пудова¹, Г.С. Размахав³, М.В. Орлова⁴, А.П. Поляков³, М.В. Киселева³, А.Д. Каприн³, А.В. Кудрявцева^{1, 3} ✉

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт хирургии им. А.В. Вишневского Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁴ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Каротидные параганглиомы (КПГ) – редкие нейроэндокринные опухоли, которые развиваются из параганглионарной ткани каротидного тельца и располагаются в области бифуркации сонной артерии. Эти опухоли характеризуются медленным ростом, однако в ряде случаев наблюдается агрессивное течение заболевания и метастазирование. Операции по удалению каротидных параганглиом сопряжены с высоким риском осложнений, в то время как лучевая и химиотерапия малоэффективны. Изучение молекулярного патогенеза КПГ может способствовать разработке новых подходов к терапии и открытию биомаркеров. Ранее нами выполнено высокопроизводительное секвенирование экзема 52 архивных образцов КПГ, одной из задач которого была оценка мутационной нагрузки. Из-за отсутствия парных образцов гистологически нормальных тканей или крови потенциально герминальные мутации были исключены из выборки с использованием баз данных 1000 Genomes Project и ExAC при строгих параметрах фильтрации. В настоящем исследовании проанализированы десять генов (*ZNF717*, *CDC27*, *FRG2C*, *FAM104B*, *CTBP2*, *HLA-DRB1*, *HYDIN*, *KMT5A*, *MUC3A* и *PRSS3*), характеризующихся наиболее высокой мутационной нагрузкой. В четырех генах (*CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*) идентифицированы потенциально патогенные мутации, согласно нескольким предсказательным алгоритмам (SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster и LRT). Многие выявленные мутации оказались представленными в большом количестве образцов выборки, что заставило проверить их соматический статус с использованием дополнительных данных секвенирования экзема крови, выполненного с таким же набором для экзомного обогащения, как и при анализе опухолей КПГ. Обнаружено, что значительное число выявленных потенциально патогенных мутаций являются герминальными, что, по-видимому, связано с наличием ошибок аннотации в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC. Однако часть идентифицированных мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* остаются предположительно патогенными, кроме того, имеются многочисленные данные о вовлеченности этих генов в формирование и прогрессию других видов опухолей. Это позволяет считать гены *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* потенциально связанными с патогенезом КПГ и требует обратить на них особое внимание в дальнейших исследованиях. Таким образом, необходимо совершенствовать методики для выявления онко-ассоциированных генов и патогенных мутаций.

Ключевые слова: каротидные параганглиомы; экзом; мутационная нагрузка; мутации; высокопроизводительное секвенирование.

Analysis of mutations in *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* and *KMT5A* genes in carotid paragangliomas

E.N. Lukyanova¹, A.V. Snezhkina¹, D.V. Kalinin², A.V. Pokrovsky², A.L. Golovyuk², O.A. Stepanov¹, E.A. Pudova¹, G.S. Razmakhaev³, M.V. Orlova⁴, A.P. Polyakov³, M.V. Kiseleva³, A.D. Kaprin³, A.V. Kudryavtseva^{1, 3} ✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

² Vishnevsky Institute of Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

Carotid paragangliomas (CPGLs) are rare neuroendocrine tumors that arise from paraganglionic tissue of the carotid body localizing at the bifurcation of carotid artery. These tumors are slowly growing, but occasionally they become aggressive and metastatic. Surgical treatment remains high-risk and extremely challenging; radiation and chemotherapy are poorly effective. The study of molecular pathogenesis of CPGLs will allow developing novel therapeutic approaches and revealing biomarkers. Previously, we performed the exome sequencing of 52 CPGLs and estimated mutational load (ML). Paired histologically normal tissues or blood were unavailable, so potentially germline mutations were excluded from the analysis with strong filtering conditions using 1000 Genomes Project and ExAC databases. In this work, ten genes (*ZNF717*, *CDC27*, *FRG2C*, *FAM104B*, *CTBP2*, *HLA-DRB1*, *HYDIN*, *KMT5A*, *MUC3A*, and *PRSS3*) characterized by the highest level of mutational load were analyzed. Using several prediction algorithms (SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster, and LRT), potentially pathogenic mutations were identified in four genes (*CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN*, and *KMT5A*). Many of these mutations occurred in the majority of cases, and their mutation type was checked using exome sequencing data of blood prepared with the same exome enrichment kit that was used for preparation of exome libraries from CPGLs. The majority of the mutations were germline that can apparently be associated with annotation errors in 1000 Genomes Project and ExAC. However, part of the mutations identified in *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN*, and *KMT5A* remain potentially pathogenic, and there is a large body of data on the involvement of these genes in the formation and progression of other tumors. This allows considering

Received 31.03.2018

Accepted for publication 28.06.2018

© AUTHORS, 2018

E.N. Lukyanova and A.V. Snezhkina equal contribution to manuscript preparation.

✉ e-mail: rhizamoeba@mail.ru

CDC27, CTBP2, HYDIN, and KMT5A genes as potentially associated with CPGL pathogenesis and requires taking them into account in further investigations. Thus, there is a necessity to improve the methods for identification of cancer-associated genes as well as pathogenic mutations.

Key words: carotid paragangliomas; exome; mutation load; mutations; high-throughput sequencing.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Лукьянова Е.Н., Снежкина А.В., Калинин Д.В., Покровский А.В., Головюк А.Л., Степанов О.А., Пудова Е.А., Размахаяев Г.С., Орлова М.В., Поляков А.П., Киселева М.В., Каприн А.Д., Кудрявцева А.В. Анализ мутаций в генах *CDC27, CTBP2, HYDIN* и *KMT5A* при каротидных параганглиомах. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):726-733. DOI 10.18699/VJ18.416

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lukyanova E.N., Snezhkina A.V., Kalinin D.V., Pokrovsky A.V., Golovyuk A.L., Stepanov O.A., Pudova E.A., Razmakhaev G.S., Orlova M.V., Polyakov A.P., Kiseleva M.V., Kaprin A.D., Kudryavtseva A.V. Analysis of mutations in *CDC27, CTBP2, HYDIN* and *KMT5A* genes in carotid paragangliomas. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):726-733. DOI 10.18699/VJ18.416 (in Russian)

Параганглиомы – редкие нейроэндокринные опухоли, которые характеризуются высокой генетической гетерогенностью (Favier et al., 2015). Около 3 % всех параганглиом располагаются в области головы и шеи. Наиболее распространены из них каротидные параганглиомы (КПГ), которые образуются из каротидного тельца, располагающегося в области бифуркации сонной артерии. В 25–40 % случаев параганглиомы ассоциированы с мутациями, которые могут приводить к двум основным вариантам нарушений: 1) изменению путей, связанных с гипоксией (*SDHx, VHL* и *PHD*); 2) дерегуляции онко-ассоциированных путей, в которые вовлечены протоонкоген *RET*, а также гены-супрессоры опухолевого роста *NF1, TMEM127, MAX* и *KIF1Bβ* (Nölting, Grossman, 2012). Мутации в этих генах встречаются как в случае наследственных семейных опухолевых синдромов, так и при спорадических формах опухолей (Unlü et al., 2009; Favier, Gimenez-Roqueplo, 2012). По-видимому, эти два варианта нарушений связаны с разными типами развития параганглиом; опухоли в состоянии псевдогипоксии характеризуются aberrантной активацией фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*), повышенной васкуляризацией, снижением интенсивности окислительно-восстановительных реакций, в то время как опухоли второй группы ассоциированы с активацией сигнальных путей *PI3K/AKT, RAS/RAF/ERK* и *mTORC1/p70S6K*, а также нейрональными и нейроэндокринными нарушениями. Эти группы подразделяют на следующие подгруппы: 1А и 1В, которые включают параганглиомы с мутациями в генах *SDHx* и *VHL* соответственно; подгруппу 2А, содержащую опухоли с мутациями в генах *RET, MAX, NF1, TMEM127* и *KIF1Bβ*; подгруппы 2В и 2С, в которые включены спорадические опухоли, и 2D – подгруппу опухолей, не содержащих известных мутаций (Zhikrivetskaya et al., 2017).

Единственным методом лечения КПГ является хирургическое удаление опухоли, так как лучевая и химиотерапия малоэффективны. Однако в связи с близким расположением к сонной артерии и крупным нервам, операции по удалению этих опухолей сопряжены с высоким риском осложнений. Изучение молекулярного патогенеза каротидных параганглиом необходимо для разработки новых терапевтических подходов и выявления маркеров, определяющих клинические особенности течения заболевания. В настоящее время диагностические и прогностические

биомаркеры данного заболевания ограничены и обладают низкой чувствительностью и специфичностью (Plouin et al., 2016).

В последние годы весьма эффективным методом лечения ряда онкологических заболеваний показала себя иммунотерапия ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (Bracarda et al., 2015). Одним из многообещающих предиктивных биомаркеров ответа опухоли на иммунотерапию является мутационная нагрузка (МН) – количество соматических мутаций, нормированных на одну мегабазу (1 млн п. н.) кодирующей последовательности ДНК человека (Topalian et al., 2016). В результате возникновения большого количества соматических мутаций в опухолях появляются новые формы белков – неоантигены, которые отсутствуют в нормальных клетках (Chabanon et al., 2016). Иммунные клетки распознают их как чужеродные, что вызывает устойчивый Т-клеточный ответ. Таким образом, уровень мутационной нагрузки коррелирует с ответом на иммунотерапию (Alexandrov et al., 2013; Van Allen et al., 2015).

Исследование уровня мутационной нагрузки при различных опухолях является как фундаментальной, так и актуальной прикладной задачей. Ранее нами на основании анализа секвенирования экзона 52 образцов опухолей была впервые проведена оценка мутационной нагрузки при КПГ (Snezhkina et al., 2018). Выявлено, что несколько генов характеризуются существенно повышенным количеством потенциально соматических «вредных» (приводящих к изменению структуры белка) мутаций по сравнению с другими генами. Предполагается, что эти гены могут играть важную роль в патогенезе каротидных параганглиом. Это послужило основой для их детального анализа.

Материалы и методы

В работе использованы результаты секвенирования экзона 52 архивных образцов каротидных параганглиом (Snezhkina et al., 2018). Ранее на основе этих данных нами были идентифицированы гены, характеризующиеся наиболее высокой мутационной нагрузкой. В связи с невозможностью получить для архивного материала парные образцы крови, а также с отсутствием прилегающей гистологически нормальной ткани, для сравнения были взяты данные ExAC и 1000 Genomes Project. Для

удаления максимального количества герминальных мутаций использовались строгие параметры: из анализа исключены все мутации, встречающиеся в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC с частотой более 2 % (Snezhkina et al., 2018).

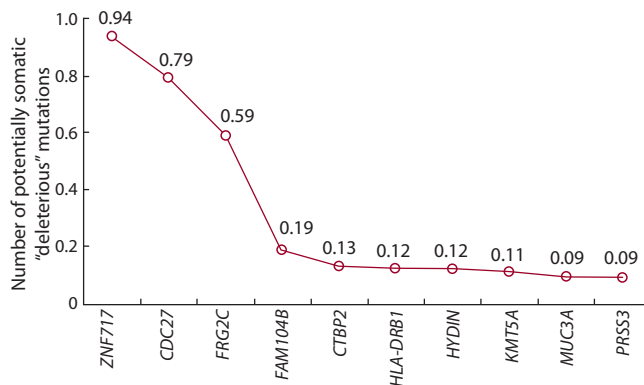
В топ-10 генах проанализированы мутации с применением наиболее распространенных алгоритмов, предсказывающих их патогенность: SIFT, PolyPhen2, MutationTaster и LRT. Для дальнейшего анализа выбрано четыре гена *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*, в остальных генах большинство вариантов оказались нейтральными. Для анализа типа (герминального или соматического) выявленных вариантов выполнено секвенирование экзома трех образцов периферической крови больных КПП. Выделение ДНК проводилось на станции для автоматического выделения нуклеиновых кислот MagNA Pure Compact System (Roche, Швейцария) с использованием набора MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche). Экзомные библиотеки подготавливались при помощи набора TruSeq Exome Library Prep Kit (Illumina, США) согласно протоколу производителя. Высокопроизводительное секвенирование проведено на приборе NextSeq 500 System (Illumina) в режиме парных прочтений (76 × 2). Оценка качества чтений выполнена с помощью FastQC, для очистки чтений использовали программу Trimmomatic. Далее с помощью BWA-MEM проведено картирование прочтений на референсный геном человека (GRCh37/hg19). Для обработки прочтений использовали программный пакет SAMtools. Идентификацию мутаций осуществляли с помощью программы vcfFilter пакета vcfLib, аннотацию вариантов – с использованием SnpSift пакета snpEff.

Результаты

Потенциально патогенные мутации в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*

Ранее в единственной работе, посвященной оценке мутационной нагрузки при КПП, нами показано, что в нескольких генах обнаруживается существенно повышенное количество мутаций (в пересчете на одну мегабазу кодирующего региона генома) по сравнению с другими генами (Snezhkina et al., 2018). Был использован единственный доступный алгоритм анализа, основанный на биоинформатической фильтрации соматических мутаций при помощи баз данных 1000 Genomes Project и ExAC. Выявлено десять генов – *ZNF717*, *CDC27*, *FRG2C*, *FAM104B*, *CTBP2*, *HLA-DRB1*, *HYDIN*, *KMT5A*, *MUC3A* и *PRSS3*, характеризующихся повышенным количеством потенциально соматических «вредных» мутаций (см. рисунок).

В исследуемых генах детально проанализированы все выявленные варианты с использованием алгоритмов, предсказывающих их патогенность (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster и LRT), а также методы расчета эволюционной консервативности позиций (PhastCons и PhyloP). Большинство потенциально патогенных мутаций обнаружено в четырех генах: *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* (см. таблицу). Мутации в остальных генах, согласно большинству предсказательных алгоритмов, были преимущественно нейтральными. Проведен анализ



Distribution of potentially detrimental somatic mutations in genes.

The analysis includes only mutations altering the protein structure: nonsense, missense, and frameshift. Mutations enlisted in the ExAC and 1000 Genomes Project databases are omitted. The numbers of mutations are normalized per megabase (Mb) of human DNA protein coding regions. The analysis takes into account gene and exome sizes with regard to the sample design in the library preparation kit.

литературы для установления роли генов *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* в развитии онкологических заболеваний. Оказалось, что все четыре гена описаны ранее как онко-ассоциированные, что предварительно подтверждало предположение об их возможной роли в патогенезе КПП. Однако при детальном рассмотрении выявленных потенциально патогенных мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* оказалось, что значительная часть из них характерна почти для всех образцов выборки. Более того, эти мутации встречаются в некоторых образцах в гомозиготном состоянии. Сделано предположение, что выявленные мутации, по-видимому, представляют собой герминальные варианты, что может быть связано с ошибками аннотации или отсутствием этих мутаций в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC. Помимо этого, вероятным объяснением также могут быть ошибки секвенирования. Однако не следует исключать возможность, что эти мутации характерны именно для КПП.

Сопоставление данных секвенирования опухолевой ткани КПП и крови для уточнения типа мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*

В результате дополнительного анализа данных высокопроизводительного секвенирования экзома трех образцов крови обнаружено, что значительная часть идентифицированных потенциально патогенных мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* при КПП являются герминальными. Так, из 33 выявленных мутаций только восемь с высокой вероятностью могут быть соматическими (см. таблицу).

Обсуждение

Нами проведен анализ десяти генов, в которых ранее при КПП выявлено наибольшее количество потенциально «вредных» мутаций при нормировании на одну мегабазу кодирующих последовательностей ДНК (Snezhkina et al.,

Potentially pathogenic mutations in the *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN*, and *KMT5A* genes with the results of their type check (germline or somatic), identified in primary analysis

Gene	Transcript	dbSNP ID	Mapping on chromosome	Genotype/ number of samples	Mutation nucleotide	amino acid	Number of samples with the mutation
<i>CDC27</i>	NM_001114091	–	chr17: 45,235,612	HET/9	c.435T>G	p.Asn145Lys	9
		–	chr17: 45,219,329	HET/16 HOM/2	c.1459T>G	p.Cys487Gly	18
		rs77891297	chr17: 45,216,169	HET/29 HOM/20	c.1658A>C	p.Gln553Pro	49
		rs79201963	chr17: 45,219,239	HET/39 HOM/10	c.1549G>A	p.Glu517Lys	49
		–	chr17: 45,247,301	HET/43 HOM/6	c.359T>C	p.Leu120Ser	49
		rs76836152	chr17: 45,216,172	HET/29 HOM/20	c.1655T>C	p.Leu552Pro	49
		rs62075657	chr17: 45,216,132	HET/40 HOM/9	c.1695A>C	p.Leu565Phe	49
		–	chr17: 45,214,614	HET/2	c.1835T>C	p.Leu612Pro	2
		rs186452221	chr17: 45,232,043	HET/18	c.952A>G	p.Lys318Glu	18
		rs62075620	chr17: 45,214,669	HET/42 HOM/4	c.1780A>C	p.Lys594Gln	46
		rs62077276	chr17: 45,258,954	HET/30 HOM/19	c.77T>C	p.Phe26Ser	49
		rs79487913	chr17: 45,219,296	HET/46 HOM/3	c.1492C>G	p.Pro498Ala	49
		rs77467652	chr17: 45,235,598	HET/4	c.449C>G	p.Ser150Cys	4
		rs76995821	chr17: 45,219,283	HET/1	c.1504_1505delTAinsCG	p.Tyr502Arg	1
		rs76995821	chr17: 45,219,283	HET/45 HOM/3	c.1505A>G	p.Tyr502Cys	48
		rs75729335	chr17: 45,219,226	HET/45 HOM/3	c.1562A>C	p.Tyr521Ser	48
		rs112848754	chr17: 45,234,406	HET/2	c.714delT	p.Val239fs	2
<i>CTBP2</i>	NM_022802	–	chr10: 126,686,634	HET/1	c.2084C>A	p.Ala695Glu	1
		rs61870306	chr10: 126,683,071	HET/48 HOM/1	c.2367C>G	p.Asn789Lys	49
		–	chr10: 126,683,058	HET/6	c.2380A>C	p.Asn794His	6
		rs80025996	chr10: 126,683,146	HET/23	c.2292G>T	p.Gln764His	23
		rs80273852	chr10: 126,683,075	HET/40 HOM/1	c.2363A>T	p.His788Leu	41
		rs76582415	chr10: 126,682,443	HET/33	c.2512C>A	p.His838Asn	33
		rs150320719	chr10: 126,683,132	HET/17	c.2306T>A	p.Leu769Gln	17
		rs79936509	chr10: 126,683,123	HET/48 HOM/1	c.2315T>G	p.Leu772Trp	49
		–	chr10: 126,714,721	HET/1	c.1605_1606delCT	p.Ser536fs	1
		rs146097043	chr10: 126,678,133	HET/6	c.2911delC	p.Gln971fs	6

End of table

Gene	Transcript	dbSNP ID	Mapping on chromosome	Genotype/number of samples	Mutation nucleotide	amino acid	Number of samples with the mutation
<i>HYDIN</i>	NM_001270974	rs116739010	chr16:70,989,335	HET/45	c.6259C>T	p.Arg2087Cys	45
		rs1774360	chr16:70,972,620	HET/42	c.6892C>G	p.Arg2298Gly	42
		rs117626004	chr16:71,098,649	HET/43	c.2170A>G	p.Asn724Asp	43
		rs201356436	chr16:70,896,033	HET/5	c.11695G>A	p.Val3899Met	5
		rs77276171	chr16:70,896,015	HET/43	c.11712delT	p.Gln3905fs	43
<i>KMT5A</i>	NM_020382	rs77198130	chr12:123,880,923	HET/3	c.542_543delTT	p.Leu181fs	3

Notes. The mutations were selected in accordance with the highest values predicting their pathogenicity by four algorithms: SIFT, ≤ 0.05 (pathogenic); PolyPhen-2, ≥ 0.85 (probably pathogenic); MutationTaster – 1 (pathogenic); LRT – D (disease); or U (unknown). Potential pathogenic mutations are marked in gray, and unmarked mutations are germline. The results were obtained by comparison of exome sequencing data derived from tumor samples and three blood samples.

2018). При этом только в четырех генах (*CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*) идентифицированы потенциально патогенные мутации согласно нескольким предсказательным алгоритмам.

Для всех четырех выявленных генов ранее показана вовлеченность в образование опухолей. Ген *CDC27* кодирует белок цикла клеточного деления 27. Этот белок является коровой субъединицей комплекса стимуляции анафазы/циклосомы (APC/C), который катализирует реакцию убиквитинирования и регулирует деградацию белков в ходе митоза (Page, Hieter, 1999; Peters, 2006). Мутации в гене *CDC27* обнаружены при остеосаркоме, раке яичка, предстательной железы и колоректальном раке (Lindberg et al., 2013; Reimann et al., 2014; Yu et al., 2014; Litchfield et al., 2015). Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в гене *CDC27*, а также снижение его экспрессии связаны с риском развития рака молочной железы (Stevens et al., 2011). При раке молочной железы уровень экспрессии *CDC27* и секурина, а также соотношение уровней экспрессии этих двух белков могут быть использованы для оценки прогноза заболевания (Talvinen et al., 2013). На клеточных линиях рака молочной железы показано участие *CDC27* в полиубиквитинировании циклина D1 (Pawar et al., 2010). Циклин D1 является протоонкогеном, регулирующим фазовый переход G1-S клеточного цикла в опухолевых клетках (Alao, 2007); повышение его экспрессии наблюдается при многих видах рака (Juhlin et al., 2009). В клеточных линиях колоректального рака подавление экспрессии *CDC27* приводило к ингибированию пролиферации опухолевых клеток, в то время как повышение экспрессии – к стимуляции клеточного деления (Qiu et al., 2016).

Ген *CTBP2* кодирует С-концевой связывающий белок 2. Вместе со своим паралогом, *CTBP2*, белки участвуют в регуляции транскрипции путем связывания с ДНК или факторами ремоделирования хроматина, например метилтрансферазами гистонов (HMTs) или деацетилазами гистонов (HDACs) (Turner, Crossley, 2001). На клеточных

линиях рака молочной железы показано влияние *CTBP1/2* на репарацию ДНК (Di et al., 2010, 2013). В опухолевых клетках *CTBP2* участвует в активации эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и метастазировании (Di et al., 2013; Zhang J. et al., 2015). Повышение экспрессии *CTBP2* наблюдается при раке молочной железы, предстательной железы, яичников, желудка, глиомах и ассоциировано с плохим прогнозом и снижением выживаемости больных (Barroilhet et al., 2013; Di et al., 2013; Zhang et al., 2014; Wang et al., 2016; Dai et al., 2017).

Ген *HYDIN* кодирует протяженный белок, предположительно участвующий в клеточном движении (Davy, Robinson, 2003; Doggett et al., 2006). В гене *HYDIN* обнаружены частые соматические мутации у больных раком молочной железы (Zhang Y. et al., 2015). Сравнительное исследование мутаций в генах среди 23 разных видов рака, выполненное с использованием базы данных COSMIC (v68), показало, что *HYDIN* входит в число первых ста генов с наибольшей частотой мутаций (Tan et al., 2015).

Ген *KMT5A* (*SET8*, *SETD8* или *PR-Set7*) кодирует метилтрансферазу гистонов 5A, которая обеспечивает метилирование лизина 20 гистона H4 и участвует в транскрипционной репрессии ряда генов (Nishioka et al., 2002). Важные функции *KMT5A* – поддержание структуры ДНК во время митоза, конденсация хроматина и обеспечение нормального прохождения цитокинеза (Wu, Rice, 2011; Beck et al., 2012). В ряде исследований показана вовлеченность гена *KMT5A* в разные патологические процессы, в том числе канцерогенез (Yu et al., 2013; Milite et al., 2016). *KMT5A* может влиять на транскрипционную активность p53 и его основные функции (проапоптотическую, а также арест клеточного цикла) путем метилирования лизина 382 (p53K382) (Shi et al., 2007). Повышение экспрессии гена *KMT5A* наблюдается при глиоме, хронической миелоидной лейкемии, гепатоцеллюлярной карциноме, раке поджелудочной железы, щитовидной железы и легкого (Takawa et al., 2012; Liao et al., 2018; Ma, 2018). При раке мо-

лочной железы повышенная экспрессия *KMT5A* положительно коррелирует с экспрессией *TWIST* и N-кадгерина и отрицательно коррелирует с экспрессией E-кадгерина, что свидетельствует о его вовлеченности в ЭМП (Yang et al., 2012). Способность *KMT5A* увеличивать инвазивный потенциал опухолевых клеток подтверждается несколькими исследованиями (Yu et al., 2013; Liao et al., 2018). Полиморфизм в гене *KMT5A* (rs16917496), располагающийся в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) в сайте связывания с микроРНК miR-502, – один из двенадцати полиморфизмов с aberrантной частотой аллелей в опухолях (по данным анализа библиотек EST NCBI), обнаруженных в сайтах связывания микроРНК с мРНК. Эти SNP могут нарушать связывание микроРНК с мРНК-мишенью и влиять на экспрессию белка (Yu et al., 2007). Данный полиморфизм ассоциирован со снижением экспрессии гена *KMT5A* и увеличением общей выживаемости больных гепатоцеллюлярной карциномой, раком молочной железы, яичников и легкого (Song et al., 2009; Ding et al., 2012; Guo et al., 2012; Wang et al., 2012; Xu et al., 2013).

Идентифицированные гены кодируют преимущественно консервативные белки и участвуют в важных клеточных процессах, таких как пролиферация, регуляция транскрипции, клеточный цикл, эпигенетическая регуляция экспрессии генов и движение клеток. Все четыре гена, согласно данным литературы, вовлечены в канцерогенез и ассоциированы с опухолями различных локализаций. Для генов *CDC27* и *CTBP2* показана функция потенциального гена-супрессора опухолевого роста и онкогена соответственно. Однако при детальном рассмотрении выявленных мутаций в этих генах обнаружены варианты, характерные для большинства образцов выборки каротидных параганглиом (например, в 49 случаях из 52). Причем часть мутаций встречается в гомозиготном состоянии, исходя из чего сделано предположение, что данные мутации являются герминальными вариантами. Это было подтверждено после секвенирования экзона крови трех пациентов с использованием набора для пробоподготовки библиотек, аналогичного набору, который был использован для подготовки экзомных библиотек из опухолевой ткани. Обнаружено, что большинство идентифицированных мутаций наследственные. Часть остальных потенциально соматических мутаций встречается более чем в одном образце КПП. Возможно, эти мутации также окажутся герминальными при анализе экзона парной нормальной ткани, полученной от этих же пациентов, или большего числа образцов нормальной ткани. Однако эти мутации могут быть действительно ассоциированы с патогенезом каротидных параганглиом, так как для других видов опухолей показано участие выявленных нами генов в канцерогенезе, в частности, вследствие появления онко-ассоциированных мутаций. Маловероятно, что обнаруженные мутации являются следствием ошибок секвенирования.

Таким образом, инструменты и алгоритмы, использующиеся для анализа частоты мутаций, имеют определенные недостатки. В базах данных 1000 Genomes Project и ExAC могут быть ошибки аннотации. Гены, располагающиеся в недостаточно хорошо аннотированных областях генома, по-видимому, ошибочно попадают в список генов с высо-

кой частотой мутаций. На получаемых результатах могут также сказаться недостаточное покрытие при секвенировании определенных генов или ошибки секвенирования. Поэтому необходимо совершенствовать методики для выявления онко-ассоциированных генов и патогенных мутаций. По-видимому, выявленные нами несколько областей с ошибочной аннотацией в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC несущественно влияют на средний уровень МН, рассчитанный для КПП. Необычная форма графика при анализе каротидных параганглиом оказалась артефактом, и при этом типе опухолей гены различаются по частоте мутаций незначительно. Однако ряд идентифицированных мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*, которые предсказаны как предположительно патогенные, а также большое количество данных об их вовлеченности в формирование и прогрессию других типов опухолей позволяют считать эти гены потенциально связанными с патогенезом КПП и требуют обратить на них особое внимание в дальнейших исследованиях.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Vishnevskiy Institute of Surgery for assistance in sampling; to the National Medical Research Center for Radiology and the Peoples' Friendship University of Russia for assistance in data processing; and to the Genome Shared Access Center, Engelhardt Institute of Molecular Biology (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php) for providing access to equipment.

The work was supported by the Russian Science Foundation, project 17-75-20105.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alao J.P. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol. Cancer*. 2007;6:24. DOI 10.1186/1476-4598-6-24.
- Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A., Behjati S., Biankin A.V., Bignell G.R., Bolli N., Borg A., Borresen-Dale A.L., Boyault S., Burkhardt B., Butler A.P., Caldas C., Davies H.R., Desmedt C., Eils R., Eyfjörð J.E., Foekens J.A., Greaves M., Hosoda F., Hutter B., Ilic T., Imbeaud S., Imielinski M., Jäger N., Jones D.T., Jones D., Knappskog S., Kool M., Lakhani S.R., López-Otín C., Martin S., Munshi N.C., Nakamura H., Northcott P.A., Pajic M., Papamannuil E., Paradiso A., Pearson J.V., Puente X.S., Raine K., Ramakrishna M., Richardson A.L., Richter J., Rosenstiel P., Schlesner M., Schumacher T.N., Span P.N., Teague J.W., Totoki Y., Tutt A.N., Valdés-Mas R., van Buuren M.M., van 't Veer L., Vincent-Salomon A., Waddell N., Yates L.R., Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Zucman-Rossi J., Futreal P.A., McDermott U., Lichter P., Meyerson M., Grimmond S.M., Siebert R., Campo E., Shibata T., Pfister S.M., Campbell P.J., Stratton M.R. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-421. DOI 10.1038/nature12477.
- Barroilhet L., Yang J., Hasselblatt K., Paranal R.M., Ng S.K., Rauh-Hain J.A., Welch W.R., Bradner J.E., Berkowitz R.S., Ng S.W. C-terminal binding protein-2 regulates response of epithelial ovarian cancer cells to histone deacetylase inhibitors. *Oncogene*. 2013; 32(33):3896-3903. DOI 10.1038/onc.2012.380.

- Beck D.B., Oda H., Shen S.S., Reinberg D. PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev.* 2012;26(4):325-337. DOI 10.1101/gad.177444.111.
- Bracarda S., Altavilla A., Hamzaj A., Sisani M., Marrocolo F., Del Buono S., Danielli R. Immunologic checkpoints blockade in renal cell, prostate, and urothelial malignancies. *Semin. Oncol.* 2015;42(3):495-505. DOI 10.1053/j.seminoncol.2015.02.004.
- Chabanon R.M., Pedrero M., Lefebvre C., Marabelle A., Soria J.C., Postel-Vinay S. Mutational landscape and sensitivity to immune checkpoint blockers. *Clin. Cancer Res.* 2016;22(17):4309-4321. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-16-0903.
- Dai F., Xuan Y., Jin J.J., Yu S., Long Z.W., Cai H., Liu X.W., Zhou Y., Wang Y.N., Chen Z., Huang H. CtBP2 overexpression promotes tumor cell proliferation and invasion in gastric cancer and is associated with poor prognosis. *Oncotarget.* 2017;8(17):28736-28749. DOI 10.18632/oncotarget.15661.
- Davy B.E., Robinson M.L. Congenital hydrocephalus in *hy3* mice is caused by a frameshift mutation in *Hydin*, a large novel gene. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12(10):1163-1170. DOI 10.1093/hmg/ddg122.
- Di L.J., Byun J.S., Wong M.M., Wakano C., Taylor T., Bilke S., Baek S., Hunter K., Yang H., Lee M., Zvosec C., Khrantsova G., Cheng F., Perou C.M., Miller C.R., Raab R., Olopade O.I., Gardner K. Genome-wide profiles of CtBP link metabolism with genome stability and epithelial reprogramming in breast cancer. *Nat. Commun.* 2013;4:1449. DOI 10.1038/ncomms2438.
- Di L.J., Fernandez A.G., De Siervi A., Longo D.L., Gardner K. Transcriptional regulation of *BRCA1* expression by a metabolic switch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010;17(12):1406-1413. DOI 10.1038/nsmb.1941.
- Ding C., Li R., Peng J., Li S., Guo Z. A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3' untranslated region of the *SET8* gene is associated with the outcome of small-cell lung cancer. *Exp. Ther. Med.* 2012;3(4):689-692. DOI 10.3892/etm.2012.469.
- Doggett N.A., Xie G., Meincke L.J., Sutherland R.D., Mundt M.O., Berbari N.S., Davy B.E., Robinson M.L., Rudd M.K., Weber J.L., Stallings R.L., Han C. A 360-kb interchromosomal duplication of the human *HYDIN* locus. *Genomics.* 2006;88(6):762-771. DOI 10.1016/j.ygeno.2006.07.012.
- Favier J., Amar L., Gimenez-Roqueplo A.P. Paraganglioma and pheochromocytoma: from genetics to personalized medicine. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015;11(2):101-111. DOI 10.1038/nrendo.2014.188.
- Favier J., Gimenez-Roqueplo A.P. Genetics of paragangliomas and pheochromocytomas. *Med. Sci. (Paris).* 2012;28(6-7):625-632. DOI 10.1051/medsci/2012286016.
- Guo Z., Wu C., Wang X., Wang C., Zhang R., Shan B. A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3'-untranslated region of the histone methyltransferase *SET8* is associated with hepatocellular carcinoma outcome. *Int. J. Cancer.* 2012;131(6):1318-1322. DOI 10.1002/ijc.27352.
- Juhlin C.C., Goh G., Healy J.M., Fonseca A.L., Scholl U.I., Stenman A., Kunstman J.W., Brown T.C., Overton J.D., Mane S.M., Nelson-Williams C., Bäckdahl M., Suttorp A.C., Haase M., Choi M., Schlessinger J., Rimm D.L., Höög A., Prasad M.L., Korah R., Kim J.K., Diehl J.A. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J. Cell Physiol.* 2009;220(2):292-296. DOI 10.1002/jcp.21791.
- Liao T., Wang Y.J., Hu J.Q., Wang Y., Han L.T., Ma B., Shi R.L., Qu N., Wei W.J., Guan Q., Xiang J., Chen J.Y., Sun G.H., Li D.S., Mu X.M., Ji Q.H. Histone methyltransferase *KMT5A* gene modulates oncogenesis and lipid metabolism of papillary thyroid cancer *in vitro*. *Oncol. Rep.* 2018;39(5):2185-2192. DOI 10.3892/or.2018.6295.
- Lindberg J., Mills I.G., Klevebring D., Liu W., Neiman M., Xu J., Wikström P., Wiklund P., Wiklund F., Egevad L., Grönberg H. The mitochondrial and autosomal mutation landscapes of prostate cancer. *Eur. Urol.* 2013;63(4):702-708. DOI 10.1016/j.eururo.2012.11.053.
- Litchfield K., Summersgill B., Yost S., Sultana R., Labreche K., Dudakia D., Renwick A., Seal S., Al-Saadi R., Broderick P., Turner N.C., Houlston R.S., Huddart R., Shipley J., Turnbull C. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat. Commun.* 2015;6:5973. DOI 10.1038/ncomms6973.
- Ma Z. Downregulation of SETD8 by miR-382 is involved in glioma progression. *Pathol. Res. Pract.* 2018;214(3):356-360. DOI 10.1016/j.prp.2018.01.004.
- Milite C., Feoli A., Viviano M., Rescigno D., Cianciulli A., Balzano A.L., Mai A., Castellano S., Sbardella G. The emerging role of lysine methyltransferase SETD8 in human diseases. *Clin. Epigenetics.* 2016;8:102. DOI 10.1186/s13148-016-0268-4.
- Nishioka K., Rice J.C., Sarma K., Erdjument-Bromage H., Werner J., Wang Y., Chuikov S., Valenzuela P., Tempst P., Steward R., Lis J.T., Allis C.D., Reinberg D. PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell.* 2002;9(6):1201-1213. DOI 10.1016/S1097-2765(02)00548-8.
- Nölting S., Grossman A.B. Signaling pathways in pheochromocytomas and paragangliomas: prospects for future therapies. *Endocr. Pathol.* 2012;23(1):21-33. DOI 10.1007/s12022-012-9199-6.
- Page A.M., Hieter P. The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu. Rev. Biochem.* 1999;68:583-609. DOI 10.1146/annurev.biochem.68.1.583.
- Pawar S.A., Sarkar T.R., Balamurugan K., Sharan S., Wang J., Zhang Y., Dowdy S.F., Huang A.M., Sterneck E. C/EBP δ targets cyclin D1 for proteasome-mediated degradation via induction of CDC27/APC3 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(20):9210-9215. DOI 10.1073/pnas.0913813107.
- Peters J.M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006;7(9):644-656. DOI 10.1038/nrm1988.
- Plouin P.F., Amar L., Dekkers O.M., Fassnacht M., Gimenez-Roqueplo A.P., Lenders J.W., Lusse-Lepoutre C., Steichen O. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline for long-term follow-up of patients operated on for a pheochromocytoma or a paraganglioma. *Eur. J. Endocrinol.* 2016;174(5):G1-G10. DOI 10.1530/EJE-16-0033.
- Qiu L., Wu J., Pan C., Tan X., Lin J., Liu R., Chen S., Geng R., Huang W. Downregulation of CDC27 inhibits the proliferation of colorectal cancer cells via the accumulation of p21^{Cip1/Waf1}. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2074. DOI 10.1038/cddis.2015.402.
- Reimann E., Köks S., Ho X.D., Maasalu K., Märtson A. Whole exome sequencing of a single osteosarcoma case—integrative analysis with whole transcriptome RNA-seq data. *Hum. Genomics.* 2014;8:20. DOI 10.1186/s40246-014-0020-0.
- Shi X., Kachirskaja I., Yamaguchi H., West L.E., Wen H., Wang E.W., Dutta S., Appella E., Gozani O. Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Mol. Cell.* 2007;27(4):636-646. DOI 10.1016/j.molcel.2007.07.012.
- Snezhkina A.V., Lukyanova E.N., Kalinin D.V., Pokrovsky A.V., Dmitriev A.A., Koroban N.V., Pudova E.A., Fedorova M.S., Volchenko N.N., Stepanov O.A., Zheveliyuk E.A., Kharitonov S.L., Lipatova A.V., Abramov I.S., Golovyuk A.V., Yegorov Y.E., Vishnyakova K.S., Moskalev A.A., Krasnov G.S., Melnikova N.V., Shcherbo D.S., Kiseleva M.V., Kaprin A.D., Alekseev B.Y., Zaretzky A.R., Kudryavtseva A.V. Exome analysis of carotid body tumor. *BMC Med. Genomics.* 2018;11(Suppl.1):17. DOI 10.1186/s12920-018-0327-0.
- Song F., Zheng H., Liu B., Wei S., Dai H., Zhang L., Calin G.A., Hao X., Wei Q., Zhang W., Chen K. An miR-502-binding site single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the *SET8* gene is associated with early age of breast cancer onset. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(19):6292-6300. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-0826.
- Stevens K.N., Wang X., Fredericksen Z., Pankratz V.S., Cerhan J., Vachon C.M., Olson J.E., Couch F.J. Evaluation of associations between common variation in mitotic regulatory pathways and risk of overall and high grade breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011;129(2):617-622. DOI 10.1007/s10549-011-1587-y.
- Takawa M., Cho H.S., Hayami S., Toyokawa G., Kogure M., Yamane Y., Iwai Y., Maejima K., Ueda K., Masuda A., Dohmae N.,

- Field H.I., Tsunoda T., Kobayashi T., Akasu T., Sugiyama M., Ohnuma S., Atomi Y., Ponder B.A., Nakamura Y., Hamamoto R. Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by de-regulating PCNA expression. *Cancer Res.* 2012;72(13):3217-3227. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-11-3701.
- Talvinen K., Karra H., Pitkänen R., Ahonen I., Nykänen M., Lintunen M., Söderström M., Kuopio T., Kronqvist P. Low cdc27 and high securin expression predict short survival for breast cancer patients. *APMIS.* 2013;121(10):945-953. DOI 10.1111/apm.12110.
- Tan H., Bao J., Zhou X. Genome-wide mutational spectra analysis reveals significant cancer-specific heterogeneity. *Sci. Rep.* 2015;5:12566. DOI 10.1038/srep12566.
- Topalian S.L., Taube J.M., Anders R.A., Pardoll D.M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2016;16(5):275-287. DOI 10.1038/nrc.2016.36.
- Turner J., Crossley M. The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors. *Bioessays.* 2001;23(8):683-690. DOI 10.1002/bies.1097.
- Unlü Y., Becit N., Ceviz M., Koçak H. Management of carotid body tumors and familial paragangliomas: review of 30 years' experience. *Ann. Vasc. Surg.* 2009;23(5):616-620. DOI 10.1016/j.avsg.2009.06.014.
- Van Allen E.M., Miao D., Schilling B., Shukla S.A., Blank C., Zimmer L., Sucker A., Hillen U., Foppen M.H.G., Goldinger S.M., Utikal J., Hassel J.C., Weide B., Kaehler K.C., Loquai C., Mohr P., Gutzmer R., Dummer R., Gabriel S., Wu C.J., Schadendorf D., Garraway L.A. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science.* 2015;350(6257):207-211. DOI 10.1126/science.aad0095.
- Wang C., Guo Z., Wu C., Li Y., Kang S. A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3' untranslated region of the *SET8* gene is associated with the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Genet.* 2012;205(7-8):373-376. DOI 10.1016/j.cancergen.2012.04.010.
- Wang Y., Che S., Cai G., He Y., Chen J., Xu W. Expression and prognostic significance of CTBP2 in human gliomas. *Oncol. Lett.* 2016;12(4):2429-2434. DOI 10.3892/ol.2016.4998.
- Wu S., Rice J.C. A new regulator of the cell cycle: the PR-Set7 histone methyltransferase. *Cell Cycle.* 2011;10(1):68-72. DOI 10.4161/cc.10.1.14363.
- Xu J., Yin Z., Gao W., Liu L., Yin Y., Liu P., Shu Y. Genetic variation in a microRNA-502 binding site in *SET8* gene confers clinical outcome of non-small cell lung cancer in a Chinese population. *PLoS One.* 2013;8(10):e77024. DOI 10.1371/journal.pone.0077024.
- Yang F., Sun L., Li Q., Han X., Lei L., Zhang H., Shang Y. SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* 2012;31(1):110-123. DOI 10.1038/emboj.2011.364.
- Yu C., Yu J., Yao X., Wu W.K., Lu Y., Tang S., Li X., Bao L., Li X., Hou Y., Wu R., Jian M., Chen R., Zhang F., Xu L., Fan F., He J., Liang Q., Wang H., Hu X., He M., Zhang X., Zheng H., Li Q., Wu H., Chen Y., Yang X., Zhu S., Xu X., Yang H., Wang J., Zhang X., Sung J.J., Li Y., Wang J. Discovery of biclonal origin and a novel oncogene *SLC12A5* in colon cancer by single-cell sequencing. *Cell Res.* 2014;24(6):701-712. DOI 10.1038/cr.2014.43.
- Yu N., Huangyang P., Yang X., Han X., Yan R., Jia H., Shang Y., Sun L. microRNA-7 suppresses the invasive potential of breast cancer cells and sensitizes cells to DNA damages by targeting histone methyltransferase SET8. *J. Biol. Chem.* 2013;288(27):19633-19642. DOI 10.1074/jbc.M113.475657.
- Yu Z., Li Z., Jolicoeur N., Zhang L., Fortin Y., Wang E., Wu M., Shen S.H. Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(13):4535-4541. DOI 10.1093/nar/gkm480.
- Zhang C., Gao C., Xu Y., Zhang Z. *CtBP2* could promote prostate cancer cell proliferation through c-Myc signaling. *Gene.* 2014;546(1):73-79. DOI 10.1016/j.gene.2014.05.032.
- Zhang J., Zhu J., Yang L., Guan C., Ni R., Wang Y., Ji L., Tian Y. Interaction with CCNH/CDK7 facilitates CtBP2 promoting esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) metastasis via upregulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) progression. *Tumour Biol.* 2015;36(9):6701-6714. DOI 10.1007/s13277-015-3354-x.
- Zhang Y., Cai Q., Shu X.O., Gao Y.T., Li C., Zheng W., Long J. Whole-exome sequencing identifies novel somatic mutations in Chinese breast cancer patients. *J. Mol. Genet. Med.* 2015;9(4):183. DOI 10.4172/1747-0862.1000183.
- Zhikrivetskaya S.O., Snezhkina A.V., Zaretsky A.R., Alekseev B.Y., Pokrovsky A.V., Golovyuk A.L., Melnikova N.V., Stepanov O.A., Kalinin D.V., Moskalev A.A., Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Kudryavtseva A.V. Molecular markers of paragangliomas/pheochromocytomas. *Oncotarget.* 2017;8(15):25756-25782. DOI 10.18632/oncotarget.15201.

ORCID ID

E.N. Lukyanova orcid.org/0000-0003-3566-5873
A.V. Snezhkina orcid.org/0000-0002-4421-4364
D.V. Kalinin orcid.org/0000-0001-6237-9481
A.V. Pokrovsky orcid.org/0000-0003-0366-3750
A.L. Golovyuk orcid.org/0000-0001-6830-7832
O.A. Stepanov orcid.org/0000-0001-6129-6499
E.A. Pudova orcid.org/0000-0002-5492-1361
G.S. Razmakhaev orcid.org/0000-0002-3979-8940
M.V. Orlova orcid.org/0000-0002-8213-4461
A.P. Polyakov orcid.org/0000-0003-2095-5931
M.V. Kiseleva orcid.org/0000-0001-8464-1726
A.D. Kaprin orcid.org/0000-0001-8784-8415
A.V. Kudryavtseva orcid.org/0000-0002-3722-8207

Analysis of *GH1*, *GHR* and *PRL* gene polymorphisms for estimation of the genetic diversity of Buryat and Altai cattle breeds

I.V. Lazebnaya¹, A.V. Perchun², B.B. Lhasaranov³, O.E. Lazebny⁴, Yu.A. Stolpovskiy¹

¹ Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

² Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia

³ Ltd Shuluuta, Buryatia, Ulan-Ude, Russia

⁴ Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS, Moscow, Russia

Small and unique Buryat and Altai cattle breeds of Turano-Mongolian origin are well adapted to harsh conditions of the continental climate to be their habitat. However, the population-genetic structure of the breeds has been poorly studied. This paper presents the results of analysis of polymorphisms *GH1* (AC_000176.1: BTA 19, exon 5, rs41923484, g.2141C>G, L127V), *GHR* (AC_000177.1: BTA 20, exon 10, rs109300983, g.257A>G, S555G) and *PRL* (AC_000180.1: BTA 23, exon 3, g.35108342A>G) in the samples of Buryat cattle breed of Russia, China and Mongolia, and indigenous Altai cattle breed (Russia) that belong to Turano-Mongolian cattle. The Russian sample of Buryat breed was differentiated from the Mongolian sample based on pairwise G -test and F_{ST} values for the *PRL-RsaI* polymorphism and from the Chinese sample – based on pairwise G -test values for the *GH1-AluI* polymorphism. All the three samples of Buryat breed clearly differed from the sample of Altai breed based on pairwise G -test and F_{ST} values for the *GHR-AluI* polymorphism as well as on the base of F_{ST} values for the joint polymorphism of the three genes. Nei's genetic distances calculated from the three gene polymorphisms also confirmed the difference between the two breeds. The results of AMOVA demonstrated that *GHR* gene variability (16 %) gave the largest contribution to the differentiation that was confirmed by F_{ST} values (0.12–0.27). The STRUCTURE software enabled us to reveal four clusters, with a specific ratio for each sample, in the Chinese and Mongolian samples of Buryat breed, and in the sample of Altai breed, while the Russian sample of Buryat breed had only three clusters. The differences within the breed level were determined based on the *GH1-AluI* and *PRL-RsaI* polymorphisms, while at the inter-breed level – based on the *GHR-AluI* polymorphism. Linkage disequilibrium analysis demonstrated significant linkage of the following pairs of genes in the Buryat breed: *GH1-GHR*, *GH1-PRL*, *GHR-PRL*.

Key words: *Bos taurus turano-mongolicus*; Buryat cattle; Altai cattle; population genetics; gene polymorphism; *GH1*; *PRL*; *GHR*.

Генетическая изменчивость бурятской и алтайской пород крупного рогатого скота, оцененная на основе анализа полиморфизма генов *GH1*, *GHR* и *PRL*

И.В. Лазебная¹, А.В. Перчун², Б.Б. Ахасаранов³, О.Е. Лазебный⁴, Ю.А. Столповский¹

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир, Россия

³ Общество с ограниченной ответственностью «Шулуута», Республика Бурятия, Улан-Удэ, Россия

⁴ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

Малочисленные уникальные бурятская и алтайская породы крупного рогатого скота турано-монгольского корня хорошо адаптированы к суровым условиям континентального климата региона обитания. Информация о популяционно-генетической структуре этих пород практически отсутствует. В настоящей работе выполнен анализ генетической изменчивости следующих генов-кандидатов: *GH1* (AC_000176.1: хромосома 19, экзон 5, rs41923484, g.2141C>G, L127V), *GHR* (AC_000177.1: хромосома 20, экзон 10, rs109300983, g.257A>G, S555G), *PRL* (AC_000180.1: хромосома 23, экзон 3, g.35108342A>G) в выборках бурятской породы из трех сопредельных государств – России, Китая и Монголии, а также аборигенной алтайской породы (Россия), относящихся в соответствии с происхождением к турано-монгольскому корню. Российская выборка бурятского скота дифференцируется от монгольской выборки этой породы на основе попарных значений G -теста и F_{ST} по изменчивости *RsaI*-локуса гена *PRL* и от китайской выборки – на основе значений G -теста для *AluI*-локуса гена *GH1*. При этом все выборки бурятского скота ведут себя согласованно в отношении алтайской породы, четко отличаясь от нее по данным G -теста и F_{ST} для локуса гена *GHR* и по значениям F_{ST} для комплекса локусов генов *PRL*, *GH1* и *GHR*. Генетические расстояния Нея на основе комплекса генов также отделяют бурятскую и алтайскую породу. Наибольший вклад в межпородную дифференциацию двух пород вносит изменчивость гена *GHR*, что зафиксировано в результатах AMOVA (16 %) и F_{ST} (0.12–0.27). Кластерный анализ, выполненный в программе STRUCTURE, выявил четыре кластера в алтайской породе крупного рогатого скота, китайской и монгольской выборках бурятского скота, которые представлены специфично в каждой выборке.

У российского бурятского скота отсутствует один кластер, его частота в других выборках достигает 15 %. Различия на внутривидовом уровне у бурятской породы определяют локусы генов *PRL* и *GHI*, на межпородном с алтайской породой – исследованный локус гена *GHR*, что отражает неодинаковый вклад разных локусов. Анализ на неравновесие по сцеплению генов доказал достоверное сцепление следующих пар генов у бурятской породы: *GHI-GHR*, *GHI-PRL*, *GHR-PRL*.

Ключевые слова: *Bos taurus turano-mongolicus*; бурятский крупный рогатый скот; алтайский крупный рогатый скот; популяционная генетика; полиморфизм генов; *GHI*; *PRL*; *GHR*.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lazebnaya I.V., Perchun A.V., Lhasaranov B.B., Lazebny O.E., Stolpovskiy Yu.A. Analysis of *GHI*, *GHR* and *PRL* gene polymorphisms for estimation of the genetic diversity of Buryat and Altai cattle breeds. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):734-741. DOI 10.18699/VJ18.417

As opposed to a majority of European breeds originated from European buffalo *Bos primigenius primigenius* (Hiendleder et al., 2008), Buryat and Altai cattle are of Eastern Asian origin, and based on craniological data and their horn structure, belong to *B. taurus turano-mongolicus* subspecies Kolesnik, 1936, which also includes Kirgiz, Yakutian, Siberian, Soyot, Mongolian, and Manchurian breeds (cited by: Kantanen et al., 2009).

As of today, Kalmykian and Yakutian cattle have been preserved in Russia, along with Buryat and Altai cattle. These breeds are well adapted to harsh conditions of the continental climate and specific habitat features and are characterized with high physical endurance, minimum human involvement in their management, year-round free grazing regime and abilities to maintain viability under low-caloric and deteriorating forage base in certain times of year, digest coarse forage and find it under the snow. These features are facilitated by physiological and morphological adaptations from specific features of digestive system structure and metabolism to developing longer and thicker fur in winter (Lazebnaya et al., 2010).

Lactation yield in Buryat and Altai cattle is not specifically high. According to M.N. Balkov (1962), milk yield in 114 cows in a 305-day lactation period, the number of calvings being four or above, was on average 911 kg with a fat percentage of 4.58. However, the simplicity and low cost of management for these breeds, as well as their high stability against diseases, make it possible to consider them not only unique, but irreplaceable for conventional breeding regions in terms of solving problems of providing environmentally healthy nourishment, preserving historical traditions of the local population, including technologies of making traditional dishes and clothing, and developing agro- and ecotourism. In addition, cattle breeds of such an ancient origin with aforementioned features are rare even on global scale, which makes it possible to consider them an important object for scientific investigation with an opportunity for finding possible uses for their genetic potential in present and future (Dmitriev, Ernest, 1989; Ukhanov et al., 1993; Moiseeva et al., 2006; Mwai et al., 2015; Shabtay, 2015).

Despite the facts above, the genetic features of breeds of Turano-Mongolian origin are rather understudied. Individual candidate genes are investigated in Yakutian and Kalmykian breeds, whose SNPs are associated in cattle with productivity attributes of selection value (Lazebnaya et al., 2010, 2013; Gorlov et al., 2014). Polylocus (ISSR) and monolocus (SSR) DNA markers were used to study a variety of breeds, including Yakutian, Kalmykian, and Mongolian ones (Tapio et al., 2010; Stolpovsky et al., 2011). Whole genome SNP-analysis has been performed recently for a series of Russian breeds, which also included Buryat breed, to investigate their origin, phylogeny, and differentiation (Yurchenko et al., 2017).

Diversity in somatotrophic axis genes, which are candidate genes to be associated with milk and meat yield traits, is well researched in individual commercial cattle breeds. Correlation is established between gene polymorphism in growth hormone (*GHI*), its receptor (*GHR*), and prolactin (*PRL*) and growth and development, weight gain rate, meat quality, and protein and fat content in milk (Mitra et al., 1995; Chung et al., 1996; Chrenek et al., 1999; Dybus et al., 2004; Di Stasio et al., 2005). The best-known SNPs for the listed genes are as follows: the ones of *GHI* *AluI* (L127V, exon 5) (Dybus et al., 2004) and *GHR* *AluI* genes (AF140284: g.257A > G, exon 10, Ser/Gly) (Di Stasio et al., 2005), and the ones of *PRL* *RsaI* gene (A > G, 103 codon, exon 3) (Mitra et al., 1995). Comparative data on the diversity of the listed genes in Buryat and Altai cattle are not available.

The objective of the presented study was to assess the genetic structure in samples from two breeds of Turano-Mongolian origin, specifically Buryat breed from the neighboring territories of China, Mongolia, and Russia to discover diversity patterns within the same breed, and indigenous Russian Altai cattle based on polymorphism analysis for *PRL*, *GHI*, and *GHR* genes.

Materials and methods

Buryat cattle blood samples from three neighboring states, specifically Russia (Ltd. Shuluuta, Buryatia, *n* = 51), Northern Mongolia (Hubsugul aimak, *n* = 25), and China

(Inner Mongolia, $n = 13$), were studied, along with Altai cattle blood from Russia (Yazula rural area, Ulagan district, Altai Republic, $n = 21$).

Polymorphism in *AluI* of *GH1* (AC_000176.1: chromosome 19, exon 5, rs41923484, g.2141C > G, L127V) (Dybus et al., 2004) and *GHR* genes (AC_000177.1: chromosome 20, exon 10, rs109300983, g.257A > G, S555G) (Di Stasio et al., 2005) and *RsaI* of *PRL* gene (AC_000180.1: chromosome 23, exon 3, g.35108342 A > G) (Lewin et al., 1992) in cattle was analyzed using PCR RFLP with the following reagent kits: DIAtom™ DNA Prep (IsoGene Lab., Moscow, Russia) for isolating DNA from whole blood, GenPak^R PCR Core (IsoGene Lab., Moscow, Russia) for amplification of the analyzed gene segments, restriction endonuclease provided by Thermo Fisher Scientific (USA): *AluI* for *GH1* and *GHR* genes and *RsaI* for *PRL* gene (Mitra et al., 1995; Dybus et al., 2004; Di Stasio et al., 2005; Hradecka et al., 2008).

The data were statistically processed using the GenAlEx 6.503 ([http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download_files/GenAlEx %206.503 %20Download.zip](http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download_files/GenAlEx%206.503%20Download.zip)), and STRUCTURE 2.3.4. software (https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure_software/release_versions/v2.3.4/html/structure.html). Benjamini–Hochberg multiple comparison correction was introduced (Benjamini, Hochberg, 1995) to estimate the confidence of $p_{F_{ST}}$, $p_{G_{ST}}$, and p_{χ^2} values. Gene linkage was assessed using linkage (D) and correlation (r) coefficients. The confidence of linkage disequilibrium was estimated by the χ^2 test using the Benjamini–Hochberg multiple comparison correction. Cluster analysis of genetic structure based on the complex of studied genes was performed using the STRUCTURE 2.3.4 software. Here, the basic set of models was analyzed with genetic admixture and allele frequency correlation both taken and not taken into account.

Models were analyzed in two modes, i. e. LOCPRIOR and without considering the general matrix division into studied samples. Nine hypotheses on population structure were tested within each model with K varying from 1 to 9. For each K , the simulation was repeated 10 times to collect the required statistical data on likelihood function logarithm values and its average variance. The quantity of possible populations was tested by 1 000 000 burn-in iterations with the first 100 000 iterations being discarded.

Results

Allele frequency distributions for the studied *GH1*, *GHR*, and *PRL* gene loci are presented in Table 1, along with chi-square test results with probability values for each of three candidate genes studied in the cattle samples of Buryat and Altai breeds considered. According to Table 1, allele frequency L of *GH1* gene prevails in all samples and varies within the range of 0.654 in Buryat breed from China and up to 0.863 in the Russian sample of the breed. Allele A of *PRL* gene is also represented with high frequency in all samples of both breeds, frequency interval is 0.620 for Buryat breed from Mongolia and up to 0.814 in Buryat breed from Russia. Allele frequency distribution for

Table 1. Allele frequencies of *GH1*, *GHR* and *PRL* genes and HWE for Buryat and Altai cattle breeds

Gene	Allele	Altai, $n = 21$	Buryat (China), $n = 13$	Buryat (Mongolia), $n = 25$	Buryat (Russia), $n = 51$
<i>GH1</i>	L	0.857	0.654	0.800	0.863
	V	0.143	0.346	0.200	0.137
	χ^2	0.583	0.294	0.000	1.510
	p	0.445	0.588	1.000	0.219
<i>GHR</i>	A	0.881	0.577	0.380	0.441
	G	0.119	0.423	0.620	0.559
	χ^2	0.383	0.138	1.868	3.047
	p	0.536	0.710	0.172	0.081
<i>PRL</i>	A	0.690	0.731	0.620	0.814
	B	0.310	0.269	0.380	0.186
	χ^2	1.018	0.007	0.110	0.045
	p	0.313	0.935	0.741	0.831

Notes: n – number sampled, χ^2 – chi-square criterion, p – probability.

GHR gene differs from the ones described above for *GH1* and *PRL* genes, i. e. allele frequency A , 0.88, prevails in the Altai breed sample and allele frequencies G , 0.62 and 0.559, in Buryat breed samples from Mongolia and Russia respectively. It should be noted that the genotype frequency distribution observed showed no deviation from the one expected based on Hardy–Weinberg equilibrium for all *GH1*, *GHR*, and *PRL* gene loci in all samples.

Pairwise G -test values for the studied samples with the corresponding probability values are presented in Table 2. According to the Benjamini–Hochberg multiple comparison correction, probability values that fit condition $p < 0.025$ are significant. According to Table 2, differences between the Russian breed sample and Chinese and Mongolian samples were discovered in *AluI* locus of *GH1* gene and *RsaI* locus of *PRL* gene, respectively. The difference between the Altai breed and Buryat breed samples was found in *AluI* locus of *GHR* gene regardless of origin.

Differentiation between the considered Buryat and Altai cattle breed samples was estimated using pairwise values of Wright’s fixation index (F_{ST}) for individual genes and their complexes (Table 3). Confident F_{ST} values given the Benjamini–Hochberg multiple comparison correction ($p < 0.025$) were identified by the considered *GHR* gene locus for Altai breed sample paired with Buryat breed samples from China ($F_{ST} = 0.117$), Mongolia ($F_{ST} = 0.269$), and Russia ($F_{ST} = 0.216$). This regularity stands for this parameter in case of gene complexes as well. In addition, Russian Buryat breed sample is differentiated from the Mongolian sample ($F_{ST} = 0.046$) by the studied *PRL* gene locus.

The analysis of Table 3 also shows that significant

Table 2. The pairwise G-test and corresponding probability values for each genetic marker

Cattle breed (Region)	Altai (Russia)	Buryat (China)	Buryat (Mongolia)	Buryat (Russia)
<i>GH1</i> gene				
Altai (Russia)		0.052	0.469	1.000
Buryat (China)	3.769		0.169	0.020
Buryat (Mongolia)	0.525	1.893		0.326
Buryat (Russia)	0.000	5.424	0.964	
<i>GHR</i> gene				
Altai (Russia)		0.004	0.000	0.000
Buryat (China)	8.113		0.101	0.216
Buryat (Mongolia)	26.088	2.682		0.472
Buryat (Russia)	26.191	1.533	0.518	
<i>PRL</i> gene				
Altai (Russia)		0.722	0.479	0.114
Buryat (China)	0.126		0.329	0.360
Buryat (Mongolia)	0.502	0.952		0.011
Buryat (Russia)	2.505	0.836	6.465	

Notes: pairwise G-test values for the considered samples are given below the diagonal, the corresponding probability values are above the diagonal.

Table 3. Pairwise genetic differentiation of Buryat and Altai breed samples on the basis of Wright's F-statistics (F_{ST}) and corresponding probability values given separately for the studied loci of *GH1*, *GHR* and *PRL* genes and for a complex of the genes

Cattle breed (Region)	Altai (Russia)	Buryat (China)	Buryat (Mongolia)	Buryat (Russia)
<i>GH1</i> gene				
Altai (Russia)		0.085	0.576	1.000
Buryat (China)	0.056		0.292	0.051
Buryat (Mongolia)	0.006	0.027		0.393
Buryat (Russia)	0.000	0.060	0.007	
<i>GHR</i> gene				
Altai (Russia)		0.011	0.001	0.001
Buryat (China)	0.117		0.123	0.312
Buryat (Mongolia)	0.269	0.039		0.493
Buryat (Russia)	0.216	0.018	0.004	
<i>PRL</i> gene				
Altai (Russia)		0.790	0.544	0.148
Buryat (China)	0.002		0.449	0.427
Buryat (Mongolia)	0.005	0.014		0.024
Buryat (Russia)	0.020	0.010	0.046	
<i>GH1</i> , <i>GHR</i> , and <i>PRL</i> genes				
Altai (Russia)		0.011	0.001	0.001
Buryat (China)	0.058		0.130	0.118
Buryat (Mongolia)	0.108	0.027		0.075
Buryat (Russia)	0.098	0.028	0.019	

Notes: the pairwise values of the F_{ST} coefficient are given below the diagonal, the corresponding probability values are above the diagonal.

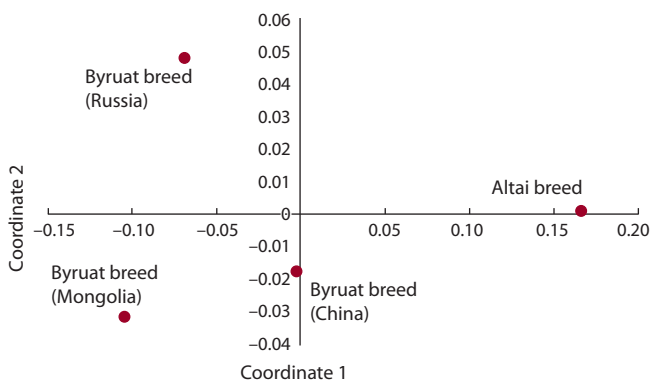


Fig. 1. Principal coordinates analysis (PCoA) of pairwise Nei's genetic distances (Nei, 1978) from the three polymorphisms typed in four samples.

differentiation of Altai breed from Buryat breed samples from various regions is primarily determined by *GHR* gene diversity, which is further confirmed by AMOVA results. Thus, diversity between populations by three genes studied was rather high at 8 %, however for *GHR* gene it was 16 % and for *GH1* and *PRL* genes – 2 %. Ordination of the studied samples in the first two principal coordinates based on pairwise Nei's genetic distance (Nei, 1978) for the gene complex is shown in Fig. 1.

The amount of diversity in the first principal component is 92.33 %, and in the second – 7.67 %. All the studied samples of both breeds are differentiated from each other. The distance from Altai breed to Buryat breeds by samples increases as follows: China, Russia, and Mongolia. Here, the calculations show that average pairwise Nei's genetic distance inside the group formed by Buryat breed samples from various regions ($D_{\text{Nei}} = 0.071$) is over three times as small as average pairwise Nei's genetic distance between Altai breed and each Buryat breed sample from China, Mongolia, and Russia ($D_{\text{Nei}} = 0.222$).

Cluster analysis of genetic structure on the dataset, including the complex genotypes of *GH1*, *GHR*, and *PRL* genes in the Buryat breed samples from three regions, and Altai breed from Russia, was performed using the STRUCTURE software. After various models had been tested taking posterior probability into account, a model with genetic material admixture but with no allele frequency correlation was selected. Based on average likelihood function logarithm values and variances of its estimates obtained in 10 simulation runs with a specified set of respective parameters, the optimum number of clusters (K) turned out to be four.

It follows from Fig. 2 and Table 4 that each sample has its own cluster distribution. Most samples show all types of clusters, apart from Buryat breed from Russia, in which one cluster shown in blue in Fig. 2 and present in Table 4 under no. 3 is lacking, whereas its frequency in other samples does not exceed 0.154. In Buryat cattle from China, the presence of cluster 2 shown in green is

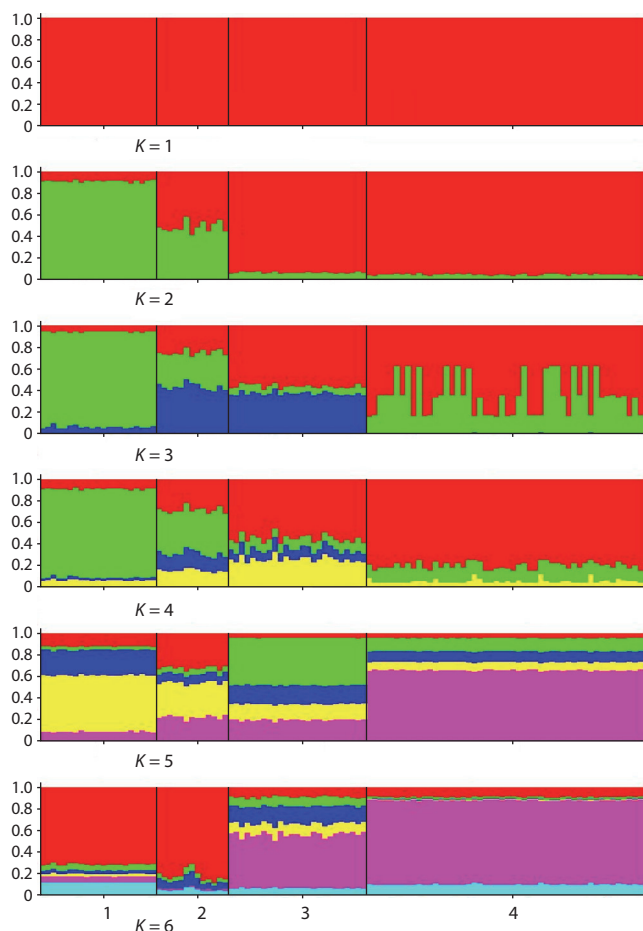


Fig. 2. Bayesian genotypic cluster analysis of the four samples in Buryat and Altai breeds based on the three polymorphisms (*GH1*, *GHR*, and *PRL*) at various values of K .

X-axis: 1 – Altai cattle breed, 2 – Buryat cattle breed from China, 3 – Buryat cattle breed from Mongolia, 4 – Buryat cattle breed from Russia; each cluster designated with particular color (description in the text).

high at 0.403, and it is only higher in Altai breed, in which it is vastly prevailing (0.820). Buryat breed sample from China is characterized by the most uniform distribution of various clusters. Buryat and Altai breeds from Russia show the significant prevalence of one cluster, namely clusters 1 and 2 (see Table 4) highlighted in red (0.800) and green respectively.

GH1, *GHR*, and *PRL* genes in *B. taurus* specimens are localized on different chromosomes, 19, 20, and 23, respectively, however linkages between individual loci remain a possibility. The performed analysis of pairwise linkage in studied loci of three genes in accordance with Benjamini–Hochberg correction showed confident probability values ($p < 0.025$) for loci of the following gene pairs: *GH1*–*GHR* in Buryat breed from Russia ($D = 0.051$, $r = 0.297$, $p = 0.003$) and Mongolia ($D = 0.076$, $r = 0.391$, $p = 0.006$), *GH1*–*PRL* genes in all Buryat breed sample pairs ($D = 0.033$ – 0.099 , $r = 0.248$ – 0.470 , $p = 0.012$ – 0.020), and

Table 4. Percentage of the clusters identified in samples of Altai and Buryat cattle breeds

Cattle breed (Region)	Sample volume	Cluster			
		1	2	3	4
Altai	21	0.088	0.820	0.025	0.067
Buryat (China)	13	0.286	0.403	0.154	0.157
Buryat (Mongolia)	25	0.551	0.093	0.095	0.260
Buryat (Russia)	51	0.800	0.139	0.000	0.061

GHR-PRL genes in Buryat breed from Russia ($D = 0.063$, $r = 0.324$, $p = 0.001$). Complex genotypes based on two and three genes for samples, in which disequilibrium gene linkage is established, are presented in Table 5. According to the provided complex genotype frequencies for *GH1-PRL* genes, the linkage between *L*-allele of *GH1* gene with *A*-allele of *PRL* gene may be assumed in all Buryat breed samples. In addition, according to maximum complex genotype frequencies for *GH1-GHR* genes, *L*-allele of *GH1* gene is also linked to *A*- and *G*-alleles of *GHR* gene in Buryat breeds from Russia and Mongolia. These regularities are also reflected in high complex genotype frequencies for three genes, in which *L*-allele of *GH1* gene, *A*- and *G*-alleles of *GHR* gene, and *A*-allele of *PRL* gene are present in Russian Buryat breed sample.

Discussion

Samples of two breeds of Turano-Mongolian origin, i. e. Buryat breed from China, Mongolia, and Russia and Altai breed from Russia have been compared for the first time in the present paper. In none of these samples the observed genotype frequency distribution deviates from the one expected based on Hardy–Weinberg equilibrium. Russian Buryat breed sample is differentiated from the Mongolian sample of the same breed based on pairwise G -test and F_{ST} values regarding diversity in *RsaI* locus of *PRL* gene and from Chinese sample – based on G -test values for *AluI* locus of *GH1* gene. Here, all Buryat breed samples match in their behavior with respect to Altai breed, i. e. they clearly differ from it based on G -test and F_{ST} data for *GHR* gene locus and F_{ST} values for locus complexes of *PRL*, *GH1*, and *GHR* genes. Nei's genetic distances based on gene complexes also isolate the group of Buryat breed samples from Altai breed, which is indicated by the relationship between average pairwise Nei's genetic distance inside the Buryat breed group and average pairwise Nei's genetic distance for Buryat breed samples from China, Mongolia, and Russia and Altai breed. The largest contribution to differentiation between the two breeds is given by *GHR* gene diversity, which is reflected by AMOVA (16 %) and F_{ST} results (0.12–0.27).

Differences in the genetic structure of studied samples were demonstrated by cluster analysis performed using the STRUCTURE software. Four clusters identified in Altai

Table 5. Complex genotypes of *GH1*, *GHR* and *PRL* genes with linkage disequilibrium in Buryat cattle breed

<i>GH1-PRL</i>	<i>q</i>	<i>GH1-GHR</i>	<i>q</i>	<i>GH1-GHR-PRL</i>	<i>q</i>
China		Mongolia		Russia	
LL-AA	0.308	LL-AA	0.080	LL-AA-AA	0.196
LL-AB	0.154	LL-AG	0.400	LL-AA-AB	0.039
LV-AA	0.154	LL-GG	0.160	LL-AG-AA	0.176
LV-AB	0.231	LV-AG	0.200	LL-AG-AB	0.039
VV-AA	0.077	LV-GG	0.120	LL-GG-AA	0.176
VV-BB	0.077	VV-GG	0.040	LL-GG-AB	0.118
Russia		Russia		LL-GG-BB	0.020
LL-AA	0.549	LL-AA	0.235	LV-AA-AA	0.020
LL-AB	0.196	LL-AG	0.216	LV-AG-AA	0.098
LL-BB	0.020	LL-GG	0.314	LV-AG-AB	0.059
LV-AA	0.118	LV-AA	0.020	LV-GG-BB	0.020
LV-AB	0.059	LV-AG	0.157	VV-GG-AB	0.039
LV-BB	0.020	LV-GG	0.020		
VV-AB	0.039	VV-GG	0.039		
Mongolia					
LL-AA	0.280				
LL-AB	0.320				
LL-BB	0.040				
LV-AA	0.120				
LV-AB	0.120				
LV-BB	0.080				
VV-BB	0.040				

Note. q is the frequency of the complex genotype.

breed, as well as Chinese and Mongolian Buryat breed samples are present in a specific fashion in each sample. However, one cluster with relatively low frequencies in other samples is lacking in Russian Buryat breed. Presence of the same clusters in Buryat and Altai breeds may indicate the unity of origin expressed by belonging to Turano-Mongolian root breed, however their lengthy independent existence affected their genetic structure in the form of prevalence of one of clusters in Altai breed sample. In addition, differentiation within the breed may be observed in Buryat cattle. Note that differences within the breed in Buryat cattle are determined by *PRL* and *GH1* gene loci and differences from Altai breed by the studied *GHR* gene locus, which reflects unequal contributions of various loci to differentiation depending on the level of

comparison. To clarify whether the identified diversity pattern is maintained, when the dataset is expanded, larger-scale research needs to be carried out. However, the results obtained show the necessity of taking diversity in subpopulations into account, while preserving small breeds.

Disequilibrium linkage analysis of the genes considered performed in the paper confidently showed its presence for the following gene pairs in Buryat breed: *GHI-GHR*, *GHI-PRL*, *GHR-PRL*. The use of primarily the same servicing bulls could be considered a possible explanation for the discovered similarity in disequilibrium linkage between alleles of the mentioned genes in all studied cattle samples, however our samples represent independent herds, which makes their mixing impossible. Thus, the discovered similarity in disequilibrium linkage between alleles of the mentioned genes is most likely to result from direct or indirect natural and-or artificial selection. Disequilibrium linkage of *GHI* and *PRL* genes with *GHR* gene does not contradict with the available data on possible competition between prolactin and growth hormone genes for linkage with the latter's receptor (Inoue et al., 2001).

Maintaining genetic diversity and preventing inbreeding are especially important for small indigenous breeds in a critical state. Allele variety of genes subjected to strong selection pressure in commercial breeds may lead to significant allele frequency deviation in one direction or another up to their fixation, which may have a negative effect on their viability under changing climatic and agrobiocenotic conditions. Moreover, genetic potential of indigenous breeds well adapted to harsh ecological and geographical conditions, which also preserve stability against diseases most common for their habitat, may be desired in both conventional livestock breeding and developing new breeds. Given the fact that artificial insemination is rarely practiced in free grazing breeds, it is necessary to develop *in situ* and *ex situ* preservation strategies taking into account DNA marker monitoring. The data obtained are the first population-genetic characteristics of Buryat and Altai breeds based on candidate gene diversity.

Acknowledgements

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-54-44060) and state assignment no. 0112-2014-003 "Livestock Gene Pool Research".

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Balkov M.N. Buryat Cattle: Origin and Ways of Improvement. Ulan-Ude: Buryat Publ. House, 1962. (in Russian)
Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B. Stat. Methodol.* 1995;57(1):289-300.

- Chrenek P., Huba J., Oravcova M., Hetenyi L., Peskovicova D., Bulla J. Genotypes of *bGH* and *bPRL* genes in relationships to milk production. *Proc. of the 50th Annual Meeting of the EAAP: Book of Abstracts.* Zurich, 1999;40.
Chung E.R., Rhim T.J., Han S.K. Associations between PCR-RFLP markers of growth hormone and prolactin genes and production traits in dairy cattle. *Korean J. Anim. Sci.* 1996;38:321-336.
Di Stasio L., Destefanis G., Brugiapaglia A., Albera A., Rolando A. Polymorphism of the *GHR* gene in cattle and relationships with meat production and quality. *Anim. Genet.* 2005;36(2):138-140. DOI 10.1111/j.1365-2052.2005.01244.x.
Dmitriev N.G., Ernest L.K. Animal genetic resources of the USSR (No. FAO APHP 65). FAO, Roma (Italia), 1989.
Dybus A., Grzesiak W., Szatkowska I., Blaszczyk P. Association between the growth hormone combined genotypes and dairy traits in Polish Black-and-White cows. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2004;22(2):185-194.
Gorlov I.F., Fedyunin A.A., Randelin D.A., Sulimova G.E. Polymorphisms of *bGH*, *RORC*, and *DGAT1* genes in Russian beef cattle breeds. *Russ. J. Genet.* 2014;50(12):1302-1307.
Hiendleder S., Lewalski H., Janke A. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. *Cytogenet. Genome Res.* 2008;120(1-2):150-156. DOI 10.1159/000118756.
Hradecka E., Citek J., Panicke L., Rehout V., Hanusova L. The relation of *GH*, *GHR* and *DGAT1* polymorphisms with estimated breeding values for milk production traits of German Holstein sires. *Czech J. Anim. Sci.* 2008;53(6):238-245.
Inoue K., Goda H., Mogi C., Tomida M., Tsurugano S. The Role of Glucocorticoids and Retinoic Acid in the Pituitary Endocrine Cell Differentiation. In: *Neuroplasticity, Development, and Steroid Hormone Action.* CRC Press, 2001;73.
Kantanen J., Edwards C.J., Bradley D.G., Viinalass H., Thessler S., Ivanova Z., Kiselyova T., Cinkulov M., Popov R., Stojanović S., Ammosov I., Vilkkilä J. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity.* 2009;103(5):404-415. DOI 10.1038/hdy.2009.68.
Lazebnaya I.V., Lazebny O.E., Khatami S.R., Sulimova G.E. Use of the Bovine Prolactin Gene (*bPRL*) for Estimating Genetic Variation and Milk Production in Aboriginal Russian Breeds of *Bos taurus* L. In: Nagy G.M. (Ed.). *Prolactin.* Intech, 2013. DOI 10.5772/54756. Available at: <https://www.intechopen.com/books/prolactin/use-of-the-bovine-prolactin-gene-bprl-for-estimating-genetic-variation-and-milk-production-in-aboriginal-russian-breeds-of-bos-taurus-l>
Lazebnaya I.V., Lazebny O.E., Sulimova G.E. Study of genetic variation in Yakutian cattle (*Bos taurus* L.) using the prolactin *bPRL*, growth hormone *bGH*, and transcription factor *bPit-1*. *Russ. J. Genet.* 2010;46(3):377-380.
Lewin H.A., Schmitt K., Hubert R., van Eijk M.J., Arnheim N. Close linkage between bovine prolactin and *BoLA-DRB3* genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing. *Genomics.* 1992;13(1):44-48. DOI 10.1016/0888-7543(92)90200-C.
Mitra A., Schlee P., Balakrishnan C.R., Pirchner F. Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. *J. Anim. Breed. Genet.* 1995;112:71-74.
Moiseeva I.G., Ukhonov S.V., Stolpovsky Yu.A., Sulimova G.E., Kashtanov S.N. The Gene Pool of Farm Animals: The Genetic Resources of Livestock in Russia. (Ed. I.A. Zakharov). Moscow: Nauka Publ., 2006. (in Russian)
Mwai O., Hanotte O., Kwon Y.J., Cho S. African indigenous cattle: unique genetic resources in a rapidly changing world. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2015;28(7):911-921. DOI 10.5713/ajas.15.0002R.

- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978;89(3):583-590.
- Shabtay A. Adaptive traits of indigenous cattle breeds: The Mediterranean Baladi as a case study. *Meat Sci*. 2015;109:27-39. DOI 10.1016/j.meatsci.2015.05.014.
- Stolpovsky Yu.A., Ahani A.M., Evsukov A.N., Kol N.V., Ruzina M.N., Voronkova V.N., Sulimova G.E. Comparison of ISSR polymorphism among cattle breeds. *Russ. J. Genet*. 2011;47(2):189-200.
- Tapio L., Tapio M., Li M.H., Popov R., Ivanova Z., Kantanen J. Estimation of relatedness among non-pedigreed Yakutian cryobank bulls using molecular data: implications for conservation and breed management. *Genet. Sel. Evol.* 2010;42(1):28. DOI 10.1186/1297-9686-42-28.
- Ukhanov S.V., Stolpovsky Yu.A., Bannikova L.V., Zubareva L.A., Ivanova Z.I., Verdiev Z.K. *Cattle Genetic Resources: Rare and Endangered Native Breeds* (Ed. I.A. Zakharov). Moscow: Nauka Publ., 1993. (in Russian)
- Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemyashov K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity*. 2017; 120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3.

ORCID ID

I.V. Lazebnaya orcid.org/0000-0001-7548-3615

A.V. Perchun orcid.org/0000-0003-4807-4335

B.B. Lhasaranov orcid.org/0000-0001-8699-5106

O.E. Lazebny orcid.org/0000-0003-3136-0415

Yu.A. Stolpovskiy orcid.org/0000-0003-2537-1900

Evaluation of current gene pool of Kholmogor and Black-and-white cattle breeds based on whole genome SNP analysis

A.V. Dotsev¹, A.A. Sermiyagin¹, A.V. Shakhin¹, I.A. Paronyan², K.V. Plemyashov², H. Reyer³, K. Wimmers³, G. Brem^{1, 4}, N.A. Zinovieva¹

¹ L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Moscow Region, Podolsk, Russia

² Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Subsidiary of L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, St. Petersburg, Pushkin, Russia

³ Institute of Genome Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Dummerstorf, Germany

⁴ Institute of Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

Conservation of local cattle genetic resources is an important strategy for achieving Russia's food security. During last decades, in the Russian Federation, local livestock populations were either crossbred or replaced by highly productive imported breeds, which led to a loss of the major part of original breeds identities. The objective of our study was to identify genetic differences between the populations of Kholmogor and Black-and-white cattle with varying degrees of admixture with the Holstein breed. The aforementioned breeds were studied using their whole-genome single nucleotide polymorphism (SNP) genotypes. The Kholmogor breed was subdivided into three groups: purebred (KHLM, $n = 3$), admixed with Holsteins (KHLM-HLST, $n = 4$) and representatives of old-type breed (KHLM-INTA, $n = 15$). Black-and-white was subdivided into four groups: purebred (BLWT, $n = 9$), with a low (BLWT-75, $n = 8$) and a high (BLWT-HLST, $n = 10$) level of admixture with Holstein, and represented by archival samples from the 1970s and 1980s (BLWT-OLD, $n = 15$). The Holsteins genetic profiles (HLST, $n = 27$) were taken as a comparison group. PLINK 1.07, Admixture 1.3, SplitsTree 4.14.6 and R package StAMPP were used to infer genetic relationship between the studied groups. After quality control, 29 688 SNPs were selected for analysis. Multidimensional scaling (MDS), Admixture analysis and a dendrogram constructed using the Neighbor-Net method, revealed the presence of three clusters belonging to the Kholmogor, Black-and-white and Holstein breeds. The first one included KHLM and KHLM-INTA, the second – BLWT and BLWT-OLD, and the third – HLST, KHLM-HLST and BLWT-HLST. The BLWT-75 samples were placed between HLST and BLWT. Thus, our results showed that currently the populations of native cattle breeds with valuable genotypes still exist. The populations with a high level of admixture with Holsteins could be considered neither as the Kholmogor nor as Black-and-white breeds, and would rather be referred as the Holstein breed of local breeding.

Key words: cattle; SNP; markers; whole-genome analysis; genetic resources conservation.

Оценка современного состояния генофонда холмогорской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота на основе полногеномного SNP-анализа

А.В. Доцев¹, А.А. Сермягин¹, А.В. Шахин¹, И.А. Паронян², К.В. Племяшов², Х. Рейер³, К. Виммерс³, Г. Брем^{1, 4}, Н.А. Зиновьева¹

¹ Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Московская область, Подольск, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

³ Институт геномной биологии Института биологии домашних животных Лейбница, Думмерсторф, Германия

⁴ Институт животноводства и генетики ветеринарно-медицинского университета, Вена, Австрия

Сохранение генофонда отечественных пород крупного рогатого скота является важной задачей для обеспечения продовольственной безопасности населения. В последние годы в Российской Федерации местные популяции скота либо замещаются высокопродуктивными импортными породами, либо происходит их метизация, в результате которой от исходной породы остается лишь незначительная часть генов. Целью нашей работы было выявление генетических различий между популяциями холмогорского и черно-пестрого скота с разной степенью кровности по голштинской породе. Нами выполнен анализ полногеномных SNP-профилей (SNP – однонуклеотидный полиморфизм) животных вышеуказанных пород. Холмогорская была подразделена на три группы: чистопородные (KHLM, $n = 3$), голштинизированные (KHLM-HLST, $n = 4$) и представители старого типа (KHLM-INTA, $n = 15$); черно-пестрая – на четыре группы: чистопородные (BLWT, $n = 9$), с долей кровности голштинского скота от 6 до 25 % (BLWT-75, $n = 8$), от 80 до 99 % (BLWT-HLST, $n = 10$) и представленные архивными образцами 1970–1980-х гг. (BLWT-OLD, $n = 15$). В качестве группы сравнения были использованы животные голштинской породы (HLST, $n = 27$). Обработку данных и расчеты проводили в программах PLINK 1.07, Admixture 1.3, SplitsTree 4.14.6 и R пакет StAMPP. После проведения контроля качества для анализа были отобраны 29 688 SNP. Многомерное шкалирование (MDS), кластерный анализ и дендрограмма, построенная по методу «сеть соседей» (Neighbor-Net), выявили наличие трех кластеров, отно-

сящихся к холмогорской, черно-пестрой и голштинской породам. В первый попали KHLM и KHLM-INTA, во второй – BLWT и BLWT-OLD, в третий – HLST, KHLM-HLST и BLWT-HLST. Образцы, относящиеся к группе BLWT-75, заняли промежуточное положение между HLST и BLWT. Таким образом, наши результаты показали, что в настоящее время сохранились популяции с уникальными генотипами отечественных пород, которые необходимо сохранять. Популяции животных, голштинизированные на 80 % и более, нельзя рассматривать в качестве холмогорской и черно-пестрой пород, правильнее их относить к голштинской породе отечественной селекции.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; однонуклеотидный полиморфизм; маркеры; полногеномный анализ; сохранение генофонда.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Dotsev A.V., Sermiyagin A.A., Shakhin A.V., Paronyan I.A., Plemyashov K.V., Reyer H., Wimmers K., Brem G., Zinovieva N.A. Evaluation of current gene pool of Kholmogor and Black-and-white cattle breeds based on whole genome SNP analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):742-747. DOI 10.18699/VJ18.418

For centuries, groups of cattle well adapted to local environmental and climatic conditions have been forming in various regions around the world. Artificial and natural selection led to fixation of traits meeting the economic needs of people, while making animals better adapted to the environmental conditions. Conservation of these genetic resources is a basis for effective livestock breeding in the future, since the availability of a rich gene pool may be used for deriving new breeds and improving the already existing ones.

There is a series of valuable breeds in the Russian Federation, which combine high productivity, adaptiveness to local climatic conditions, resistance to various diseases, and simplicity of handling. In particular, these include the Kholmogor and Black-and-white breeds.

The Kholmogor breed was established in late 17th century in Kholmogor District of Arkhangelsk Oblast due to favorable feeding conditions and selection of the best individuals for breeding. Following the decree by Peter the Great, several dozens of animals of Dutch breed were imported after 1725 to improve the Kholmogor breed. Cattle import from Holland, Holstein, and England continued from 1765 to 1898 (Ernst et al., 1977). Special breeding efforts to improve the breed were also undertaken in the 1920s (Kuznetsov, 2016). The studbook of Kholmogor breed was issued in 1927 and 1934 saw the establishment of the state breeding center. To improve the breeding stock, Holstein bulls were introduced in the 1980s (Dmitriev, Paronyan, 1994).

The Black-and-white breed was established in the USSR in the 1930–1940s by crossing local breeds with the Dutch ones and was consolidated in 1959. Breeding bulls imported from Germany, Holland, Estonia, Lithuania, and Sweden were a major influence on breed formation. Since the consolidation of the breed occurred on a large territory with local cattle involved, five populations were distinguished for the following regions: Central (middle-Russian), Baltic, Ural, Siberian, other regions of the USSR (Ukraine, Belarus, Central Asia, and Transcaucasia) (Dmitriev, 1978; Kuznetsov, 2016). High milk yield and

good adaptive capacities have made the Black-and-white one of the widest spread in the country (Ernst et al., 1977). Along with other breeds, the cattle have been subjected to large-scale admixture with Holstein breed since the 1980s.

Genetic research is a critical step in preserving the gene pool of farm animals' breeds. Simultaneous analysis of several tens of thousands single nucleotide polymorphisms (SNPs) distributed throughout the whole genome currently appears to be the best suited method for this research (Decker et al., 2009; Kuehn et al., 2011; McTavish et al., 2013). The studies on genetic variety and population structure of Russian cattle breeds performed using genome-wide SNP scanning showed uniqueness of their allele pool (Zinovieva et al., 2016; Sermiyagin et al., 2018; Yurchenko et al., 2018).

The objective of the present study was to identify genetic differences between the Kholmogor and Black-and-white cattle breed populations having varying degrees of admixture with the Holstein breed.

Material and methods

Cattle biological material samples (sperm and blood) from the Kholmogor, Black-and-white and Holstein breeds were studied. The Kholmogor breed individuals were divided into three groups: purebred bulls (KHLM, $n = 3$), bulls admixed with Holsteins (KHLM-HLST, $n = 4$), with the degree of admixture with original breed varying from 1 to 20 %, and representatives of old-type breed from the "Inta" breeding farm from Komi Republic (KHLM-INTA, $n = 15$). Black-and-white breed individuals were divided into four groups: purebred bulls (BLWT, $n = 9$), bulls with degrees of admixture with Holsteins varying from 6 to 25 % (BLWT-75, $n = 8$) and from 80 to 99 % (BLWT-HLST, $n = 10$), and represented by archival samples from the 1970–1980s (BLWT-OLD, $n = 15$). The Holstein breed specimens were used as a reference group (HLST, $n = 27$).

Genomic DNA was isolated using the Nexttec columns (Nexttec Biotechnology GmbH, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. Genome-wide SNP screening was performed using Bovine SNP50 BeadChip (Illumina Inc., USA) and the GGP HD150K

chips (Neogene/GeneSeek, USA). To carry out all the analyses, common loci for these chips were used, which were genotyped in at least 90 % of individuals with minor allele frequencies of at least 5 % and fulfilling the Hardy–Weinberg equilibrium ($p > 1e-6$). SNPs with an unknown position, SNPs that are localized on sex chromosomes and SNPs that are being in a linkage disequilibrium (LD) were excluded as well. A ratio of successfully genotyped SNPs in all individuals was at least 90 %.

The PLINK 1.07 software was used to search for markers fulfilling the requirements above (Purcell et al., 2007). The same software was used to perform multidimensional scaling (MDS) based on identical-by-state distances (IBS). MDS was visualized using R software package ‘ggplot2’ (Wickham, 2009). Cluster analysis to identify population structure was carried out using the Admixture 1.3 software (Alexander et al., 2009) and visualized using R package ‘pophelper’ (Francis, 2017). Pairwise values of fixation index (F_{ST}) were calculated using R package ‘StAMMP’ (Pembleton et al., 2013). F_{ST} values obtained were used to plot a phylogenetic tree based on the Neighbor-Net algorithm in SplitsTree 4.14.5 software (Huson, Bryant, 2006). The initial files were created in R 3.5.0 software environment (R Core Team, 2012).

Results

Following the quality control, 29 688 SNP were selected for further analysis.

MDS results showed that all the groups under study were divided into three clusters corresponding to the Kholmogor, Black-and-white, and Holstein breeds (Fig. 1, a). Here, a distinction between domestic breeds ($C < 0$) and the Holstein breed ($C > 0$) was observed in terms of first component C1, which accounts for 9.71 % of variability. Black-and-white breed individuals with Holstein admixture were localized between two parent forms in accordance with the degree of admixture, i. e. BLWT-75 cluster overlapped with BLWT, and BLWT-HLST cluster – with HLST. The purebred representatives of the Black-and-white breed (BLWT) were clustered together with archival samples (BLWT-OLD). A dividing of the latter breeds was only observed in the third component (Fig. 1, b). No significant differences were observed between the KHLM and KHLM-INTA groups. Individuals of Kholmogor breed with Holstein admixture (KHLM-HLST) were assigned to HLST cluster.

Population structure analysis (Fig. 2) showed different historical origin of the Holstein and Russian breeds. Here, the Kholmogor and Black-and-white breeds separated from the Holstein breed at $K = 2$, while the differences between two Russian local breeds were observed at $K = 3$. The percentage of Holstein genomic component in the purebred Kholmogor and Black-and-white breeds (KHLM, KHLM-INTA, BLWT and BLWT-OLD) was insignificant. At the same time, Russian breeds with high degree of Holstein admixture (KHLM-HLST and BLWT-HLST) were almost identical to purebred Holstein breed specimens.

It should be noted that, according to the cross-validation (CV) error calculations, the most probable

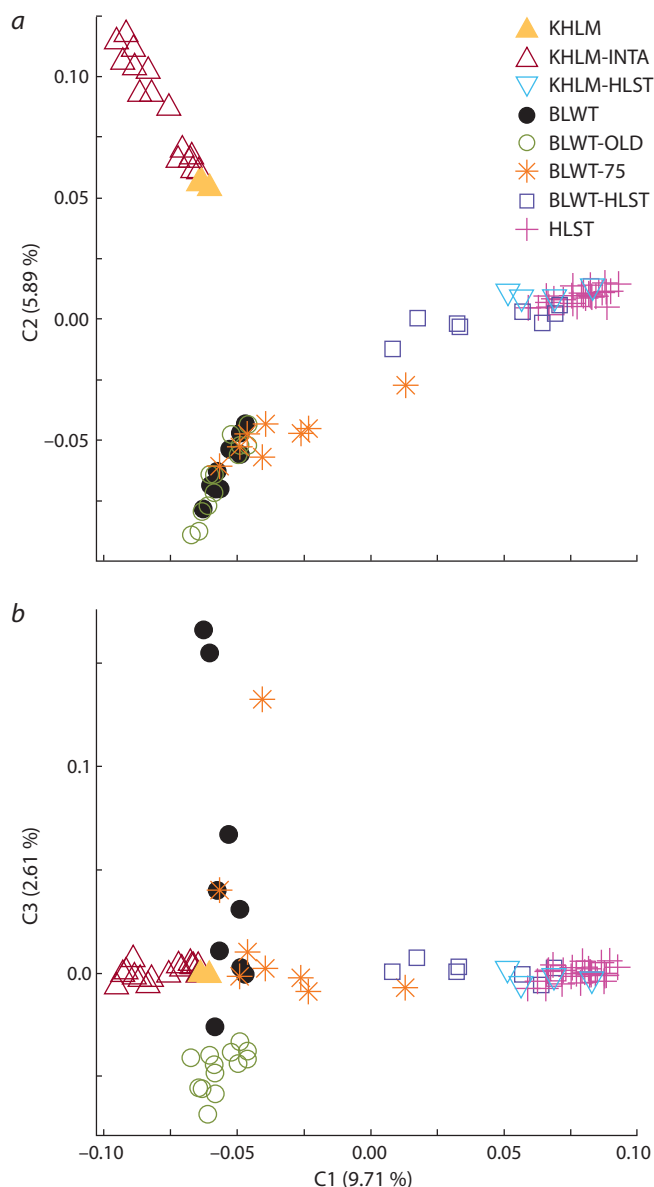


Fig. 1. Genotypic variability in the Kholmogor, Black-and-white, and Holstein cattle populations based on MDS results.

number of clusters in the studied sample was three (Fig. 3).

The results of cluster analysis were validated with calculations of pairwise values of fixation index (F_{ST}), according to which no differences were found between the HLST, KHLM-HLST, and BLWT-HLST groups. Among the Kholmogor breed groups, KHLM-INTA had slightly higher genetic distance from Holstein breed than KHLM: $F_{ST} = 0.101$ and 0.087 , respectively. Genetic distances between BLWT and BLWT-OLD Black-and-white breed groups and the Holstein breed were similar ($F_{ST} = 0.081$ and 0.084) and were higher than for the BLWT-75 group with Holstein admixture ($F_{ST} = 0.059$).

To visualize pairwise values of fixation index, a dendrogram for this parameter based on the Neighbor-Net

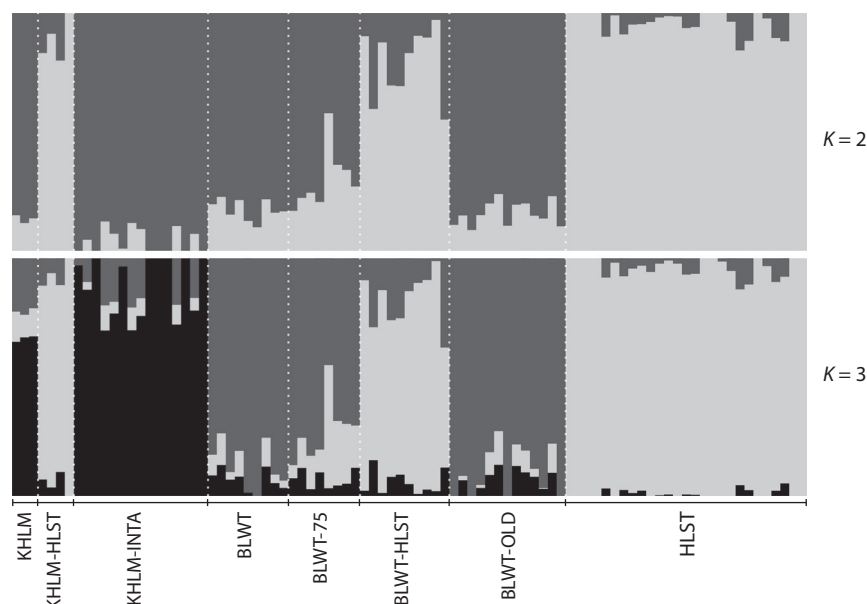


Fig. 2. Population assignment of purebred Kholmogor and Black-and-white cattle breeds and those with admixture of Holstein breed evaluated using the Admixture 1.3 software.

algorithm was constructed (Fig. 4). Here, a clear distinction between three branches corresponding to the Kholmogor (KHLM, KHLM-INTA), Black-and-white (BLWT, BLWT-OLD, BLWT-75), and Holstein (HLST, KHLM-HLST и BLWT-HLST) breeds was observed.

Discussion

In recent years, active efforts have been made in the Russian Federation to improve domestic cattle breeds by crossbreeding with foreign commercial breeds, primarily the Holstein one. These animals typically strongly outperform 'not-improved' individuals in terms of milk yield, which is why stock breeders keep increasing the degree of Holstein admixture even up to 99 % (Saksa, Barsukova, 2013; Ruhlova et al., 2014). Thus, productivity of indigenous cattle is in fact improved due to its replacement by imported breeds. As a result, the valuable gene pool formed for centuries in indigenous breeds that allowed cattle to adapt to harsh local natural and climatic conditions can be lost (Baranov, 2011; Matyukov, Zharikov, 2012; Matyukov et al., 2013, 2018).

It should be noted that overuse of imported foreign cattle breeds took place as early as late 19th century. For example, academician A.Sh. Middendorff believed that the primary way to improve cattle was to replace indigenous breeds with imported stud breeds or use crossbreeding on a large scale (Vereshchagin, 1889). At the same time, a major team of scientists headed by N.V. Vereshchagin and Av.A. Kalantar believed that it would be more reasonable to improve indigenous breeds, while providing better feeding and maintaining. They stated in their works that this way, although lengthier, was more reliable (Kalantar, 1927a, b).

Advances in genetics in the 21st century after cattle genome sequencing in 2009 (Elsik et al., 2009; Zimin et al., 2009) made it possible to carry out whole genome studies based on SNPs. This method makes it possible not only to investigate the origin of breeds and evaluate genetic links between them, but also to perform genome-wide association studies (GWAS) to reveal the links between genetic variants and phenotypic traits. Thus, an opportunity arises to identify valuable alleles in domestic breeds that are associated with stability against disease, simplicity of maintaining, etc. This information will be useful for developing preservation and improvement programs for Russian cattle popu-

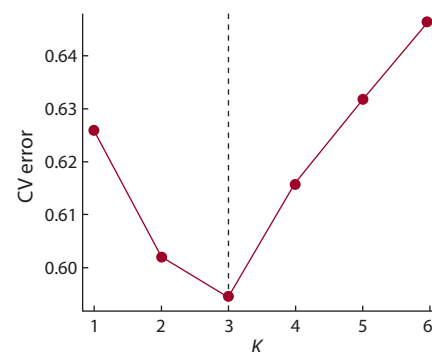


Fig. 3. Most probable number of clusters in the studied sample determined based on CV error calculation.

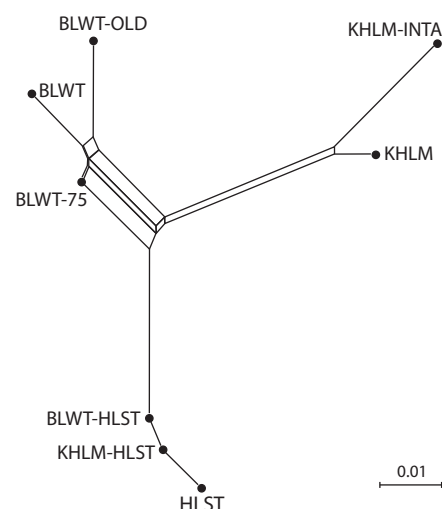


Fig. 4. Dendrogram based on pairwise genetic distances (F_{ST}) constructed using the Neighbor-Net algorithm.

lations. The present paper is the first step towards solving these problems.

In our study, we used about 30 thousand genetic markers to show that Kholmogor and Black-and-white breed individuals with high degree of Holstein admixture formed a common cluster with purebred Holstein breed animals in MDS plot, with no differences revealed by cluster analysis using the Admixture software and calculations of pairwise F_{ST} values. In addition, purebred Kholmogor and Black-and-white cattle groups had their own separate clusters. It shows that there still are individuals carrying unique alleles. Distinction between the

indigenous breeds studied and the Holstein breed in the first component (C1) of the MDS analysis and their common structure at $K = 2$ in the Admixture plot shows that the Kholmogor and Black-and-white breeds are genetically closer to each other than to the Holstein breed, which is probably caused by their common origin from the northern Great Russian cattle.

Thus, we believe that the Kholmogor and Black-and-white breed individuals whose degrees of admixture with the Holstein breed equals 80 % and more, cannot be considered as representatives of the aforementioned breeds. It seems more reasonable to attribute them to the locally bred Holstein cattle. To preserve the gene pool of Russian breeds, it is necessary to evaluate them using whole genome SNP analysis and identify herds that managed to preserve their authenticity. Improvement of indigenous breeds with foreign ones is to be implemented in accordance with breeding programs, which imply the use of genome-based techniques. This approach will make it possible to preserve adaptive advantages of local cattle, along with valuable alleles of the improving breed.

Acknowledgements

The study was carried out under State Assignment of the Federal Agency of Scientific Organizations of Russia (no. AAAA-A18-118021590134-3). Genotyping of animals was supported by the Russian Scientific Foundation (project no. 14-36-00039).

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

References

- Alexander D.H., Novembre J., Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.* 2009;19:1655-1664. DOI 10.1101/gr.094052.109.
- Baranov A.V. Problems of biodiversity conservation in animal husbandry. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC.* 2011;9:21-22. (in Russian)
- Decker J.E., Pires J.C., Contant G.C., McKay S.D., Heaton M.P., Chen K., Cooper A., Vilki J., Seabury C.M., Caetano A.R., Johnson G.S., Brenneman R.A., Hanotte O., Eggert L.S., Wiener P., Kim J.-J., Kim K.S., Sonstegard T.S., VanTassell C.P., Neibergs H.L., McEwan J.C., Brauning R., Coutinho L.L., Babar M.E., Wilson G.A., McClure M.C., Rolf M.M., Kim J.W., Schnabel R.D., Taylor J.F. Resolving the evolution of extant and extinct ruminants with high-throughput phylogenomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(44):18644-18649. DOI 10.1073/pnas.0904691106.
- Dmitriev N.G. *Cattle Breeds in the World.* Leningrad: Spravochnaya Kniga Publ., 1978. (in Russian)
- Dmitriev N.G., Paronyan I.A. *Genetic Resources of Farm Animals in Russia and Neighboring Countries.* St. Petersburg, 1994. (in Russian)
- Elsik C.G., Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium. The genome sequence of taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution. *Science.* 2009;324(5926):522-528. DOI 10.1126/science.1169588.
- Ernst L.K., Beguchev A.P., Levantin D.L. *Livestock Husbandry.* Moscow: Kolos Publ., 1977. (in Russian)
- Francis R.M. POPHELPER: an R package and web app to analyse and visualize population structure. *Mol. Ecol. Resour.* 2017;17:27-32. DOI 10.1111/1755-0998.12509.
- Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23:254-267. DOI 10.1093/molbev/msj030.
- Kalantar A.A. The fate of the "Russian" cattle. *Puti Sel'skogo Khozyajstva = Paths of Farming.* 1927a;10:181-190. (in Russian)
- Kalantar A.A. The fate of the "Russian" cattle. *Puti Sel'skogo Khozyajstva = Paths of Farming.* 1927b;11:100-108. (in Russian)
- Kuehn L.A., Keele J.W., Bennett G.L., McDanel T.G., Smith T.P., Snelling W.M., Sonstegard T.S., Thallman R.M. Predicting breed composition using breed frequencies of 50,000 markers from the US Meat Animal Research Center 2,000 Bull Project. *J. Anim. Sci.* 2011;89(6):1742-1750. DOI 10.2527/jas.2010-3530.
- Kuznetsov A.F. (Ed.) *Cattle: Maintenance, Feeding, Diseases: Diagnosis and Treatment.* St. Petersburg: Lan' Publ., 2016. (in Russian)
- Matyukov V.S., Tyrina Yu.O., Kantanen Yu., Stolpovskiy Yu.A. On features and the selective value of the gene pool in local cattle by the example of the Kholmogory breed. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology.* 2013;2:19-30. DOI 10.15389/agrobiol.2013.2.19eng (in Russian)
- Matyukov V.S., Zharikov Ya.A. *Methods of Modern Breeding and Preservation of the Gene Pool of Dairy Cattle in the Komi Republic (Recommendations for optimizing the use and conservation of the gene pool of Kholmogor cattle).* Syktyvkar, 2012. (in Russian)
- Matyukov V.S., Zharikov Ya.A., Zinovieva N.A. The genetic history and value of the gene pool of the endangered Kholmogory breed. *Molochnoe i Myasnnoe Skotovodstvo = Dairy and Beef Cattle Farming.* 2018;2:2-8. DOI 10.25632/MMS.2018.2.13747. (in Russian)
- McTavish E.J., Decker J.E., Schnabel R.D., Taylor J.F., Hillis D.M. New World cattle show ancestry from multiple independent domestication events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(15):E1398-E1406. DOI 10.1073/pnas.1303367110.
- Pembleton L.W., Cogan N.O., Forster J.W. STAMPP: an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. *Mol. Ecol. Resour.* 2013;13:946-952. DOI 10.1111/1755-0998.12129.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I.W., Daly M.J., Sham P.C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:559-575. DOI 10.1086/519795.
- R Core Team. *R: a language and environment for statistical computing.* R Foundation for statistical computing. Vienna, Austria, 2012. <http://www.Rproject.org>.
- Rukhlova T.A., Yaluga V.L., Prozherin V.P. The "Northern" intra-breed type of Kholmogory cattle. *Farm Animals.* 2014;2(6):48-55. (in Russian)
- Saksa E.I., Barsukova O.E. Breeding and genetic characterization of highly productive holsteinized black-and-white cattle in the Leningrad region. *Molochnoe i Myasnnoe Skotovodstvo = Dairy and Beef Cattle Farming.* 2013;6:11-15. (in Russian)
- Sermyagin A.A., Dotsev A.V., Gladys E.A., Traspov A.A., Denisikova T.E., Kostyunina O.V., Reyer H., Wimmers K., Barbatto M., Paronyan I.A., Plemyashov K.V., Sölkner J., Popov R.G., Brem G., Zinovieva N.A. Whole-genome SNP analysis elucidates the genetic structure of Russian cattle and its relationship with Eurasian taurine breeds. *Genet. Sel. Evol.* 2018;50:37. DOI 10.1186/s12711-018-0408-8.
- Vereshchagin N. Reply to Mr. Poltoratskiy's story "On the improvement of cattle breeding in Russia". *Vestnik Russkogo Sel'skogo*

- Khozyaystva = Herald of Russian Farming. 1889;8:657-662. (in Russian)
- Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer-Verlag, 2009.
- Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemyashov K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity*. 2018; 120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3.
- Zimin A.V., Delcher A.L., Florea L., Kelley D.R., Schatz M.C., Puiu D., Hanrahan F., Pertea G., VanTassell C.P., Sonstegard T.S., Marçais G., Roberts M., Subramanian P., Yorke J.A., Salzberg S.L. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.* 2009;10(4):R42. DOI 10.1186/gb-2009-10-4-r42.
- Zinovieva N.A., Dotsev A.V., Sermyagin A.A., Wimmers K., Reyer H., Sölkner J., Deniskova T.E., Brem G. Study of the genetic diversity and population structure of five Russian cattle breeds by genome-wide SNP analysis. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2016;51(2):788-800. DOI 10.15389/agrobiology.2016.6.788eng.

ORCID ID

A.V. Dotsev orcid.org/0000-0003-3418-2511
A.A. Sermyagin orcid.org/0000-0002-1799-6014
A.V. Shakhin orcid.org/0000-0003-4959-878X
K.V. Plemyashov orcid.org/0000-0002-5952-0436
H. Reyer orcid.org/0000-0001-6470-0434
K. Wimmers orcid.org/0000-0002-9523-6790
G. Brem orcid.org/0000-0002-7522-0708
N.A. Zinovieva orcid.org/0000-0003-4017-6863

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 14.09.2018. Выход в свет 28.09.2018. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 14.18.

Уч.-изд. л. 15.7. Тираж 150 экз. Заказ № 225. Цена свободная.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.