

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. Афтанас – 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. Рогозин – 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. Beshpalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agric.), 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

- 755 **ОТ РЕДАКТОРА**
Генетика растений
- 756 **ОБЗОР**
Белковая интерференция как механизм регуляции экспрессии генов растений
А.О. Вячеславова, И.А. Абдеева, Э.С. Пирузян, С.А. Брускин
(на англ. языке)
- 766 **ОБЗОР**
Соцветие злаков: особенности строения, развития и генетической регуляции морфогенеза
О.Б. Добровольская, А.Е. Дресвянникова
- Генофонд и селекция растений**
- 776 **ОБЗОР**
Концепция создания Российской национальной системы функциональных продуктов питания
Ю.В. Фотев, В.Ф. Пивоваров, А.М. Артемьева, И.М. Куликов, Ю.К. Гончарова, А.И. Сысо, Н.П. Гончаров
- 784 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Исходный материал для селекции яровой мягкой пшеницы в условиях Новосибирской области
В.В. Пискарев, Е.В. Зуев, А.Н. Брыкова
- 795 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Анализ генетической коллекции земляники (*Fragaria* L.) по генам *Rca2* и *Rpf1* с использованием молекулярных маркеров
И.В. Лукъянчук, А.С. Лыжин, И.И. Козлова
- 800 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Варьирование жирнокислотного состава масла семян в коллекции индуцированных мутантов льна масличного (*Linum humile* Mill.)
А.В. Тигова, А.И. Сорока
- 812 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Аллельная и эпигенетическая вариация ДНК в связи с проявлением гетерозиса в F_1 *Capsicum annuum* L.
М.Н. Шаптуренко, С.В. Вакула, Л.А. Тарутина, Т.В. Никитинская, Т.В. Печковская, Л.А. Мишин, Л.В. Хотылева
(на англ. языке)
- 820 **МЕТОДЫ И ПРОТОКОЛЫ**
Методические указания по оценке содержания амилозы и амилопектина в картофельном крахмале
Ю.А. Хорошавин, В.К. Хлесткин
- Актуальные технологии клеточной биологии**
- 825 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Оценка эффективности эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток на примере первичных культур глиобластомы человека
Е.В. Долгова, А.С. Проскурина, Е.А. Поттер, Т.В. Тыринова, О.С. Таранов, Я.Р. Ефремов, К.Е. Орищенко, С.В. Мишинов, В.В. Ступак, А.А. Останин, Е.Р. Черных, С.С. Богачев
- 837 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Паттерн эпидермиса листа пшеницы как модель для изучения влияния стрессовых условий на морфогенез
У.С. Зубаирова, А.В. Дорошков
- Системная биология**
- 845 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Паттерны и модели цветения некоторых видов семейства Campanulaceae Juss.
Э.С. Фомин, Т.И. Фомина
- 856 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Исследование эффектов грибов *Cantharellus cibarius* на трематоду *O. felineus* и на хозяина паразита – инбредных мышей C57BL/6
М.А. Цыганов, Г.Б. Вишинецкая, Т.П. Кукина, И.В. Сорокина, М.Н. Львова, М.А. Проценко, Н.Е. Костина, Д.Ф. Августиневич
- Медицинская генетика**
- 865 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Роль полиморфного локуса VNTR гена агрекана в развитии остеоартроза у женщин
Д.А. Шаповалова, А.В. Тюрин, С.С. Литвинов, Э.К. Хуснутдинова, Р.И. Хусаинова
- 873 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Поиск изменений нуклеотидной последовательности гена ремоделирования хроматина *PBRM1* у пациентов со светлоклеточным раком почки
Е.А. Климентова, И.Р. Гилязова, А.А. Измайлов, И.М. Султанов, М.А. Бермишева, В.Н. Павлов, Э.К. Хуснутдинова

Генетика животных

- 878 **ОБЗОР**
Генетические механизмы влияния света и фототрансдукции на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*
И.А. Соловьёв, М.В. Шапошников, А.А. Москалев

- 887 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Изучение изменчивости ядерных последовательностей митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерциями ретротранспозона *Tv1*, у видов дрозофил из группы *virilis*
Б.В. Андрианов, Д.А. Романов, Т.В. Горелова
(на англ. языке)

Популяционная генетика

- 895 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Реконструкция структуры генофонда казахов по данным об их родорасселении
М.К. Жабагин, О.П. Балановский, Ж.М. Сабитов,
А.З. Темиргалиев, А.Т. Агджоян, С.М. Кошель,
Е.М. Раманкулов, Е.В. Балановская

755

FROM THE EDITOR

Plant genetics

756

REVIEW

Protein interference for regulation of gene expression in plants

A.O. Vyacheslavova, I.A. Abdeeva, E.S. Piruzian, S.A. Bruskin

766

REVIEW

Cereal inflorescence: features of morphology, development and genetic regulation of morphogenesis

O.B. Dobrovolskaya, A.E. Dresvyannikova

Plant gene pool and breeding

776

REVIEW

Concept of producing of the Russian national system of functional food

Yu.V. Fotev, V.F. Pivovarov, A.M. Artemyeva, I.M. Kulikov, Y.K. Goncharova, A.I. Syso, N.P. Goncharov

784

ORIGINAL ARTICLE

Sources for the breeding of soft spring wheat in the conditions of Novosibirsk region

V.V. Piskarev, E.V. Zuev, A.N. Brykova

795

ORIGINAL ARTICLE

Analysis of strawberry genetic collection (*Fragaria* L.) for *Rca2* and *Rpf1* genes with molecular markers

I.V. Luk'yanchuk, A.S. Lyzhin, I.I. Kozlova

800

ORIGINAL ARTICLE

Variation of fatty acid composition in seed oil in the collection of induced oil flax (*Linum humile* Mill.) mutants

A.V. Tigova, A.I. Soroka

812

ORIGINAL ARTICLE

Allelic and epigenetic DNA variation in relation to F_1 heterosis manifestation in F_1 hybrids of *Capsicum annuum* L.

M.N. Shapturenko, S.V. Vakula, L.A. Tarutina, T.V. Nikitinskaya, T.V. Pechkovskaya, L.A. Mishin, L.V. Khotyleva

820

METHODS AND PROTOCOLS

A modified procedure for the evaluation of the amylose and amylopectin content in potato starch

Yu.A. Khoroshavin, V.K. Khlestkin

Mainstream technologies in cell biology

825

ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of a strategy for tumor-initiating stem cell eradication in primary human glioblastoma cultures as a model

E.V. Dolgova, A.S. Proskurina, E.A. Potter, T.V. Tyrinova, O.S. Taranov, Ya.R. Efremov, K.E. Orishchenko, S.V. Mishinov, V.V. Stupak, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh, S.S. Bogachev

837

ORIGINAL ARTICLE

Wheat leaf epidermal pattern as a model for studying the influence of stress conditions on morphogenesis

U.S. Zubairova, A.V. Doroshkov

Systems biology

845

ORIGINAL ARTICLE

Patterns and models of flowering of some Campanulaceae Juss. species

E.S. Fomin, T.I. Fomina

856

ORIGINAL ARTICLE

Effects of the mushroom *Cantharellus cibarius* on the liver fluke *O. felinus* and hosting inbred C57BL/6 mice

M.A. Tsyganov, G.B. Vishnivetskaya, T.P. Kukina, I.V. Sorokina, M.N. Lvova, M.A. Protsenko, N.E. Kostina, D.F. Avgustinovich

Medical genetics

865

ORIGINAL ARTICLE

The role of *VNTR* aggrecan gene polymorphism in the development of osteoarthritis in women

D.A. Shapovalova, A.V. Tyurin, S.S. Litvinov, E.K. Khusnutdinova, R.I. Khusainova

873

ORIGINAL ARTICLE

Identification of alterations in the nucleotide sequence of the chromatin remodeling gene *PBRM1* in clear cell renal cell carcinoma patients

E.A. Klimentova, I.R. Gilyazova, A.A. Izmailov, I.M. Sultanov, M.A. Bermisheva, V.N. Pavlov, E.K. Khusnutdinova

Animal genetics

- 878 **REVIEW**
Genetic mechanisms of the influence of light and phototransduction on *Drosophila melanogaster* lifespan
I.A. Solovev, M.V. Shaposhnikov, A.A. Moskalev

- 887 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic variation of the nuclear sequences of mitochondrial origin associated with retrotransposon *Tv1* insertions in *Drosophila* species of the *virilis* group
B.V. Andrianov, D.A. Romanov, T.V. Gorelova

Population genetics

- 895 **ORIGINAL ARTICLE**
Reconstructing the genetic structure of the Kazakh from clan distribution data
M.K. Zhabagin, O.P. Balanovsky, Zh.M. Sabitov, A.Z. Temirgaliyev, A.T. Agdzhoyan, S.M. Koshel, E.M. Ramankulov, E.V. Balanovska

Уважаемые коллеги, дорогие читатели!

Очередной выпуск «Вавиловского журнала генетики и селекции» состоит из семи разделов. Первый раздел «Генетика растений» включает две обзорные статьи. В одной из них обсуждается роль транскрипционных факторов в регуляции экспрессии генов на разных стадиях развития растений и в ответ на стрессовые условия. В другой рассмотрены современные представления о строении, развитии и генетических механизмах, регулирующих формирование соцветий злаков.

Рубрику «Генофонд и селекция растений» открывает обзорная публикация, в которой представлена аргументированная позиция солидного авторского коллектива о создании комплексной национальной программы по выделению новых видов зерновых, овощных, плодовых и ягодных культур в качестве функциональных продуктов питания. Вошедшие в эту же рубрику четыре оригинальных исследования посвящены изучению с помощью классических и современных методов генетического разнообразия хозяйственно важных признаков у таких видов растений, как яровая мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.), земляника садовая (*Fragaria* L.), лен (*Linum humile* Mill.) и перец сладкий (*Capsicum annuum* L.). По результатам многолетних исследований сортов яровой мягкой пшеницы из коллекции Всероссийского института растениеводства отобраны новые географически отдаленные образцы с высокой выраженностью признаков в качестве материала для селекции сортов, адаптированных к условиям западносибирского региона. Молекулярно-генетическое тестирование коллекции сортов земляники садовой позволило идентифицировать перспективные образцы, содержащие гены устойчивости к антракнозу и к фитотрофной корневой гнили. С целью расширения генетического разнообразия льна по содержанию омега-3 и омега-6 полиненасыщенных кислот была

изучена коллекция мутантных линий льна. Использование новых химических мутагенов привело к получению форм с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, которые рекомендованы для дальнейшей селекции. В работе с применением маркеров SSR и ALFP изучены различные варианты проявления гетерозиса у коллекции гибридов перца сладкого. Заключительная статья раздела представляет собой методическое руководство для определения содержания амилозы и амилопектина в картофельном крахмале. Разработанная методика включает в себя элементы ранее разрозненных методов и может быть использована как для прикладных работ, так и в научных исследованиях.

Рубрика «Актуальные технологии клеточной биологии» содержит два оригинальных исследования. В первом из них приведены результаты оценки нового терапевтического подхода, направленного на разрушение ракового клеточного сообщества на примере модельных культур клеток глиобластомы человека. Во втором демонстрируется новый методический подход, основанный на получении конфокальных 3D изображений листьев пшеницы. Данный подход эффективен для изучения влияния стрессовых условий на морфогенез эпидермиса листа.

В рубрику «Системная биология» вошли два разноплановых экспериментальных исследования. Это компьютерное моделирование процессов цветения у растений семейства *Campanulaceae* и исследование антигельминтных эффектов грибов в отношении личинок трематод, вызывающих опасное паразитическое заболевание – описторхоз.

Две оригинальные статьи раздела «Медицинская генетика» посвящены поискам молекулярных маркеров, с высокой вероятностью ассоциированных с развитием остеопороза у женщин и риском развития рака почки. Работы выполнены на примере изучения полиморфизма гена *VNTR* протеогликана и гена-супрессора опухолевого роста *PBRM1*.

Следующий раздел «Генетика животных» включает работы, посвященные изучению семейства плодовых мушек *Drosophilidae*. В обзорной статье обсуждаются генетические механизмы влияния фоторежима на продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*, а в экспериментальной описаны результаты изучения изменчивости митохондриальных последовательностей, интегрированных в ядерный геном, на примере дрозофил группы *virilis*.

Завершает выпуск оригинальное популяционное исследование структуры генофонда казахов (рубрика «Популяционная генетика»). Отличительной особенностью работы является то, что результаты получены с использованием так называемых квазигенетических маркеров – признаков, не имеющих генетической природы, но передающихся в поколениях на основании культурных традиций.

Академик В.К. Шумный

Protein interference for regulation of gene expression in plants

A.O. Vyacheslavova, I.A. Abdeeva, E.S. Piruzian, S.A. Bruskin

Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

Transcription factors (TFs) play a central role in the gene regulation associated with a plant's development and its response to the environmental factors. The work of TFs is well regulated at each stage of their activities. TFs usually consist of three protein domains required for DNA binding, dimerization, and transcriptional regulation. Alternative splicing (AS) produces multiple proteins with varying composition of domains. Recent studies have shown that AS of some TF genes form small proteins (small interfering peptide/small interfering protein, siPEP/siPROT), which lack one or more domains and negatively regulate target TFs by the mechanism of protein interference (peptide interference/protein interference, PEPI/PROTi). The presence of an alternative form for the transcription factor CCA1 of *Arabidopsis thaliana*, has been shown to be involved in the regulation of the response to cold stress. For the PtFLC protein, one of the isoforms was found, which is formed as a result of alternative splicing and acts as a negative repressor, binding to the full-length TF PtFLC and therefore regulating the development of the *Poncirus trifoliata*. For *A. thaliana*, a *FLM* gene was found forming the FLM- δ isoform, which acts as a dominant negative regulator and stimulates the development of the flower formation process due to the formation of a heterodimer with SVP TF. Small interfering peptides and proteins can actively participate in the regulation of gene expression, for example, in situations of stress or at different stages of plant development. Moreover, small interfering peptides and proteins can be used as a tool for fundamental research on the function of genes as well as for applied research for permanent or temporary knockout of genes. In this review, we have demonstrated recent studies related to siPEP/siPROT and their involvement in the response to various stresses, as well as possible ways to obtain small proteins.

Key words: peptide/protein interference (PEPI/PROTi); transcriptional factors; alternative splicing; small interfering peptide/protein (siPEP/siPROT); flowering time; circadian clock.

Белковая интерференция как механизм регуляции экспрессии генов растений

А.О. Вячеславова, И.А. Абдеева, Э.С. Пирузян, С.А. Брускин

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

Транскрипционные факторы (ТФ) играют центральную роль в регуляционных процессах, связанных с развитием растений и их ответом на внешние воздействия. Работа ТФ регулируется на каждой стадии из активности. Как правило, ТФ состоят из трех доменов, необходимых для ДНК-связывания, димеризации и транскрипционной регуляции. Альтернативный сплайсинг позволяет получить множество белков с различным составом доменов. Недавние исследования показали, что в результате альтернативного сплайсинга некоторых генов, кодирующих ТФ, образуются малые пептиды (малые интерферирующие пептиды/белки, siPEP/siPROT), у которых отсутствует один или несколько доменов и которые негативно регулируют целевой ТФ благодаря механизму белковой интерференции (белковая/пептидная интерференция, PEPI/PROTi). Было показано наличие альтернативной формы для транскрипционного фактора CCA1 *Arabidopsis thaliana*, которая участвует в регуляции ответа на холодовой стресс. Для белка PtFLC обнаружена одна из изоформ, которая образуется в результате альтернативного сплайсинга и действует как негативный репрессор, связываясь с полноразмерным ТФ PtFLC и тем самым регулируя некоторые стадии развития растения *Poncirus trifoliata*. Для *A. thaliana* обнаружен ген *FLM*, образующий изоформу FLM- δ , которая работает как доминантный негативный регулятор и стимулирует процесс формирования цветка благодаря образованию гетеродимера с транскрипционным фактором SVP. Малые интерферирующие пептиды и белки могут быть активными участниками регуляции экспрессии генов, например, при стрессовых воздействиях или на разных стадиях развития растения. Более того, небольшие интерферирующие пептиды и белки могут быть использованы в качестве инструмента для фундаментальных исследований функции генов, а также в прикладных исследованиях, например, для временного или постоянного выключения гена. Данный обзор посвящен последним исследованиям, связанным с малыми интерферирующими пептидами и их ролью в ответе на различные стрессовые факторы, а также возможным путям получения малых интерферирующих пептидов.

Ключевые слова: пептидная интерференция (PEPI/PROTi); транскрипционные факторы; альтернативный сплайсинг; малые интерферирующие пептиды (siPEP/siPROT); период цветения; циркадные ритмы.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Vyacheslavova A.O., Abdeeva I.A., Piruzian E.S., Bruskin S.A. Protein interference for regulation of gene expression in plants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):756-765. DOI 10.18699/VJ18.419

Received 13.04.2018
Accepted for publication 16.09.2018
© AUTHORS, 2018

Plants use different molecular mechanisms to respond to external abiotic and biotic factors for optimizing their growth and development in a changing environment. Most of the responses are based on the alterations of the expression levels of certain genes.

There are two main types of gene expression regulation – negative and positive. In the case of positive regulation, the level of gene expression increases by the action of regulatory elements. On the other hand, with the help of other regulatory elements the level of gene expression can be reduced; this is called negative regulation.

Regulation of gene expression in a cell can usually performed at the transcriptional, translational, or protein levels. Negative regulation of transcription and translation can be accomplished by RNA interference (RNAi) (Vaucheret et al., 2001; Filipowicz et al., 2005; Sainsbury et al., 2015). However, even in the case of successful RNAi, there are already some transcripts of target genes accumulated in the cell. At the protein level, negative regulation is commonly accomplished by controlled ubiquitin-dependent proteolysis (Ingvarðsen, Veierskov, 2001). This degradation pathway requires time to generate a response; this is critical when considering response to stress factors. Recently, a new pathway of transcriptional factor (TF) protein abundance regulation mediated by small proteins was discovered (Seo et al., 2011a). These small proteins were called “small interfering peptides/proteins” (siPEP/siPROT) because of the similarity to the molecular mechanism of action of small interfering RNA (siRNAs). The siPROT’s pathway was named “peptide/protein interference” (PEPi/PROTi) similar to the RNAi.

TFs are the main players in the transcriptional control of a whole variety of plant genes, that are involved in plant growth and development as well as response to biotic and abiotic stresses. The activity of TFs can be regulated both at the synthesis step (transcription and translation) and by modifications of the synthesized protein molecule (i. e. by post-translational modifications) using different biochemical ways; for example, reversible phosphorylation, or nuclear-cytoplasmic localization are both post-translational modifications (Hill, 2015).

One of the main pathways for regulation of eukaryotic gene expression consists of controlling transportation of TFs from the cytoplasm into the nucleus. Some TFs in the cytoplasm are stored in a “dormant” state through physical association with cellular membranes. Such membrane-associated TFs (MTFs) are activated through controlled proteolytic cleavage and are then transferred to the nucleus. Cleavage can be affected by regulated intramembrane proteolysis (RIP) with a specific membrane-associated protease or by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing (RUP) (Hoppe et al., 2001; Kim et al., 2007). In both cases, the process is controlled by biological signals targeting the membrane.

One known group of plant-specific TFs, regulated by RIP, is NAC (NAM – No Apical Meristem; ATAF – *Arabidopsis* Transcription Activation Factor; CUC – CUp-shaped Cotyledon), which plays an important role in the development processes in some plant species (Puranik et al., 2012). NAC proteins, including protein NTM1 (NAC with transmembrane motif 1) and related NAC members (e. g., NTM1-like), integrated into the ER (Endoplasmic Reticulum) or plasma membrane by the C-terminal transmembrane domain, are released from the

Abbreviations

AS – Alternative splicing
 bHLH – Basic helix-loop-helix transcription factor
 CCA1 – CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 protein
 DELLA – domain which is required for GA regulation, named after the first five amino acids
 DRM1/ARP – *Dormancy-associated gene-1/Auxin-repressed protein*
 EE – Evening Element motif
 ER – Endoplasmic reticulum
 FLC – MADS-box protein FLOWERING LOCUS C
 FLM – FLOWERING LOCUS M protein
 FRI – *FRIGIDA* gene
 GA – Gibberellin
 GAI – Gibberellic acid insensitive protein
 GRAS – family of plant-specific proteins, name comes be the name of the first three members: GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR of GAI (RGA), and SCARECROW (SCR)
 HDAC – Histone Deacetylases
 HD-ZIP III – Class III homeodomain protein “leucine zipper”
 HLH – Helix-loop-helix motif
 HSP – Heat shock protein
 IDD14 – *INDERMINATE DOMAIN 14* transcriptional factor gene
 IDP – Intrinsically disordered protein
 KDR – Kidari protein
 MIF – “Mini Zinc Fingers” protein
 MTFs – Membrane-associated TFs
 NAC – NAM – No Apical Meristem; ATAF – *Arabidopsis* Transcription Activation Factor; CUC – CUp-shaped Cotyledon
 PEPi/PROTi – Peptide interference/protein interference
 PHB – Phabulosa, homeobox-leucine zipper protein ATHB-14
 PHV – Phavoluta protein, homeobox-leucine zipper protein ATHB-9
 PIFs – Phytochrome-interacting Factors
 PsDRM1 – *Pisum sativum* DRM1 protein
 PtFLC – Homolog of FLC in *Poncirus trifoliata*
 QQS – *QUA-QUINE STARCH* gene
 REV – Revoluta protein
 RGA – Repressor of GAI
 RIP – Regulated intramembrane proteolysis
 RNAi – RNA interference
 RUP – Regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing
 SCR – Scarecrow protein
 siPEP/siPROT – small interfering peptide/small interfering protein
 siRNA – small interfering RNA
 STATs – Signal Transducers and Activators of Transcription
 SVP – SHORT VEGETATIVE PHASE protein
 TF – Transcriptional factor
 ZF – “Zinc Finger” motif
 ZHD – ZF-Homeodomain
 ZPRs – Little zipper protein

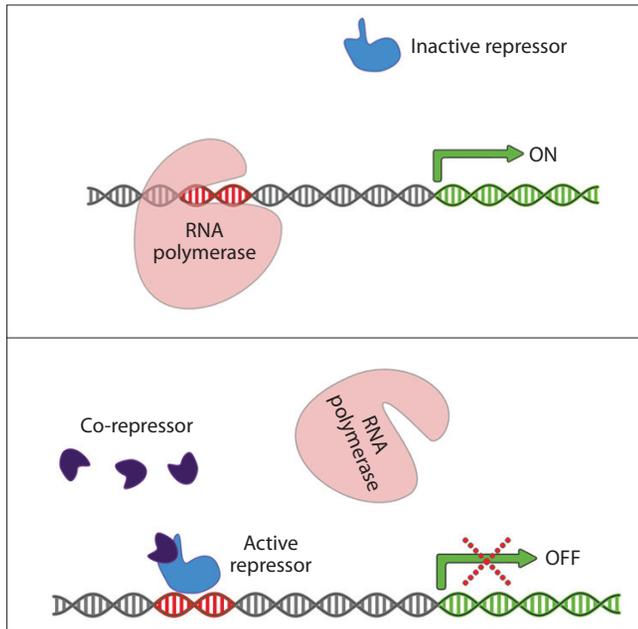


Fig. 1. A schematic representation of the mechanism of active repression. In the case of active repression, the repressor interacts with the regulatory region of the gene, thereby regulating the gene expression. The TFs can be a repressor that acts individually or by interacting with a co-repressor protein, which has no DNA binding domain.

bound state by RIP. The activated NAC proteins are transferred to the nucleus, where they are involved in the transcriptional regulation of stress response genes, controlling time of flowering, germination ability of seeds, and other processes (Kim et al., 2006; Kim S.G. et al., 2008).

Mechanisms of transcriptional repression: active and passive repression

Eukaryotic organisms, including plants, have developed different mechanisms of transcriptional repression as a way to regulate gene expression. Generally, these mechanisms divided into two basic types: active and passive repression.

Active repression is based on the interaction between the repressor and DNA sequence in the regulatory region of the gene (Fig. 1).

Moreover, the repression domain of TFs interact with co-repressor proteins, which do not possess DNA binding domains (see Fig. 1). Co-repressor proteins control other regulators, such as chromatin remodeling factors that are involved in the formation of repressed chromatin sites. HDACs (histone deacetylases) are a good example of repressor proteins. They remove the acetyl group of a lysine residue in the histone tail and as a result, the chromatin is condensed, which usually leads to gene silencing (Shahbazian, Grunstein, 2007).

Under passive repression conditions the repressor does not interact directly with the DNA region but regulates other proteins indirectly through helper proteins. For example, gibberellin-mediated (GA-mediated) transcriptional regulation involves proteins from a subfamily of the plant-specific GRAS transcriptional regulators with the DELLA domain. After germination, *Arabidopsis* seeds are exposed to the day and night cycles. Hypocotyl elongation occurs by leaps and

is dependent on the length of the dark period. During short photoperiod, maximum growth rate occurs in the dawn, then in the first hours of daylight the growth rate decreases (Nozue et al., 2007; Niwa et al., 2009). For example, hypocotyl elongation is significantly reduced when the germination of seedlings in constant daylight, which indicate the need of dark period (Soy et al., 2014). The elongation of hypocotyl in first hours of dawn involves the work of set of transcription factors from PIFs family (PIF1, PIF3, PIF4, PIF5) (Hug, Quail, 2002; Nozue et al., 2007; Niwa et al., 2009; Soy et al., 2012, 2014). On the first step, in the end of the dark period the transcriptional level of PIF4 and PIF5 genes is increased (Nozue et al., 2007; Nusinow et al., 2011; Huang et al., 2012). At the same time the transcriptional levels of genes PIF1 and PIF3 remain practically constant throughout the light day (Soy et al., 2012, 2014). It is known that the proteins from phytochrome family interact with transcription factors from PIF family. This interaction leads to degradation TFs PIF1, PIF3, PIF4, PIF5 in a phytochrome-dependent manner (Bauer et al., 2004). According to this degradation in the first hours of the light period the level of proteins PIF1 and PIF3 is increased (Soy et al., 2014), and the level of PIF4 and PIF5 is optimized (Nozue et al., 2007; Yamashino et al., 2013). It was shown that PIFs are inactivated by DELLAs, which are not directly associated with the region of DNA, but instead with the PIFs DNA-recognition domain (Arana et al., 2011; Nieto et al., 2015); this effectively prevents PIFs from binding to the targeted DNA. Increasing GA level leads to association of GA and DELLA via GID1 receptor, and finally to the removal of PIFs repression and hypocotyl elongation (Fig. 2) (Feng et al., 2008).

The discovery and characterization of siPEP/siPROT

Recently, another mean of negative regulation of gene transcription in plants was discovered (Hu, Ma, 2006). One property of TFs is the ability to perform reversible formation of homo- and heterodimers. Most often, TFs form homodimers to increase their binding affinity to DNA. In some cases, TFs form heterodimers, where each monomeric TF protein have different degrees of DNA-binding affinity or specific transcriptional activity. The ability to form homo- and heterodimers is one of the regulatory mechanism characteristic of TFs and may possibly increase their variety (Klemm et al., 1998).

One example of the regulation of gene expression by heterodimers formation is a group of genes encoding small proteins (67–100 amino acid residues) with high homology to the TFs from Class III homeodomain proteins “leucine zipper” (HD-ZIP IIIs) has been found in *A. thaliana* genome (Wenkel et al., 2007; Kim Y.S. et al., 2008). These small proteins, named little zippers (ZPRs) have a unique structure compared to other known TFs because they have only the ZIP motif response for protein-protein interactions, but lack the DNA-binding and the C-terminal activation domains. It is supposed that ZPR proteins are not functional TFs from the HD-ZIP IIIs family, but are able to form non-functional heterodimers with HD-ZIP IIIs TFs, thereby constituting an example of negative regulation of TFs (Fig. 3, a) (Wenkel et al., 2007). Generally, the HD-ZIP III TFs regulate vascular development, the activity of the shoot apical meristem and lateral organ patterning

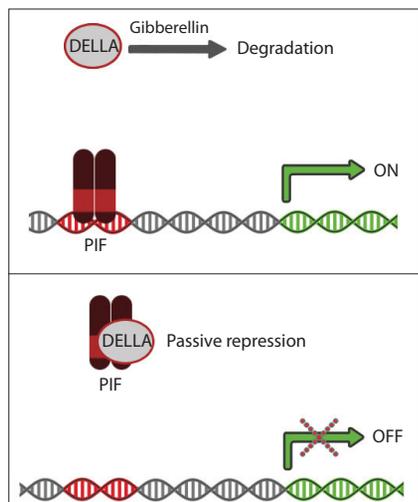


Fig. 2. A schematic representation of the passive repression of PIF transcription factors. In the case of passive repression, the repressor does not interact directly with the DNA region, but regulates other proteins indirectly through helper proteins. PIFs (phytochrome-interacting factors) are inactivated by proteins from a subfamily of the plant-specific GRAS transcriptional regulators with DELLA domain. DELLAs are not directly associated with the region of DNA, but instead with the PIFs bHLH DNA-recognition region and prevent binding of PIFs to the targeted DNA.

(Prigge et al., 2005). It has been shown that ZPR3 has specific association with the HD-ZIP III proteins, including ATHB15, ATHB8, Phabulosa (PHB), Phavoluta (PHV) and Revoluta (REV), using the ZIP motif (Kim Y.S. et al., 2008). Studies of protein-protein interactions and transcriptional activity showed that the ZPR-HD-ZIP III heterodimer is transcriptionally inactive because it does not bind with DNA (Wenkel et al., 2007). It is still unknown whether the ZPR-mediated transcriptional control is unique only to HD-ZIP III or if “little zippers” could also regulate other TFs from different families.

Currently, investigation of structural organization of the ZPRs, their functional role and dominant-negative regulation of HD-ZIP III TFs has led to the identification of some other similar proteins in the *Arabidopsis* genome (Seo et al., 2011a). An important specific characteristic of the new proteins was exclusion of one or more domains, for example DNA-binding or activation domains, but the presence of an intact dimerization domain. A small group of proteins, named “Mini zinc Fingers” (MIF) was also discovered. Like ZPR proteins, MIF

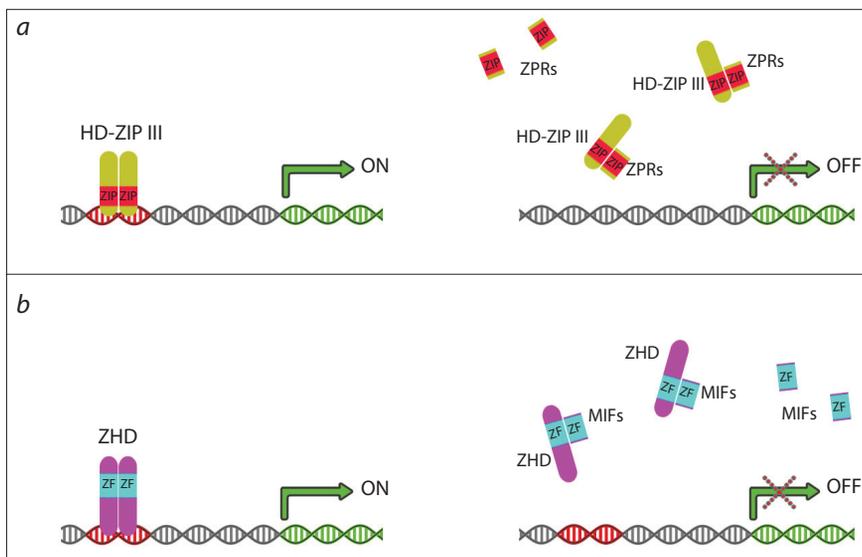


Fig. 3. Small plant proteins interact with transcription factors, thereby realizing negative regulation of a gene.

(a) Transcriptional factors from Class III homeodomain proteins “leucine zipper” (HD-ZIP III) usually function as homodimers, but the truncated form of little zippers (ZPRs) leads to the formation of transcriptionally nonfunctional heterodimers. ZPRs have only the ZIP motif responsible for protein-protein interactions, but lack the DNA-binding and the C-terminal activation domains. (b) “Mini zinc Fingers” (MIF) proteins do not have TF activities by themselves, but regulate the activities of the ZF-Homeodomain (ZHD) TFs by competitively forming nonfunctional heterodimers. MIF proteins contain a ZF motif that is highly homologous to the same motif within “Zinc Finger” of TF ZHD family, but lack the DNA-binding and the C-terminal activation domains.

proteins do not have TF activities by themselves, but regulate the activities of the ZF-Homeodomain (ZHD) TFs by competitively forming nonfunctional heterodimers (Hu, Ma, 2006; Hu et al., 2011). MIF small proteins contain a ZF (“Zinc Finger”) motif that is highly homologous to the same motif within ZF of ZHD TF. On the other hand, MIFs do not have a DNA-binding HD motif, suggesting their involvement in negative regulation of ZHD TFs (Fig. 3, b).

Another example of small proteins is the Kidari (KDR) proteins that contain the helix-loop-helix (HLH) motif, which is highly homologous to a subgroup of the bHLH TFs. It has been shown that KDR proteins regulate the activity of HFR1, involved in plant photomorphogenesis (Hyun, Lee, 2006). HFR1 protein also plays an important regulatory role in plant response to sunlight (Zhang et al., 2008), and KDR proteins are important for signaling both the phytochrome A and cryptochromes (Duek, Fankhauser, 2003). So, the KDR-HFR1 interaction is responsible for blue and far-red light responses. The KDR protein consists of approximately 100 amino acid residues and has no activation domain, which is normally responsible for TF activity. KDR interacts with HFR1 through the HLH motif and prevents HFR1 from interacting with PIF transcription factors (Hyun, Lee, 2006; Hong et al., 2013).

As a result, discovered small proteins have been called “small interfering proteins/peptides” (siPEP/siPROT), and their mechanism of action was named “peptide/protein interference” (PEPi/PROTi) (Seo et al., 2011a, 2013).

Alternative splicing as a way of producing siPEP/siPROT

Another way of transcriptional regulation occurs via the formation of nonfunctional heterodimers. As it was shown recently by Seo (Seo et al., 2013), alternative splicing (AS)-derived protein isoforms act as dominant negative regulators via common to PEPi/PROTi mechanisms of nonfunctional heterodimer formation.

AS is a unique way to obtain different protein variants from one single gene in order to increase transcriptome diversity without drastically increasing the size of the genome of a eukaryotic organism. It has been shown that roughly 60 % of all

genes of plant genomes, containing introns, are alternatively spliced (Marquez et al., 2012). There is a view of the connection of the organism complexity and AS. AS may contribute to the development of an organism with a complex organization by increasing of the proteome diversity (Chen et al., 2014).

Many TF-encoding genes are involved in the regulation of various processes, such as flowering and stress response. Sometimes their transcripts are exposed to AS, that helps to regulate intracellular processes of adaptation. For example, TF *IDD14*, which regulates the metabolism of starch during cold stress, is exposed to AS (Seo et al., 2011b). In response to cold stress, a plant provides two spliced variants of TF *IDD14*: *IDD14 α* , which is a full-sized version of the TF and *IDD14 β* – a truncated variant of the TF with a damaged DNA-binding domain. It is important that TF *IDD14 β* has a functional dimerization domain, which allows the formation of non-functional heterodimers consisting of truncated and the full-sized version of TF *IDD14*. It has been demonstrated that transgenic plants overexpressing *IDD14 α* only, have short growth. It is supposed that *IDD14 α* provides the influence on the *QUA-QUINE STARCH (QQS)* gene, involved in starch degradation. For transgenic plants overexpressing the *IDD14 β* gene only, the opposite was demonstrated: there was significant accumulation of starch in plant cells. Therefore, it could be reported that TF *IDD14 β* plays a dominant-negative role in *Arabidopsis* plants (Seo et al., 2011b).

In the next parts of this review we will describe in more details several cases of the siPEP/siPROT-mediated regulation in plants.

Regulation of plants genes expression using truncated forms of the TF protein

Circadian clock-associated1 (CCA1) protein as a component of cold accommodation

Genes involved in circadian rhythms of *A. thaliana* play an important role in the synchronization of a wide range of plant biological processes, and plant response to stress via transcriptome regulation. One of the key genes involved in the circadian rhythm of *A. thaliana* is *CCA1*, encoding a Myb-related CCA1 transcription factor. The CCA1 TF participates in plant response to cold stress. It has been shown that transgenic plants expressing the *CCA1* gene demonstrate an improved resistance to low temperatures compared with plants harboring a mutation in this gene (Seo et al., 2012). In spite of the importance of CCA1, it is unknown how decreasing temperature influences activity of CCA1. It was shown that CCA1 is able to regulate gene expression by binding to EE (Evening Element) motif of target promoters regions. These motifs regulate the genes that are actively expressed in the evening (Harmer, 2009; Nagel et al., 2015). mRNA of *CCA1* gene accumulates during dawn and represses the expression of target genes, accumulating in the evening. However, CCA1 protein levels decrease throughout the day, thus the expression levels of target genes which was suppressed previously increase and peaking in the evening (Alabadi et al., 2001). CCA1 plays an important role in regulating a large set of the biorhythmic transcriptome. Many of target genes include EE motif, but recently (Nagel et al., 2015) it was found a

group of genes belonging to morning phase and enriched of unrecognized motifs associated with the function of CCA1.

Recently (Seo et al., 2012) it was shown that the *CCA1* is capable of forming two splice variants: the full-sized functional protein CCA1 α and a truncated version – CCA1 β . CCA1 β isoform has a full-sized dimerization domain that allows it to form homo/heterodimers, but it has no N-terminal MYB motif, which is involved in DNA binding. Consequently, CCA1 β is able to form non-functional heterodimers with full-sized TF CCA1 α and also with TF LHY, which is involved in late elongation of hypocotyls and is also responsible for the plant's circadian rhythm. At low temperatures, CCA1 α is liberated from CCA1 β and forms CCA1 α –CCA1 α and LHY–CCA1 α dimers, which bind to the *CBF* gene promoters to induce freezing tolerance (Dong et al., 2011). Later it was shown that other genes involved in circadian rhythms of plants (*TOC1*, *PRR3*, *PRR5*, *PRR7* and *PRR9*), also have alternative splicing variants (Park et al., 2012).

PtFLC protein responsible for control of flowering time

Seasonal flowering of plants often requires pre-incubation at a low temperature. This phenomenon is known as vernalization and is observed for many plants, including *A. thaliana*. The vernalization period can continue for several weeks, compared to the influence of daylight duration, which is a trigger of the flowering process usually requiring just several days. Plants that require vernalization encode a repressor that blocks flowering during the summer or the fall periods.

Two key genes involved in the flowering process of *A. thaliana* are *FLC* and *FRI*. The *FRI* gene encodes supercoiled protein that is involved in transcription of the *FLC* gene, possibly through its effect on chromatin (Johanson et al., 2000). The *FLC* gene is a MADS-box TF, which is associated with genes involved in flowering, and blocks their transcription. FLC functions as a transcriptional repressor of flowering (Michaels, Amasino, 1999; Sheldon et al., 1999).

In *Poncirus trifoliata*, a homolog of *FLC* (Zhang et al., 2009) was also found. Gene expression of *PtFLC* is also regulated by temperature fluctuations. However, another regulation mechanism of the *PtFLC* gene exists: it takes place on the post-transcriptional level by AS. *PtFLC* form 5 protein splice variants at various stages of plant development and under the influence of a particular temperature. The smallest isoform function as a negative repressor by competing for linkage to the DNA, or to form a non-functional heterodimer with full-sized *PtFLC* TF (Zhang et al., 2009). Perhaps, due to the need to regulate the development of the plant at different stages and at different temperatures, the *PtFLC* gene form 5 splice variants. This is one of the communication pathway between external signals and internal programming in plant development. Thus, the *PtFLC1* and *PtFLC2* protein variants were found only in the developing tissues, while *PtFLC4* and *PtFLC5* isoforms were detected in already formed tissue of the adult plant. Isoforms of the *PtFLC3* protein were detected at all stages of plant development. It is interesting that all of the alternative protein isoforms have the DNA-binding domain, but possess deletions of the C-terminal domain in different positions. However, the particular mechanism of action of *PtFLC* alternative isoforms is still not clear.

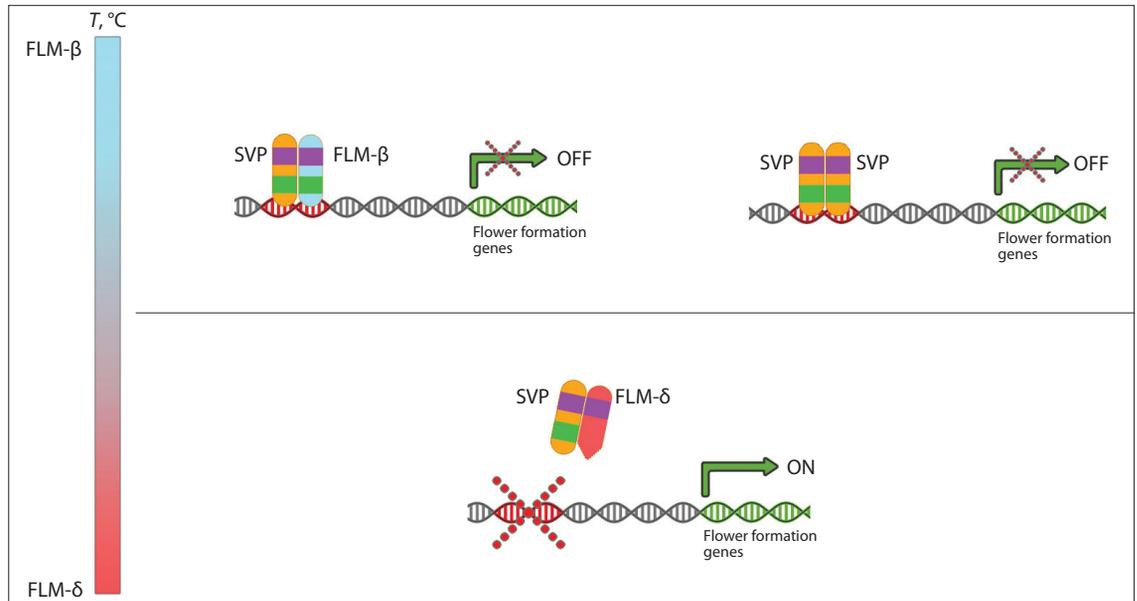


Fig. 4. The model of the SVP-FLM- δ and SVP-FLM- β complex. In the case of a low temperature (16 °C), the amount of FLM- β proteins totals more than that of the FLM- δ splice isoform. Therefore, SVP could form homo- and heterodimers with TFs SVP and FLM- β , respectively. Heterodimer SVP-FLM- β and homodimer SVP-SVP each connect to the regulatory regions of the genes controlling flower formation, thereby suppressing these genes, which causes delay of flowering. Increasing temperature (27 °C) forces the development of alternative protein isoforms – FLM- δ – that replace the FLM- β isoforms in the heterodimer SVP-FLM- β .

FLM- β protein responsible for control of flowering time depending on the temperature

As mentioned previously, the key mechanism of acceleration flowering of *A. thaliana* during prolonged cold exposure is associated with repression of FLC transcription factors, belonging to the MADS-box family (Song et al., 2012). To date, the phenomenon of vernalization in *A. thaliana* is studied well enough allowing the prediction of the existence of vernalization pathway in other plants based on their genotypes.

However, plant sensitivity to environmental temperature fluctuations is still under investigation (Verhage et al., 2014; Capovilla et al., 2015).

Important genes for flowering in *A. thaliana* are *FLM* and *SVP*. Proteins FLM and SVP are TFs that play an important role in flowering repression (Balasubramanian et al., 2006; Lee et al., 2007). Mutations in these genes account for the reduced sensitivity of plants to low temperatures, which indicate that FLM could act as a repressor of response to environmental temperature (Scortecchi et al., 2001). It may be a result of the destruction of flowering-time regulation that depends on temperature (Balasubramanian et al., 2006; Lee et al., 2007; Gu et al., 2013).

It is known that RNA of the *FLM* gene is alternatively spliced generating the four isoforms of the protein. The most common are two isoforms: FLM- β and FLM- δ . It has been shown that FLM- β isoforms predominate in cells of *A. thaliana* after cultivation at 16 °C. However, at 23 °C both isoforms – FLM- β and FLM- δ – are produced in approximately the same quantities, and at 27 °C FLM- δ isoform predominates. As for the *SVP* gene, it was shown to be mostly independent of temperature (Posé et al., 2013). It has also been shown that the sole presence of the FLM- β isoform in plant cells delay flowering, while existence of only the FLM- δ variant in the

plant accelerates the flowering. In addition, both splice variants of the protein are able to form heterodimers with the SVP protein via the dimerization domain. Heterodimer SVP-FLM- β binds to the regulatory regions of genes controlling flower formation (*SOC1*, *ATC*, *TEM2*, *SEP3*, *AP3*, *PI* and others), thereby suppressing these genes and causing the delay of flowering. Moreover, the SVP protein form homodimers that repress the genes controlling formation of flowers. The heterodimer SVP-FLM- δ almost never binds to the regulatory regions of genes; this allows for transcription to occur. It seems that both isoforms compete with each other to build connection with the SVP protein. At low temperatures, the main product of the *FLM* gene is the FLM- β protein, which blocks flower formation by development of the SVP-FLM- β heterodimer. Increasing temperature forces the development of alternative protein isoforms – FLM- δ – that replaces the FLM- β isoforms in the heterodimer SVP-FLM- β . Therefore, the FLM- δ isoform works as a dominant negative regulator and force the process of flower formation (Fig. 4) (Lee et al., 2013).

Dormancy regulation and a role of *DRM1* gene

One process that influences plant growth and development in response to abiotic factors or endogenous biotic factors (e. g. hormonal regulators) is dormancy release. Dormancy can be determined as an absence of visible growth in meristematic plant tissue (Horvath et al., 2003). Endodormancy (winter dormancy) also exists in perennials and protects plants from external factors such as reduced light hours and extreme cold, as well as from the action of internal factors (e. g. hormones) at both the transcriptional and translational levels.

Dormancy-associated gene-1/Auxin-repressed protein (DRM1/ARP) is often used as a genetic marker for dormant meristematic tissues (Rae et al., 2013). The functional role

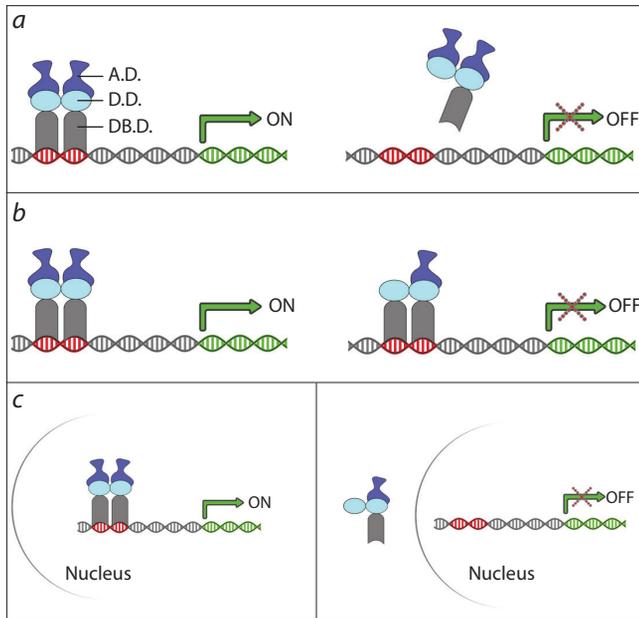


Fig. 5. Models of siPEP/siPROT action in plants.

A.D. – activation domain; D.D. – dimerization domain. DB.D. – DNA-binding domain.

(a) A siPEP/siPROT with dimerization and activation domains, but lacking a DNA-binding domain form heterodimers with a target TF. Such heterodimers will have reduced DNA-binding activity. (b) A siPEP/siPROT with DNA-binding and dimerization domains, but lacking an activation domain form heterodimers with a target TF. Such nonfunctional heterodimers have no transcriptional activity or have a reduced transcriptional activity compared to functional TF homodimers. (c) Isolation of target TFs from the nucleus by siPEP/siPROT.

of *DRM1/ARP* was shown for the first time in pea (Stafstrom et al., 1998). It has been shown that the transcription level of *PsDRM1* in dormant buds beneath the apex is high, but six hours after removal of the apex the transcriptional level of the gene falls significantly. Later, comparable profiles of expression were detected in *A. thaliana* plants (Tatematsu et al., 2005) and kiwifruit (Wood et al., 2013). The light signaling mutant, *phyb*, in *Arabidopsis* has a reduced, non-developing buds with a concomitant increase in *DRM1/ARP* expression (Kebrom et al., 2006). Perhaps other members of the *DRM1/ARP* family play an important role in response to different stress factors such as cold, salt stress, drought, and others.

AtDRM1 and *DRM1* of kiwifruit, like many other genes involved in response to stress, undergo alternative splicing (Ner-Gaon et al., 2004). *DRM1/ARP* family members of kiwifruit have been supposedly classified as IDPs (Wood et al., 2013). These proteins have no stable tertiary structure, but can be packed partially depending on environmental conditions or interaction with other proteins; this effectively changes their physiological condition (Uversky, Dunker, 2010) and allows them to interact with a wide variety of protein-partner. It is interesting to note that many of IDPs in the isolated state create a strong connection with protein-partners. It was shown that these types of proteins are involved in the response to stress factors by associating with GRAS proteins (Sun et al., 2010, 2011) and heat shock proteins (Wang et al., 2004). However, the functional role of IDPs proteins is still not fully understood (Rangarajan et al., 2015). Recently, it was found that

the *AtDRM1* and *AtDRM2* proteins can play a role as IDPs (Rae et al., 2014).

AtDRM1 has six alternatively spliced variants. While the *AtDRM1.1–AtDRM1.5* splice variants demonstrated relatively conserved transcriptional response to different stresses, the *AtDRM1.6* splice variant has a response to hormonal and salt stress (Ner-Gaon et al., 2004; Mastrangelo et al., 2012; Rae et al., 2014). Perhaps, due to the presence of alternative splicing for *AtDRM1* genes, as well as the ability to protein-protein interaction for IDPs, these proteins participate in regulating the response to abiotic stresses by protein-protein interaction.

Models of siPEP/siPROT action

To date, all the discovered small interfering proteins are characterized by small size (about 100 amino acid residues), and the obligatory presence of the domain responsible for dimerization or protein-protein interaction. Depending on other domains (for example, the DNA-binding domain or an activation domain) siPEP/siPROTs can be divided into two groups.

The first group includes siPEP/siPROTs with dimerization and an activation domain (Fig. 5, a). Such siPEP/siPROTs form a nonfunctional heterodimer with TFs to reduce DNA-binding affinity, negatively regulating the expression of genes and work as a passive repressor. Most siPEP/siPROTs are included in this group (as in ZPR and MIF proteins described above). This type of siPEP/siPROTs could also interact with TFs, acting as heterodimers with related TFs or other transcription regulators, such as DNA-binding factors.

The second group includes small proteins with dimerization and DNA-binding domains but missing an activation domain (Fig. 5, b). This type of siPEP/siPROTs develops a nonfunctional heterodimer with a TF and binds to DNA, but has no transcriptional activity or has a reduced transcriptional activity compared to functional TF homodimers (Seo et al., 2011a); thus, it acts as an active repressor.

Furthermore, heterodimer formation with siPEP/siPROTs can also taking out target TFs from the nucleus (Fig. 5, c). It was noticed for MIF protein that this group of proteins works in the “taking out from the nucleus” pathway. For example, nonfunctional heterodimer MIF-TF is excluded from the nucleus, such that it negatively regulates the work of the ZHD TFs (Hong et al., 2011).

Perhaps other ways of functional TF regulation by siPEP/siPROTs could exist.

The siPEP/siPROT with a present DNA-binding domain, but missing the activation (required for transcriptional activation) and dimerization (for protein-protein interaction) domains would theoretically be able to compete with functional monomeric TFs for DNA binding. Moreover, the siPEP/siPROT with the protein-binding domain that is involved in interactions with other proteins or cofactors could compete with functional TFs for binding with cofactors or other protein partners. This is required for TF activation. In addition, the siPEP/siPROTs with a DNA-binding domain only that form the nonfunctional homodimers siPEP/siPROT-siPEP/siPROT, would completely block the DNA binding sites for functional full-sized TFs. To date, these types of siPEP/siPROTs have not been yet identified, so the exact mechanism of regulation is difficult to predict.

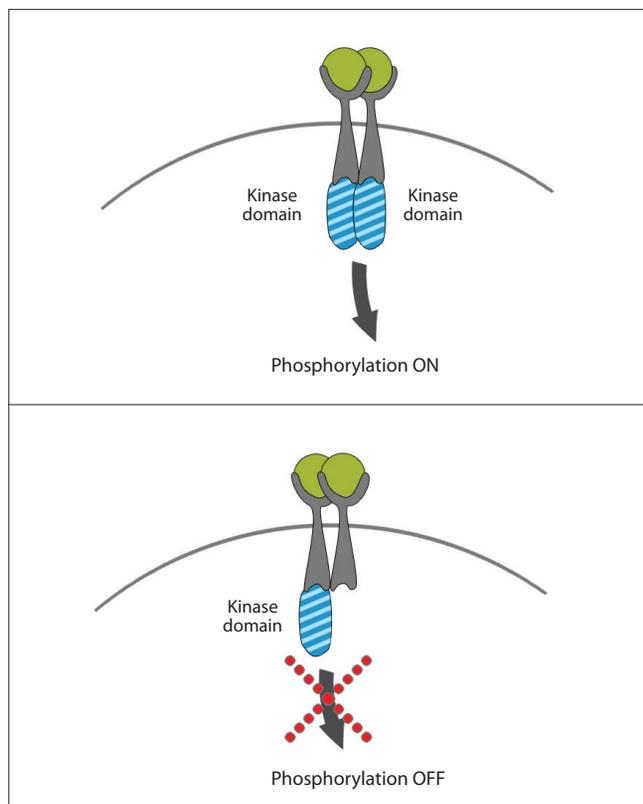


Fig. 6. Receptors could also form nonfunctional heterodimers due to lack of a domain (for example, kinase domain).

Who can play the siPEP/siPROT role

Small proteins can regulate the functional TFs by forming nonfunctional heterodimers, as well as by competing with them for DNA-binding sites. Despite some similarities to RNA interference, such as small molecular sizes and some missing biochemical activities, siPEP/siPROTs are distinct from siRNAs in that siPEP/siPROTs do not require any enzymatic stages for their action (except for the alternative splicing to generate them). The mechanism of small proteins' action is simple and easily predictable, which is useful for the creation of artificial siPEP/siPROTs for plant biotechnology.

Not only TFs, but also other proteins capable of forming dimers, e. g., receptors (including membrane), could utilize a similar mechanism of activity regulation by dimerization with small peptides/proteins (Fig. 6).

The PEPi/PROTi pathway could reduce the activity of such receptors. Moreover, the same approach could be applicable to all dimeric enzymes (e. g. acyl-ACP-thioesterase (Bhattacharjee et al., 2011), which control fatty acid deposition in seeds). This pathway plays a huge role in plant growth and developmental processes and responses to biotic and abiotic stresses as well.

Thus, small interfering peptides and proteins can actively participate in the regulation of gene expression, for example, in situations of stress or at different stages of plant development. Moreover, small interfering peptides and proteins can be used as a tool for fundamental research on the function of genes as well as for applied research for permanent or temporary knockout of genes.

Acknowledgements

Thanks are due to Marena Bartz for her critical comments and help in manuscript preparation.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grants number 14-04-31927-mol_a and 13-04-02197a.

This study was funded by the Presidium of the Russian Academy of Sciences, Program No. 41 "Biodiversity of natural systems and biological resources of Russia".

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alabadi D., Oyama T., Yanovsky M.J., Harmon F.G., Más P., Kay S.A. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*. 2001;293(5531):880-883. DOI 10.1126/science.1061320.
- Arana M.V., Marin-de la Rosa N., Maloof J.N., Blazquez M.A., Alabadi D. Circadian oscillation of gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108(22):9292-9297. DOI 10.1073/pnas.1101050108.
- Balasubramanian S., Sureshkumar S., Lempe J., Weigel D. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet*. 2006;2(7):e106. DOI 10.1371/journal.pgen.0020106.
- Bauer D., Viczian A., Kircher S., Nobis T., Nitschke R., Kunkel T., Panigrahi K.C., Adam E., Fejes E., Schafer E., Nagy F. Constitutive Photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of Phytochrome Interacting Factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2004;16(6):1433-1445. DOI 10.1105/tpc.021568.
- Bhattacharjee A., Ghosh S.K., Neogi K., Aich A., Willard B., Kinter M., Sen S.K., Ghosh D., Ghosh S. Deposition of stearate-oleate rich seed fat in *Mangifera indica* is mediated by a FatA type acyl-ACP thioesterase. *Phytochemistry*. 2011;72(2-3):166-177. DOI 10.1016/j.phytochem.2010.11.004.
- Capovilla G., Schmid M., Posé D. Control of flowering by ambient temperature. *J. Exp. Bot.* 2015;66(1):59-69. DOI 10.1093/jxb/eru416.
- Chen L., Bush S.J., Tovar-Corona J.M., Castillo-Morales A., Urrutia A.O. Correcting for differential transcript coverage reveals a strong relationship between alternative splicing and organism complexity. *Mol. Biol. Evol.* 2014;31(6):1402-1413. DOI 10.1093/molbev/msu083.
- Dong M.A., Farré E.M., Thomashow M.F. CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulate expression of the C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF) pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108(17):7241-7246. DOI 10.1073/pnas.1103741108.
- Duek P.D., Fankhauser C. HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signaling. *Plant J*. 2003;34(6):827-836.
- Feng S., Martinez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J., Wang F., Chen L., Yu L., Iglesias-Pedraz J.M., Kircher S., Schäfer E., Fu X., Fan L.M., Deng X.W. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*. 2008;451(7177):475-479. DOI 10.1038/nature06448.
- Filipowicz W., Jaskiewicz L., Kolb F.A., Pillai R.S. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005;15(3):331-341. DOI 10.1016/j.sbi.2005.05.006.
- Gu X., Le C., Wang Y., Li Z., Jiang D., Wang Y., He Y. *Arabidopsis* FLC clade members form flowering-repressor complexes coordinating responses to endogenous and environmental cues. *Nat. Commun.* 2013;4:1947. DOI 10.1038/ncomms2947.
- Harmer S.L. The circadian system in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009;60:357-377. DOI 10.1146/annurev.arplant.043008.092054.

- Hill K. Post-translational modifications of hormone-responsive transcription factors: the next level of regulation. *J. Exp. Bot.* 2015; 66(16):4933-4945. DOI 10.1093/jxb/erv273.
- Hong S.Y., Kim O.K., Kim S.G., Yang M.S., Park C.M. Nuclear import and DNA binding of the ZHD5 transcription factor is modulated by a competitive peptide inhibitor in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 2011;286(2):1659-1668. DOI 10.1074/jbc.M110.167692.
- Hong S.Y., Seo P.J., Ryu J.Y., Cho S.H., Woo J.C., Park C.M. A competitive peptide inhibitor KIDARI negatively regulates HFR1 by forming nonfunctional heterodimers in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Mol. Cells.* 2013;35(1):25-31. DOI 10.1007/s10059-013-2159-2.
- Hoppe T., Rape M., Jentsch S. Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001; 13(3):344-348.
- Horvath D.P., Anderson J.V., Chao W.S., Foley M.E. Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci.* 2003; 8(11):534-540. DOI 10.1016/j.tplants.2003.09.013.
- Hu W., Feng B., Ma H. Ectopic expression of the *Arabidopsis* *MINI ZINC FINGER1* and *MIF3* genes induces shoot meristems on leaf margins. *Plant Mol. Biol.* 2011;76(1-2):57-68. DOI 10.1007/s11103-011-9768-y.
- Hu W., Ma H. Characterization of a novel putative zinc finger gene *MIF1*: involvement in multiple hormonal regulation of *Arabidopsis* development. *Plant J.* 2006;45(3):399-422. DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02626.x.
- Huang W., Pérez-García P., Pokhilko A., Millar A.J., Antoshechkin I., Riechmann J.L., Mas P. Mapping the core of the *Arabidopsis* circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science.* 2012;336(6077):75-79. DOI 10.1126/science.1219075.
- Huq E., Quail P.H. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 2002;21(10):2441-2450. DOI 10.1093/emboj/21.10.2441.
- Hyun Y., Lee I. KIDARI, encoding a non-DNA binding bHLH protein, represses light signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 2006;61(1-2):283-296. DOI 10.1007/s11103-006-0010-2.
- Ingvardsen C., Veierskov B. Ubiquitin- and proteasome-dependent proteolysis in plants. *Physiol. Plant.* 2001;112(4):451-459.
- Johanson U., West J., Lister C., Michaels S., Amasino R., Dean C. Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science.* 2000;290(5490): 344-347.
- Kebrom T.H., Burson B.L., Finlayson S.A. Phytochrome B represses *Teosinte Branched1* expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. *Plant Physiol.* 2006;140(3): 1109-1117. DOI 10.1104/pp.105.074856.
- Kim S.G., Lee A.K., Yoon H.K., Park C.M. A membrane-bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid-mediated salt signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant J.* 2008;55(1):77-88. DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03493.x.
- Kim S.Y., Kim S.G., Kim Y.S., Seo P.J., Bae M., Yoon H.K., Park C.M. Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(1):203-213. DOI 10.1093/nar/gkl1068.
- Kim Y.S., Kim S.G., Lee M., Lee I., Park H.Y., Seo P.J., Jung J.H., Kwon E.J., Suh S.W., Paek K.H., Park C.M. HD-ZIP III activity is modulated by competitive inhibitors via a feedback loop in *Arabidopsis* shoot apical meristem development. *Plant Cell.* 2008;20(4): 920-933. DOI 10.1105/tpc.107.057448.
- Kim Y.S., Kim S.G., Park J.E., Park H.Y., Lim M.H., Chua N.H., Park C.M. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2006;18(11):3132-3144. DOI 10.1105/tpc.106.043018.
- Klemm J.D., Schreiber S.L., Crabtree G.R. Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* 1998;16: 569-592. DOI 10.1146/annurev.immunol.16.1.569.
- Lee J.H., Ryu H.S., Chung K.S., Posé D., Kim S., Schmid M., Ahn J.H. Regulation of temperature-responsive flowering by MADS-box transcription factor repressors. *Science.* 2013;342(6158):628-632. DOI 10.1126/science.1241097.
- Lee J.H., Yoo S.J., Park S.H., Hwang I., Lee J.S., Ahn J.H. Role of SVF in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 2007;21(4):397-402. DOI 10.1101/gad.1518407.
- Marquez Y., Brown J.W., Simpson C., Barta A., Kalyna M. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Res.* 2012;22(6):1184-1195. DOI 10.1101/gr.134106.111.
- Mastrangelo A.M., Marone D., Laidò G., De Leonardi A.M., De Vita P. Alternative splicing: enhancing ability to cope with stress via transcriptome plasticity. *Plant Sci.* 2012;185-186:40-49. DOI 10.1016/j.plantsci.2011.09.006.
- Michaels S.D., Amasino R.M. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell.* 1999;11(5):949-956.
- Nagel D.H., Doherty C.J., Pruneda-Paz J.L., Schmitz R.J., Ecker J.R., Kay S.A. Genome-wide identification of CCA1 targets uncovers an expanded clock network in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112(34):E4802-E4810. DOI 10.1073/pnas.1513609112.
- Ner-Gaon H., Halachmi R., Savaldi-Goldstein S., Rubin E., Ophir R., Fluhr R. Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2004;39(6):877-885. DOI 10.1111/j.1365-313X.2004.02172.x.
- Nieto C., López-Salmerón V., Davière J.M., Prat S. ELF3-PIF4 interaction regulates plant growth independently of the evening complex. *Curr. Biol.* 2015;25(2):187-193. DOI 10.1016/j.cub.2014.10.070.
- Niwa Y., Yamashino T., Mizuno T. The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2009; 50(4):838-854. DOI 10.1093/pcp/pcp028.
- Nozue K., Covington M.F., Duek P.D., Lorrain S., Fankhauser C., Harmer S.L., Maloof J.N. Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature.* 2007;448(7151):358-361. DOI 10.1038/nature05946.
- Nusinow D.A., Helfer A., Hamilton E.E., King J.J., Imaizumi T., Schultz T.F., Farré E.M., Kay S.A. The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature.* 2011;475(7356):398-402. DOI 10.1038/nature10182.
- Park M.J., Seo P.J., Park C.M. CCA1 alternative splicing as a way of linking the circadian clock to temperature response in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 2012;7(9):1194-1196. DOI 10.4161/psb.21300.
- Posé D., Verhage L., Ott F., Yant L., Mathieu J., Angenent G.C., Imminck R.G., Schmid M. Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature.* 2013;503(7476):414-417. DOI 10.1038/nature12633.
- Prigge M.J., Otsuga D., Alonso J.M., Ecker J.R., Drews G.N., Clark S.E. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell.* 2005;17(1):61-76. DOI 10.1105/tpc.104.026161.
- Puranik S., Sahu P.P., Srivastava P.S., Prasad M. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2012;17(6):369-381. DOI 10.1016/j.tplants.2012.02.004.
- Rae G.M., David K.M., Wood M. The dormancy marker *DRM1/ARP* associated with dormancy but a broader role in *planta*. *Dev. Biol. J.* 2013;632524. DOI 10.1155/2013/632524.
- Rae G.M., Uversky V.N., David K., Wood M. *DRM1* and *DRM2* expression regulation: potential role of splice variants in response to stress and environmental factors in *Arabidopsis*. *Mol. Genet. Genomics.* 2014;289(3):317-332. DOI 10.1007/s00438-013-0804-2.
- Rangarajan N., Kulkarni P., Hannenhalli S. Evolutionarily conserved network properties of intrinsically disordered proteins. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126729. DOI 10.1371/journal.pone.0126729.
- Sainsbury S., Bernecky C., Cramer P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015; 16(3):129-143. DOI 10.1038/nrm3952.

- Scortecci K.C., Michaels S.D., Amasino R.M. Identification of a MADS-box gene, *FLOWERING LOCUS M*, that represses flowering. *Plant J.* 2001;26(2):229-236.
- Seo P.J., Hong S.Y., Kim S.G., Park C.M. Competitive inhibition of transcription factors by small interfering peptides. *Trends Plant Sci.* 2011a;16(10):541-549. DOI 10.1016/j.tplants.2011.06.001.
- Seo P.J., Kim M.J., Ryu J.Y., Jeong E.Y., Park C.M. Two splice variants of the IDD14 transcription factor competitively form nonfunctional heterodimers, which may regulate starch metabolism. *Nat. Commun.* 2011b;2:303. DOI 10.1038/ncomms1303.
- Seo P.J., Park M.J., Lim M.H., Kim S.G., Lee M., Baldwin I.T., Park C.M. A self-regulatory circuit of CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 underlies the circadian clock regulation of temperature responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2012;24(6):2427-2442. DOI 10.1105/tpc.112.098723.
- Seo P.J., Park M.J., Park C.M. Alternative splicing of transcription factors in plant responses to low temperature stress: mechanisms and functions. *Planta.* 2013;237(6):1415-1424. DOI 10.1007/s00425-013-1882-4.
- Shahbazian M.D., Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* 2007;76:75-100. DOI 10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114.
- Sheldon C.C., Burn J.E., Perez P.P., Metzger J., Edwards J.A., Peacock W.J., Dennis E.S. The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell.* 1999;11(3):445-458.
- Song J., Angel A., Howard M., Dean C. Vernalization – a cold-induced epigenetic switch. *J. Cell. Sci.* 2012;125(Pt.16):3723-3731. DOI 10.1242/jcs.084764.
- Soy J., Leivar P., González-Schain N., Sentandreu M., Prat S., Quail P.H., Monte E. Phytochrome-imposed oscillations in PIF3 protein abundance regulate hypocotyl growth under diurnal light/dark conditions in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2012;71(3):390-401. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2012.04992.x.
- Soy J., Leivar P., Monte E. PIF1 promotes phytochrome-regulated growth under photoperiodic conditions in *Arabidopsis* together with PIF3, PIF4, and PIF5. *J. Exp. Bot.* 2014;65(11):2925-2936. DOI 10.1093/jxb/ert465.
- Stafstrom J.P., Ripley B.D., Devitt M.L., Drake B. Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. Cloning and expression of *PsDRM1* and *PsDRM2*. *Planta.* 1998;205(4):547-552. DOI 10.1007/s004250050354.
- Sun X., Jones W.T., Harvey D., Edwards P.J., Pascal S.M., Kirk C., Considine T., Sheerin D.J., Rakonjac J., Oldfield C.J., Xue B., Dunker A.K., Uversky V.N. N-terminal domains of DELLA proteins are intrinsically unstructured in the absence of interaction with GID1/gibberellic acid receptors. *J. Biol. Chem.* 2010;285(15):11557-11571. DOI 10.1074/jbc.M109.027011.
- Sun X., Xue B., Jones W.T., Rikkerink E., Dunker A.K., Uversky V.N. A functionally required unfoldome from the plant kingdom: intrinsically disordered N-terminal domains of GRAS proteins are involved in molecular recognition during plant development. *Plant Mol. Biol.* 2011;77(3):205-223. DOI 10.1007/s11103-011-9803-z.
- Tatematsu K., Ward S., Leyser O., Kamiya Y., Nambara E. Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2005;138(2):757-766. DOI 10.1104/pp.104.057984.
- Uversky V.N., Dunker A.K. Understanding protein non-folding. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1804(6):1231-1264. DOI 10.1016/j.bbapap.2010.01.017.
- Vaucheret H., Béclin C., Fagard M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 2001;114(Pt.17):3083-3091.
- Verhage L., Angenent G.C., Immink R.G. Research on floral timing by ambient temperature comes into blossom. *Trends Plant Sci.* 2014;19(9):583-591. DOI 10.1016/j.tplants.2014.03.009.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 2004;9(5):244-252. DOI 10.1016/j.tplants.2004.03.006.
- Wenkel S., Emery J., Hou B.H., Evans M.M., Barton M.K. A feedback regulatory module formed by LITTLE ZIPPER and HD-ZIP III genes. *Plant Cell.* 2007;19(11):3379-3390. DOI 10.1105/tpc.107.055772.
- Wood M., Rae G.M., Wu R.M., Walton E.F., Xue B., Hellens R.P., Uversky V.N. *Actinidia* DRM1 – an intrinsically disordered protein whose mRNA expression is inversely correlated with spring bud-break in kiwifruit. *PLoS One.* 2013;8(3):e57354. DOI 10.1371/journal.pone.0057354.
- Yamashino T., Nomoto Y., Lorrain S., Miyachi M., Ito S., Nakamichi N., Fankhauser C., Mizuno T. Verification at the protein level of the PIF4-mediated external coincidence model for the temperature-adaptive photoperiodic control of plant growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 2013;8(3):e23390. DOI 10.4161/psb.23390.
- Zhang J.Z., Li Z.M., Mei L., Yao J.L., Hu C.G. *PtFLC* homolog from trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) is regulated by alternative splicing and experiences seasonal fluctuation in expression level. *Planta.* 2009;229(4):847-859. DOI 10.1007/s00425-008-0885-z.
- Zhang X.N., Wu Y., Tobias J.W., Brunk B.P., Deitzer G.F., Liu D. HFR1 is crucial for transcriptome regulation in the cryptochrome 1-mediated early response to blue light in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 2008;3(10):e3563. DOI 10.1371/journal.pone.0003563.

ORCID ID

A.O. Vyacheslavova orcid.org/0000-0003-0620-1172

I.A. Abdееva orcid.org/0000-0002-6921-992X

S.A. Bruskin orcid.org/0000-0003-0653-7418

Соцветие злаков: особенности строения, развития и генетической регуляции морфогенеза

О.Б. Добровольская^{1, 2}✉, А.Е. Дресвянникова^{1, 3}

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

² Всероссийский центр карантина растений, Московская область, Раменский район, п. Быково, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Злаки (Poaceae Barnh.) – самое крупное семейство покрытосеменных растений, произрастающих на всех континентах земного шара и составляющих значительную часть многих биоценозов. К этому семейству принадлежат такие важные сельскохозяйственные культуры, как рис, кукуруза, пшеница, ячмень, рожь, сахарный тростник. Качественные и количественные характеристики соцветий злаков непосредственно связаны с продуктивностью и определяются особенностями развития. В обзоре рассмотрены современные представления о строении и развитии соцветий злаков, а также результаты исследований генетических механизмов, регулирующих их формирование. Соцветия всех злаковых характеризуются общей чертой: цветки развиваются в составе определенной структуры – колоска, строение и общие черты развития которого сходны у всех злаков. У большинства представителей злаковых соцветие имеет сложное строение. Длина и особенности строения главной оси соцветия, наличие и степень ветвления, расположение и развитие боковых веточек обуславливают большое разнообразие в строении соцветий. Сложные соцветия злаков формируются из меристем нескольких типов. Переход от функционирования одной меристемы к другой – многоступенчатый процесс, в регуляцию которого вовлечено множество генов. Гены, управляющие развитием соцветия злаков, были идентифицированы благодаря использованию мутантов (в основном кукурузы и риса), у которых нарушена морфология соцветия и цветка; большая часть этих генов контролирует инициацию и судьбу меристем. Наличие некоторых генетических механизмов, регулирующих развитие соцветия злаков, подтверждают модели, ранее открытые у двудольных растений. Вместе с тем показано, что существуют процессы развития, специфичные только для соцветий злаков, и появляются новые модули в их генетической регуляции, в частности связанные с формированием разветвленного соцветия. Кроме того, важный аспект генетической регуляции – наличие «слабых» аллелей, не вызывающих тератологических нарушений в строении соцветия, но вносящих вклад в изменчивость количественных признаков под контролем генов развития, например генов сигнального пути CLAVATA злаков. Наличие таких «слабых» аллелей, связанных с продуктивностью, является основанием для их дальнейшего использования в селекционных программах.

Ключевые слова: злаки; соцветие; меристемы; идентичность меристем; детерминированность меристем.

Cereal inflorescence: features of morphology, development and genetic regulation of morphogenesis

O.B. Dobrovolskaya^{1, 2}✉, A.E. Dresvyannikova^{1, 3}

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

² All-Russian Plant Quarantine Centre, Bykovo, Ramenskoe district, Moscow region, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Cereals (Poaceae Barnh.) are the largest family of monocotyledonous flowering plants growing on all continents and constituting a significant part of Earth's many ecological communities. The Poaceae includes many important crops, such as rice, maize, wheat, barley, and rye. The qualitative and quantitative characteristics of cereal inflorescences are directly related to yield and are determined by the features of inflorescence development. This review considers modern concepts of the morphology, development and genetic mechanisms regulating the cereal inflorescence development. A common feature of cereal inflorescences is a spikelet, a reduced branch that bears florets with a similar structure and common scheme of development in all cereals. The length and the structure of the main axis, the presence and type of lateral branches cause a great variety of cereal inflorescences. Complex cereal inflorescences are formed from meristems of several types. The transition from the activity of one meristem to another is a multi-step process. The genes involved in the control of the cereal inflorescence development have been identified using mutants (mainly maize and rice) with altered inflorescence and floret morphology; most of these genes regulate the initiation and fate of meristems. The presence of some genetic mechanisms in cereals confirms the models previously discovered in dicotyledonous plants; on the other hand, there are cereal-specific developmental processes that are controlled by new modules of genetic regulation, in particular, associated with the formation of a branched inflorescence. An important aspect is the presence of quantitative variability of traits under the control of developmental genes, which is a prerequisite for the use of weak alleles contributing to the variability of plant growth and yield in breeding programs (for example, genes of the CLAVATA signaling pathway).

Key words: cereals; inflorescence; meristems; meristem identity; meristem determinacy.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Добровольская О.Б., Дресвянникова А.Е. Соцветие злаков: особенности строения, развития и генетической регуляции морфогенеза. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):766-775. DOI 10.18699/VJ18.420

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Dobrovolskaya O.B., Dresvyannikova A.E. Cereal inflorescence: features of morphology, development and genetic regulation of morphogenesis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):766-775. DOI 10.18699/VJ18.420 (in Russian)

Received 25.05.2018

Accepted for publication 27.06.2018

© AUTHORS, 2018

Злаки Poaceae Barnh. (Gramineae Juss.) – самое крупное семейство покрытосеменных растений, которое включает около 8000 видов, 500 родов, объединенных в 60–80 триб и несколько подсемейств (Цвелев, 1976), произрастающих на всех континентах земного шара и составляющих значительную часть многих биоценозов. К этому семейству принадлежат такие важные сельскохозяйственные культуры, как пшеница, рис, кукуруза, а также ячмень, рожь, овес, сорго, просо, сахарный тростник и др. Важное экономическое значение зерновых злаков, прежде всего риса, пшеницы, кукурузы, ячменя, и непрерывающиеся работы по селекции этих сельскохозяйственных культур требуют детального изучения и глубокого понимания молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе формирования хозяйственно ценных признаков, процессов адаптации и развития в целом. Качественные и количественные характеристики соцветия злаков непосредственно связаны с продуктивностью. Особенности развития соцветия определяют его архитектуру, и идентификация генов, управляющих развитием соцветия, установление их структуры и функций – необходимое условие для определения мишеней направленного воздействия на программы развития соцветия и на связанные с продуктивностью признаки злаков.

Таким образом, изучение особенностей развития соцветий злаков, важных зерновых культур, имеет очевидную практическую значимость. Исследованиям генетических аспектов развития соцветий традиционно уделялось большое внимание, и они по-прежнему актуальны. Основная цель представленного обзора – обобщить результаты исследований, посвященных изучению особенностей развития и генетической регуляции морфогенеза соцветий злаков, полученных к настоящему времени.

Особенности строения соцветий злаков

У представителей семейства злаков (Poaceae) цветки собраны в соцветия. У всех злаковых, за исключением одной, рано дивергировавшей ветви подсемейства Anomochlooideae, соцветия характеризуются общей чертой – цветки развиваются в составе определенной структуры – колоска. Н.Н. Цвелев (1976) определял колосок как элементарное соцветие злаковых, а в современной англоязычной литературе колосок обычно рассматривают как укороченную/редуцированную веточку, при этом термин “spikelet” обозначает миниатюрный колос (Malcomber et al., 2006). У всех злаков колосок имеет сходное строение и общие черты развития. Колосок большинства злаков содержит цветки, состоящие из завязи, пыльников, лодикул, цветковых чешуй, заключенных в колосковые чешуи. Многоцветковый колосок состоит из оси колоска (rachilla), на которой поочередно двумя рядами расположены цветки, заключенные в цветковые чешуи, а у основания колоска располагается пара брактей (чешуевидные прицветные листья), не имеющих цветков, верхняя и нижняя колосковые чешуи (glumae). Размер колосковых чешуй злаков варьирует от очень крупных, охватывающих весь колосок, до мелких или даже полностью редуцированных. В многоцветковых колосках они часто сходны по строению с

нижними цветковыми чешуями (Цвелев, 1976). У представителей подсемейства Anomochlooideae колоска как такового нет, но имеется его эквивалент, лишенный колосковых и цветковых чешуй (Clark, Judziewicz, 1996). Подсемейство Pharoideae – самая ранняя эволюционная ветвь, у которой наблюдается формирование типичного колоска (Malcomber et al., 2006). Число цветков в колоске злаков варьирует от 1 до 10 (иногда до 30). Н.Н. Цвелев (1976) рассматривает одноцветковые и двухцветковые колоски в качестве редукции первичных многоцветковых колосков, полагая, что эволюция колосков шла по пути уменьшения числа цветков, но сами колоски образовывали сложные соцветия. S.T. Malcomber с коллегами (2006) сообщают, что появление многоцветкового колоска у злаков происходит после отделения эволюционной ветви Pharoideae. Таким образом, колосок представляет собой элементарное соцветие в составе сложного соцветия злаков.

Соцветие немногочисленных представителей злаков (например, рода *Lygeum*) представлено единственным терминальным (верхушечным) колоском, у большинства представителей злаковых оно имеет более сложное строение. Длина и особенности строения главной оси соцветия, степень ветвления, расположение и развитие боковых веточек обуславливают большое разнообразие в строении соцветий злаков.

В классической таксономической литературе колосок принято рассматривать в качестве аналога цветка как терминальной структуры боковой оси соцветия (Malcomber et al., 2006), на основании чего соцветия злаков были разделены на следующие типы:

- 1) колос – соцветие, у которого колоски находятся непосредственно на оси колосового стержня (сидячие колоски), как у пшеницы, ржи и ячменя;
- 2) метелка представляет собой разветвленное соцветие, колоски которого развиваются на боковых осях (веточках) разного порядка. Метелка встречается у большинства представителей злаков, включая рис, овсы, сорго, просо;
- 3) кисть (или кистевидная метелка) – соцветие, колоски которого расположены на главной оси на ножках (стебельках), например соцветие представителей рода *Braichypodium* (коротконожка).

Соцветие злаков может быть как терминальным (или верхушечным), так и аксиальным, формироваться в пазухах листа. У большинства злаков морфология терминального и аксиальных соцветий одинакова, исключение составляют представители трибы Andropogoneae (кукуруза, сорго, сахарный тростник), аксиальные соцветия которых менее разветвлены (Malcomber et al., 2006). Наиболее это выражено у кукурузы *Zea mays* ssp. *mays*, терминальное соцветие которой (метелка) разветвлено, а аксиальное соцветие (початок – колосовидное соцветие с утолщенной осью) не разветвлено.

Соцветие представителей трибы Triticeae, к которому относятся важные зерновые культуры – пшеница, ячмень и рожь, представляет собой колос и в норме не разветвлено; колоски расположены непосредственно на главной оси колоса, на уступах колосового стержня. У гексаплоидной мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. (BBAADD) рост главной оси колоса детерминирован и заканчивается фор-

мированием верхушечного (терминального колоска), у диплоидной пшеницы *T. monococcum* L. (AA) терминальный колосок либо рудиментарен, либо отсутствует (Bonnet, 1936). В отличие от пшеницы, рост оси колоса ячменя *Hordeum vulgare* L. не детерминирован и колос не имеет верхушечного/терминального колоска (Bonnet, 1936).

Число латеральных сидячих колосков на уступах колосового стержня может различаться и является важной таксономической характеристикой, оно может быть фиксированным или варьировать (Muramatsu, 2009; Sakuma et al., 2011). Так, у пшеницы и ржи на уступах колосового стержня располагается по одному сидячему колоску, а у ячменя – либо один (двурядный колос), либо три колоска (шестирядный колос). Нефиксированное число колосков на уступе формируется у представителей рода *Elymus* (Muramatsu, 2009).

Особенности развития соцветий злаков

Меристемы – образовательные ткани растений, содержащие пул стволовых клеток (Батыгина, 2014). Особенности архитектуры растений в большой степени определяются активностью первичных меристем, которые закладываются в ходе эмбрионального развития, – апикальной меристемы побега (ПАМ) и корня (КАМ). Меристемы ПАМ и КАМ обеспечивают рост осевых органов – побега и главного корня – и формирование надземной и подземной частей растения. Во время вегетативной фазы развития ПАМ последовательно инициирует листовые примордии (зачатки). В пазухах листа формируются вторичные аксиальные меристемы, которые затем развиваются во вторичные побеги. В результате перехода растения от вегетативной стадии развития к генеративной происходит преобразование апикальной меристемы побега в меристему нового типа – меристему соцветия. У некоторых видов растений, например *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ПАМ напрямую инициирует меристему цветка, у злаков развиваются промежуточные типы меристем. Переход от функционирования одной меристемы к другой – сложный многоступенчатый процесс, в регуляцию которого вовлечено множество генов. Соцветие метельчатых злаков, таких как рис, кукуруза (мужское соцветие), сорго, состоит из главной оси, длинных веточек и колосков, а колос пшеницы, ржи и ячменя – из главной оси и колосков. Каждая из этих уникальных структур развивается из определенного типа специализированных меристем, их обычно называют в зависимости от органов, которым они дают начало, – меристемы веточек, меристемы колосков и др. Таким образом, сложное соцветие злаков формируется из меристем нескольких типов.

Каждую меристему характеризуют два основных свойства: идентичность и детерминированность. Идентичность меристемы определяется по типу зачатков органов, инициируемых данной меристемой (Bartlett, Thompson, 2014). Детерминированные меристемы представлены группами клеток, которые постепенно расходуются после инициации определенного (как правило, фиксированного) числа органов, а недетерминированные, напротив, образуются из самовозобновляемого пула клеток и продолжают производить структуры (стебель, листья, веточки, цвет-

ки) на протяжении жизненного цикла растений (Bartlett, Thompson, 2014). Для большинства цветковых растений детерминированность меристемы означает переход к установлению идентичности цветковой меристемы, однако злаки являются исключением, их меристемы соцветия могут быть детерминированы способами, которые предшествуют или не связаны с приобретением идентичности флоральных меристем. Для фенологического описания развития соцветия злаков была предложена «гомеотическая» модель переключения идентичности меристем, в рамках которой меристемы проходят через ряд последовательных преобразований от меристемы соцветия к цветковым меристемам (McSteen et al., 2000; Laudencia-Chingcuanco et al., 2002).

Общая схема развития соцветия злаков выглядит следующим образом: переход к генеративной фазе, когда апикальная меристема побега преобразуется в меристему соцветия, сопровождается быстрым увеличением ее размера и нередко сменой филлотаксиса (порядка расположения органов относительно главной оси) (Taguchi-Shiobara et al., 2001; Bartlett, Thompson, 2014). Далее меристема соцветия формирует главную ось соцветия и дает начало латеральным меристемам боковых осей соцветия (другое название – первичные аксиальные меристемы соцветия или меристемы веточек у метельчатых злаков), которые, в свою очередь, могут давать начало латеральным меристемам следующего порядка и далее могут либо прекращать развитие, либо переходить к формированию колоска. Колосковая меристема может быть детерминированной, и ее развитие заканчивается закладкой терминального цветка после формирования определенного числа цветков (рис, кукуруза, ячмень), или недетерминированной и инициировать неопределенное число цветков перед тем, как дегенерировать (брахиподиум, пшеница).

Е.А. Kellog с коллегами (2013) при изучении морфологии соцветия злаков предложила принимать во внимание отдельные компоненты фенотипа как модули, которые могут комбинироваться различными способами, с учетом особенностей их развития. Формирование меристем соцветия злаков может идти по трем различным путям: 1) терминироваться развитием колоска, 2) давать начало меристемам следующего порядка или 3) прекращать развитие. Если меристема дает начало латеральной меристеме следующего порядка, то эта меристема, в свою очередь, также может развиваться по одному из трех описанных выше путей и, что важно, каждый этап развития оси следующего порядка не зависит от предыдущего, таким образом, в процессе эволюции могут реализоваться любые комбинации. Так, если меристема соцветия дает начало единственной колосковой меристеме, соцветие представлено единственным терминальным колоском, что у злаков встречается редко (род *Lygeum*). У большинства злаков меристема соцветия дает начало латеральным меристемам, которые либо сразу терминируются развитием колоска (*Brachyelytrum*), либо дают начало меристемам осей следующего порядка, в результате чего происходит ветвление соцветия (метельчатые злаки). Пути развития меристемы соцветия и латеральных меристем, как правило, различаются (Malcomber et al., 2006). Таким образом,

модификации основной схемы развития соцветия злаков приводят к разнообразию форм соцветий злаков.

У риса меристема соцветия сначала инициирует первичные аксиальные меристемы (меристемы веточек), которые дают начало вторичным аксиальным меристемам и на более поздних этапах развития – колосковым меристемам. Таким образом, колосковые меристемы инициируются из первичных и вторичных аксиальных меристем соцветия, и каждая дает начало одному фертильному цветку, двум стерильным цветковым чешуйкам и паре колосковых чешуек. Колосковые чешуйки в большой степени редуцированы и называются рудиментарными (Thompson, Nake, 2009). Для соцветий кукурузы и мужского, и женского типов характерно развитие парных колосковых меристем, которые встречаются только у представителей *Andropogoneae*. Несмотря на существенную разницу в морфологии женского и мужского соцветий кукурузы, развитие их идет сходным образом, и основное различие заключается в том, что у мужского соцветия (метелки) в отличие от женского соцветия (початка) формируются меристемы веточек (Bommert et al., 2005b; Thompson, Nake, 2009). Главная особенность развития колоса представителей трибы *Triticeae* (пшеницы, ячменя, ржи и др.) – отсутствие меристем веточек; колосковые меристемы инициируются непосредственно меристемой соцветия. Различия в развитии соцветий между отдельными представителями трибы связаны не с наличием/отсутствием специфичных меристем, а с особенностями их функционирования. Так, меристема соцветия у мягкой пшеницы терминируется, а у ячменя не детерминирована, колосковая меристема пшеницы, напротив, не детерминирована, а ячменя – детерминирована. При этом у ячменя формируются три колосковые меристемы, центральный колосок всегда развивается полностью, а латеральные могут быть либо полностью развиты, либо стерильны (или в них развиваются только тычинки), в результате чего формируется либо двурядный, либо шестирядный колос (Pourkheirandish, Komatsuda, 2007). Развитие колоса пшеницы идет по следующему пути: меристема соцветия последовательно дает начало латеральным меристемам, которые развиваются в латеральные колоски (колосковые меристемы), пока не сформируется терминальный (верхушечный) колосок. Каждая латеральная (колосковая) меристема развивается в единственный латеральный колосок, состоящий из множества цветков (Bonnet, 1936). Колосковая меристема инициирует органы колоска и флоральной меристемы, которые появляются в следующей последовательности: первыми становятся различимыми примордии двух колосковых чешуй, затем инициируются флоральные меристемы и на их периферии формируются примордии двух цветковых чешуй, далее происходит дифференцировка органов цветка (двух лодикул, пестика и трех тычинок). Колосок пшеницы недетерминированный и состоит из нескольких цветков, которые развиваются акропетально. Недетерминированный характер колосковых меристем присущ всем видам пшеницы, независимо от уровня плоидности (Shitsukawa et al., 2009). Число фертильных цветков в колоске зависит от общего числа цветковых меристем и числа цветков с гипоплазией. У цветков дистальной части колоска обнаружено два типа гипоплазии: органы цветка инициируются,

но не развиваются полностью (диплоидные пшеницы), органы цветка закладываются и развиваются, но цветки стерильны (тетраплоидные и гексаплоидные виды пшеницы), в результате чего у диплоидных видов пшеницы фертильным оказывается только один базальный цветок, у тетраплоидных – чаще всего два и у гексаплоидных – четыре-пять. Таким образом, гетерохрония в развитии цветков колоска у видов пшеницы разного уровня плоидности служит причиной различий в числе зерновок в колоске зрелого колоса (Shitsukawa et al., 2009).

Полагают, что метелка – более примитивная форма соцветия и колос появился позднее в ходе эволюции (Sakuma et al., 2011).

Генетическая регуляция морфогенеза соцветий злаков

Кукуруза (*Z. mays*) и рис (*O. sativa*) – модельные виды злаков, у которых генетическая регуляция развития соцветия наиболее изучена. Прежде всего, это связано с доступностью генетических ресурсов, разработкой молекулярных и биотехнологических подходов анализа геномов и результатов секвенирования геномов. Так, у кукурузы получены многочисленные мутанты с измененной морфологией соцветия, а рис – первый вид злаков, геном которого был секвенирован и к настоящему времени хорошо аннотирован, что дало возможность позиционного клонирования. Кроме того, у риса хорошо разработаны методы трансформации, и, таким образом, возможна функциональная валидация полученных результатов. В последнее время число модельных видов злаков увеличилось и включает *Brachypodium distachyon*, ячмень *H. vulgare*, и недавно, – сетарию итальянскую *Setaria italica* (Bommert, Whipple, 2017). Синтения геномов злаков позволила проводить позиционное клонирование у видов злаков, с менее изученным геномом. Гены, управляющие развитием соцветия, были идентифицированы благодаря использованию мутантов (в основном кукурузы и риса), у которых нарушена морфология соцветия и цветка; большая часть этих генов регулирует инициацию и судьбу меристем (Bommert et al., 2005b; Sreenivasulu, Schnurbusch, 2012).

Переход от вегетативной стадии развития к генеративной или инициация цветения растений происходит под действием внешних и внутренних стимулов. Этот этап развития не проявляется морфологически, но на его протяжении происходят важные физиологические изменения, в основе которых лежат молекулярно-генетические преобразования. Известны холодовой, фотопериодический, гиббереллиновый и автономный сигнальные пути индукции цветения (Лутова и др., 2010).

Роль ортологов гена *LFY/FLO* в развитии соцветий злаков

Гены ортологи двудольных модельных видов *Arabidopsis thaliana* *LEAFY* (*LFY*) и *Antirrhinum majus* *FLORICAULA* (*FLO*) играют ключевую роль в формировании флоральной меристемы, являясь интеграторами информации, поступающей от разных путей инициации цветения (Лутова и др., 2010). Гены *LFY* и *FLO* кодируют транскрипционные факторы (ТФ), специфичные только для растений. У мутантов *flo* и *lfy* нарушен метаморфоз побега в цвет-

ки, что приводит к формированию вегетативных побегов вместо цветков и цветков с аномалиями. У кукурузы *Z. mays* были идентифицированы две копии гомологов *ZFL1* (*Z. mays FLO/LFY 1*) и *ZFL2* (*Z. mays FLO/LFY 2*). Анализ двойных мутантов *zfl1zfl2* обнаружил нарушения в идентичности и детерминированности флоральных меристем и мужского, и женского соцветий. Гены *ZFL1* и *ZFL2* экспрессируются в меристемах соцветия, высокий уровень экспрессии наблюдается в парных колосковых меристемах и сохраняется во флоральных меристемах на стадии инициации органов цветка (Bommert et al., 2005b). Паттерн экспрессии генов *FLO/LFY* двудольных и генов *ZFL1* и *ZFL2* кукурузы совпадает, что наряду со сходством мутантных фенотипов предполагает консервативность функций генов ортологов у двудольных и *Z. mays*. Паттерн экспрессии гена риса *RFL* (rice *FLORICAULA/LEAFY*), гомолога *FLO/LFY*, отличается: ген экспрессируется в апикальных участках развивающегося соцветия на ранних этапах развития, но не экспрессируется ни в первичных и/или вторичных аксиальных меристемах веточек, ни во флоральных меристемах. Транскрипты *FLO/LFY* обнаружены в эпидермальных клетках листа. N.N. Rao с коллегами (2008) показали, что снижение уровня экспрессии гена *RFL* вызывает существенную задержку перехода растения к цветению, вплоть до отсутствия цветения, а повышенный уровень экспрессии приводит к ускоренному переходу к цветению. Кроме того, снижение уровня экспрессии *RFL* влияет на архитектуру соцветия, уменьшая число первичных веточек, содержащих несколько колосков с фертильными цветками, и приводя к полной редукции вторичных веточек. Полный нокадаун экспрессии *RFL* приводит к редукции вторичных побегов растения (Rao et al., 2008). В 2012 г. был охарактеризован мутант риса *aberrant panicle organization 2* (*apo2*), у которого наблюдалось уменьшение размера метелки и числа веточек в результате более раннего развития колосковых меристем и нарушения развития цветка, укорочение пластохрона (Ikeda et al., 2012). В результате позиционного клонирования был выделен ген, отвечающий за мутантный фенотип, им оказался ген *APO2*, идентичный ранее изученному гену *RFL* (Ikeda et al., 2012). Таким образом, *RFL* (*APO2*) риса является мастер-регулятором различных генетических путей, управляющих процессами развития. У мутантов *lfy* арабидопсиса, экспрессирующих ген риса *RFL*, наблюдается неполное восстановление функций, таким образом, функции генов *LFY/FLO* и *RFL* совпадают только частично. Ортолог *FLO/LFY* был выделен в геноме мягкой пшеницы (Shitsukawa et al., 2006). Было установлено, что паттерн экспрессии *WFL* (wheat *FLORICAULA/LEAFY*) в соцветии сходен с *RFL* риса: ген не экспрессируется в цветковых меристемах, транскрипты *WFL* обнаружены в тканях развивающегося соцветия и цветковых чешуях, на основании чего предположено, что и функции *RFL* и *WFL* в развитии соцветия сходны (Shitsukawa et al., 2006). Таким образом, наблюдается частичная дивергенция функций генов *LFY* (*FLO*) двудольных растений, играющих ключевую роль в формировании флоральной меристемы, и их гомологов у злаков, у которых гомологичные гены также участвуют в развитии соцветия и вегетативных органов (ген *RFL*).

Консервативность сигнального пути CLAVATA-WUSCHEL, координирующего пролиферацию и дифференцировку клеток меристем высших растений

Число аксиальных меристем, инициируемых меристемами соцветия кукурузы и риса, зависит от их размера и находится под контролем генов, гомологичных генам *A. thaliana* *CLAVATA* (*CLV1*, 2, 3). Сигнальный путь *CLAVATA-WUSCHEL* координирует пролиферацию и дифференцировку клеток меристем, являясь основным в регуляции гомеостаза меристем высших растений, он впервые был обнаружен и изучен у арабидопсиса (Somssich et al., 2016). Ген *WUSCHEL* (*WUS*) кодирует гомеодомен-содержащий транскрипционный фактор, который экспрессируется в организующем центре (ОЦ) центральной зоны апикальной меристемы. Функция гена – поддержание пула стволовых клеток (Mayer et al., 1998). У мутантов *clavata* (*clv1*, 2, 3) арабидопсиса увеличено число клеток центральной зоны ПАМ, что приводит к увеличению числа органов цветка, плодolistиков, фасциации стебля, формированию плода «матрешка». На основании этого было предположено, что гены *CLV* негативно регулируют экспрессию *WUS*, ограничивая область его экспрессии в ПАМ (Лутова и др., 2010). Ген *CLV1* кодирует трансмембранную рецепторную киназу, а *CLV2* – рецептор-подобный белок, имеющий значительное сходство с *CLV1*, но без цитоплазматического киназного домена. Ген *CLV3* кодирует небольшой секреторный пептид из 96 аминокислот, содержащий CLE-домен (*CLAVATA3* (*CLV3*)/*ENDOSPERM SURROUNDING REGION* (*ESR*)). Белок *CLV3* представляет собой лиганд, который связывается с рецепторами *CLV1*, *CLV2* (Лутова и др., 2010; Somssich et al., 2016). Ген кукурузы *THIK TASSEL DWARF 1* (*TD1*) кодирует LRR-рецепторную киназу и гомологичен гену *CLV1*. Мутанты *td1* имеют выраженную фасциацию оси женского соцветия и существенное увеличение числа рядов в початке (Bommert et al., 2005a). У мутанта риса *floral organ number1* (*fon1*) наблюдается увеличение размера флоральной меристемы и числа органов цветка; *FON1* кодирует белок с высокой степенью гомологии с *TD1* и *CLV1* (Suzaki et al., 2004). Ген *OsLRK1* риса также является *CLV1*-подобным геном, его сайленсинг в результате РНК-интерференции приводит к увеличению числа органов цветка (Kim et al., 2000). Наряду с *fon1* у риса выявлены другие мутанты, *fon2-1*, *fon2-2* и *fon3*, со сходным фенотипом соцветия, связанным с увеличением размера меристемы соцветия и числа органов цветка (Nagasawa et al., 1996; Jiang et al., 2005).

Ген кукурузы *FASCATED EAR 2* (*FEA2*) кодирует белок, гомологичный *CLV2* (Taguchi-Shiobara et al., 2001). У *fea2*-мутантов существенно увеличен размер меристемы соцветия, часто увеличен размер аксиальных меристем соцветия и флоральных меристем, что приводит к формированию початка с увеличенным числом рядов и дополнительных органов цветка (Taguchi-Shiobara et al., 2001). Двойные мутанты *td1fea2* имеют более выраженный мутантный фенотип по сравнению с фенотипами каждого отдельного мутанта *td1* и *fea2*, что предполагает принадлежность генов к различным генетическим путям регуляции (Bommert et al., 2005c). Было показано, что *CLV2* арабидопсиса также принадлежит независимому

сигнальному пути и формирует рецепторный комплекс с белком CRN (Müller et al., 2008). Недавно обнаружен еще один ген кукурузы *FASCATED EAR3 (FEA3)*, кодирующий LRR-рецепторную киназу CLV-типа; мутации гена вызывают сходные с *fea2* и *td1* фенотипические проявления – увеличение размера меристемы соцветия. Двойные мутанты *fea3fea2* имеют более выраженный мутантный фенотип, что предполагает синергистическое взаимодействие генов и наличие общей мишени (Je et al., 2016). Ген экспрессируется в области меристемы, окружающей ОЦ, и отвечает на CLE (пептидные) сигналы от зачатков органов (Je et al., 2016). Обнаружено, что ген *FEA2* локализуется на генетической карте с QTL, определяющим число рядов зерен в початке и, таким образом, может иметь большое значение для повышения урожайности (Taguchi-Shiobara et al., 2001). Найдены «слабые» аллели генов *fea2* и *fea3*, которые увеличивают число рядов зерен в початке, не вызывая при этом изменений в морфологии соцветия – укорочение или фасциацию (Bommert et al., 2013; Je et al., 2016).

Ген риса *FLORAL ORGAN NUMBER 2 (FON2)* кодирует небольшой секреторный белок и является предполагаемым ортологом гена *CLV3* (Suzaki et al., 2004; Chu et al., 2006). У мутантов *fon2* наблюдается увеличение размеров ПАМ, меристемы соцветия и флоральных меристем, что приводит к формированию сверхчисленных первичных веточек и органов цветков (Suzaki et al., 2004; Chu et al., 2006). Кроме того, у риса обнаружен еще один гомолог *CLV3 (FON2-related) – FON2 SPARE1 (FOS1)*; функции *FON2* и *FOS1* вырождены у некоторых генотипов (Suzaki et al., 2009).

Таким образом, сигнальный путь CLV частично консервативен у однодольных и двудольных растений; у злаков влияние мутаций генов, принадлежащих этому пути, не ограничивается меристемой соцветия, а распространяется и на меристемы, закладывающиеся позднее в процессе развития (например, первичные и вторичные аксиальные меристемы соцветия), вызывая сходные эффекты, связанные с увеличением размера меристем. Обнаруженные у злаков особенности связаны с паттерном экспрессии гомологичных генов и вырожденностью некоторых функций. Так, например, ген риса *FON2* в отличие от *CLV3* не участвует в регуляции вегетативного развития, у риса эту функцию выполняют *FON2-LIKE CLEPROTEIN1 (FCP1)* и *FCP2*, поддерживающие функционирование ПАМ на вегетативной стадии развития (Suzaki et al., 2008). Кроме того, важный аспект – наличие количественной изменчивости в проявлении признаков под контролем генов сигнального пути CLV у злаков, что служит предпосылкой для использования «слабых» аллелей, вносящих вклад в изменчивость роста и продуктивности растений в селекционных программах.

Роль ортологов гена *WUS* у злаков не вполне ясна. Паттерн экспрессии дублированных гомологов кукурузы *ZmWUS1* и *ZmWUS2* предполагает несколько отличия от *WUS* функции: область экспрессии *ZmWUS1* перекрывается с ОЦ меристемы соцветия, а *ZmWUS2* экспрессируется на периферии меристемы соцветия. Однако функциональной оценки эти гены не имеют, так как мутанты по ним получены не были (Nardmann et al., 2006; Je et al., 2016).

Известен ортолог гена *WUS* риса – *TILLERS ABSENT1 (TAB1* или *OsWUS)*. Полагают, что *TAB1* играет важную роль в инициации аксиальных меристем, так как их закладки у мутантов *tab1* не происходит (Tanaka et al., 2015).

В целом следует отметить, что модули сигнального пути CLAVATA-WUSCHEL высших растений регулируют активность меристем во время всех этапов развития и роста растения, включая и вегетативную, и репродуктивную стадии, и представляют собой факторы, регулирующие число органов, иницируемых меристемами.

Регуляция формирования аксиальных меристем соцветий злаков

У злаков пути развития апикальной меристемы соцветия и аксиальных меристем отличаются. У многих злаков филлотаксис меристемы соцветия спиральный, а меристем веточек – двурядный (Bartlett, Thompson, 2014). Мутации генов, влияющие на меристему соцветия, могут не затрагивать остальные меристемы и *vice versa*. Например, гены ортологи *barrenstalk1 (ba1)* кукурузы и *LAX PANICLE1 (LAX1)* риса необходимы для инициации аксиальных меристем и формирования веточек, но не влияют на апикальную меристему соцветия (Komatsu et al., 2003b; Galavotti et al., 2004). Мутации этих генов вызывают существенное уменьшение числа веточек и колосков у риса (Komatsu et al., 2001, 2003b) или отсутствие ветвления метелки кукурузы (Ritter et al., 2002; Gallavotti et al., 2004). Ген кукурузы *ba1* участвует в контроле инициации аксиальных меристем всех надземных частей растения, а *LAX1* риса – только соцветия. Гены *ba1/LAX1* кодируют транскрипционные факторы с главным доменом «спираль-петля-спираль» (basic-helix-loop-helix, bHLH) (Komatsu et al., 2003b; Galavotti et al., 2004).

Ген риса *MONOCULM1 (MOC1)* необходим для инициации аксиальных меристем во время вегетативного и генеративного развития. Мутант *moc1* лишен вторичных побегов, метелка содержит несколько веточек и колосков (Li et al., 2003; Oikawa, Kyozuka, 2009). В. Zhang с коллегами (2015) показали, что гомолог *MOC1* мягкой пшеницы *TaMOC1* (обнаружено 82.6 % гомологии аминокислотных последовательностей *MOC1* и *TaMOC1*) участвует в контроле развития колоска пшеницы. Гены *MOC1/TaMOC1* кодируют транскрипционные факторы (Li et al., 2003; Oikawa, Kyozuka, 2009; Zhang et al., 2015).

В метелке мутанта *barren inflorescence 2 (bif2)* кукурузы не развиваются веточки или колоски, ген необходим для поддержания активности аксиальных меристем (McSteen et al., 2000; McSteen, Hake, 2001). Ген *BIF2* кодирует Ser/Thr протеинкиназу.

Генетическая регуляция установления идентичности и детерминированности колосковых меристем

Мутации генов ортологов *branched silkless1 (bd1)* кукурузы и *FRIZZY PANICLE (FZP)* риса приводят к формированию очень разветвленного соцветия (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003a; Zhu et al., 2003; Yi et al., 2005). Гены кодируют транскрипционные факторы семейства APETALA2 (AP2). У мутантов *bd1* и *fzp* нарушены идентичность колосковых меристем и переход к установлению

идентичности флоральных меристем, в результате чего на месте цветков формируются веточки. Степень выраженности мутантного фенотипа у мужского и женского соцветий кукурузы не одинакова, при этом у женского соцветия изменения более выражены: формируются эктопические «веточки» и флоральные меристемы не закладываются. Ортологи генов *BD1/FZP* выделены в геномах *Brachypodium – mos1* (Derbyshire et al., 2013), пшеницы – *WFZP* (Dobrovolskaya et al., 2015, 2017; Poursarebani et al., 2015) и ячменя – *COM1* (Poursarebani et al., 2015). Все мутанты имеют сходные фенотипы соцветия с образованием дополнительных колосков и/или «веточек» на уступах соцветия и паттерны экспрессии, транскрипты обнаружены в развивающихся соцветиях (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003a; Dobrovolskaya et al., 2015). Следует отметить, что гены ортологи *FZP* экспрессируются не в меристемах, а примордиях колосковых чешуй.

Ген риса *PANICLE PHYTOMER2/OSMADS34 (PAP2)* контролирует установление идентичности меристем колоска (Gao et al., 2010; Kobayashi et al., 2012). Ген *PAP2* кодирует *SEPALLATA*-подобный ТФ, содержащий MADS-бокс. У двудольных, в частности у арабидопсиса, гены *SEPALLATA (SEP1, 2, 3, 4)* принадлежат к E-классу генов, необходимых для образования функциональных белковых комплексов с продуктами ABC-генов, их функции частично перекрываются; у тройных мутантов *sep1sep2sep3* меристема цветка становится недетерминированной и органы цветка представлены только чашелистиками, а у четверного мутанта *sep1sep2sep3sep4* вместо чашелистиков развиваются листовидные структуры (Лутова и др., 2010). У мутанта риса *pap2* наблюдаются нарушения: в строении соцветия – формирование увеличенного числа веточек, в строении колоска – развитие сверхчисленных листовидных колосковых и цветковых чешуй с эктопическими веточками и нарушение в строении цветков. Усиленное ветвление соцветия и развитие листовидных структур у мутанта говорит о частичной потере идентичности колосковых меристем. Ген экспрессируется в меристемах колоска, наблюдается повышение уровня экспрессии при установлении идентичности колосковых меристем. Таким образом, *SEP* у злаков приобретает новую функциональную роль, которая заключается в установлении идентичности колосковых меристем. Частичный характер потери функции гена *POP2* риса предполагает наличие другого гена (генов) и вырожденность функций этих генетических факторов в установлении идентичности колосковых меристем.

Мутации гена риса *aberrant panicle organization1 (apo1)* вызывают преждевременное установление идентичности колосковых меристем, и, как результат, уменьшение ветвления соцветия (Ikeda et al., 2005). Ген *APO1* риса кодирует белок, содержащий F-бокс, и ортологичен *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* арабидопсиса, функция *APO1* заключается в подавлении установления идентичности колосковых меристем (Ikeda et al., 2007). Подобную функцию выполняет ген *RFL (APO2)* риса. Было показано, что гены *APO1* и *APO2* действуют совместно в контроле развития соцветия и цветка (Ikeda et al., 2012). В целом совместное действие генов *APO1/APO2* соответствует корегуляции генов *LFY/UFO* арабидопсиса (Лутова и др.,

2010), однако следует отметить, что на развитие цветка гены *APO2/RFL* и *LFY* действуют противоположным образом (Ikeda et al., 2012), что отражает эволюционную дивергенцию генетических механизмов, управляющих развитием архитектуры соцветия риса (однодольные) и арабидопсиса (двудольные).

Еще один ген риса, действие которого супрессирует установление идентичности колосковых меристем, – *TAWAWAI (TAW1)* ALOG-транскрипционного фактора (Yoshida et al., 2013). У мутанта *tawawal-D* активность меристемы соцветия пролонгируется, а спецификация меристем колоска, напротив, задерживается, в результате чего формируются удлиненные веточки с увеличенным числом колосков. Таким образом, в результате скоординированного действия генетических факторов, способствующих установлению идентичности колосковых меристем (*FZP* и *POP2*) и их супрессии (*APO1, 2* и *TAW1*), происходит спецификация колосковых меристем и дальнейшее развитие колоска.

После установления идентичности колосковых меристем следующее важное событие в процессе развития колоска – выбор детерминированности. У злаков детерминированность колосковой меристемы определяется консервативным механизмом, включающим действие микроРНК172 и мишени *APETALA2*-подобного транскрипционного фактора (Bommert, Whipple, 2017). Полагают, что многоцветковый недетерминированный колосок (пшеница, *B. distachyon*) возник в процессе эволюции раньше, чем детерминированный (рис, кукуруза, ячмень) (Цвелев, 1976; Bommert, Whipple, 2017). Мутация гена кукурузы *indeterminate spikelet 1 (ids1)* приводит к формированию сверхчисленных цветков (Chuck et al., 1998). Активность гена *IDS1* регулируется *Tassel seed 4 (Ts4)* – локусом, кодирующим микроРНК, miR172 (Chuck et al., 2007). Кроме того, был обнаружен паралог гена *IDS1* – *SISTER OF IDS1 (SID1)*; показано что функции генов *IDS1* и *SID1* в регуляции детерминированности колоска кукурузы вырождены (Chuck et al., 2008). Ортологи генов *IDS1* и *SID1* с вырожденными функциями в контроле детерминированности колоска были обнаружены у риса и ячменя, показан консервативный механизм регуляции детерминированности колоска микроРНК – miR172 (Lee et al., 2007; Brown, Bregitzer, 2011; Lee, An, 2012). Недавно было установлено, что главный ген доместикиции пшеницы – *Q* – мастер-ген, регулирующий ряд важных для доместикиции характеристик колоса, является ортологом *IDS1* кукурузы, и мутации в сайте связывания с miR172 приводят к изменениям детерминированности колоска, вызывая его удлинение и формирование многочисленных цветков на колосковой оси (Simons et al., 2006; Debernardi et al., 2017).

Генетический контроль формирования меристем, специфичных для отдельных таксонов злаков

Мутации генов *Ramosa (Ral, 2, 3)* приводят к нарушению идентичности парных колосковых меристем соцветия, специфичных только для представителей трибы Andropogoneae. У мутантов кукурузы *ramosal (ra1)*, *ra2* и *ra3* формируются многочисленные удлиненные веточки

в метелке и появляются удлиненные «веточки» в початке (Vollbrecht et al., 2005; Bortiri et al., 2006; Satoh-Nagasawa et al., 2006). Гены *Ra1* и *Ra2* кодируют ТФ семейства С2Н2-цинковые пальцы и ТФ, содержащий LOB-домен (lateral organ boundary domain) (Vollbrecht et al., 2005; Bortiri et al., 2006), а *Ra3* кодирует трегалозо-6-фосфатную фосфатазу (Satoh-Nagasawa et al., 2006). Все три гена принадлежат одному генетическому пути регуляции (Tanaka et al., 2015). Ортологи генов *RA1* и *RA3* уникальны для трибы Andropogoneae, однако близкий паралог *Ra3* с неопределенной на настоящее время функцией обнаружен и у других злаков, например у гена *HvSRA* ячменя (Satoh-Nagasawa et al., 2006). В отличие от *RA1* и *RA3*, специфичных для Andropogoneae, ортологи гена *Ra2* играют важную роль в развитии соцветия представителей злаков. Ортолог *Ra2* был выделен в геноме ячменя, *Vrs4* (*Six-rowed spike4*)/*HvRA2*, мутации гена связаны с определением фертильности латеральных колосков и вызывают потерю детерминированности меристемы колоска (Korpolu et al., 2013). Полагают, что, несмотря на консервативность *Ra2* у различных злаков, гены-мишени у ортологов могут быть различными. Ген *HvRA2* регулирует рядность колоса опосредованно, через регуляцию гена-мишени *Vrs1* (*HvHox1*) (Korpolu et al., 2013).

Таким образом, наличие некоторых генетических механизмов, регулирующих развитие соцветия злаков, подтверждают модели, ранее открытые у двудольных растений. Вместе с тем очевидно существование процессов развития, специфичных только для злаков, и появление новых модулей их генетической регуляции, в частности связанных с формированием разветвленного соцветия.

Acknowledgement

This work was supported by the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, State Budgeted Project 0324-2018-0018; and the Russian Foundation for Basic Research, project 18-04-00483a.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб., 2014. [Batygina T.B. Developmental Biology of Plants. Symphony of Life. St. Petersburg, 2014. (in Russian)]
- Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. [Lutova L.A., Ezhova T.A., Dodueva I.E., Osipova M.A. Genetics of Plant Development. Saint-Petersburg: N-L Publ., 2010. (in Russian)]
- Цвелев Н.Н. Злаки СССР. Л.: Наука, 1976. [Tzvelev N.N. Grasses of USSR. Leningrad: Nauka Publ., 1976. (in Russian)]
- Bartlett M.E., Thompson B. Meristem identity and phyllotaxis in inflorescence development. *Front. Plant Sci.* 2014;5:508. DOI 10.3389/fpls.2014.00508.
- Bommert P., Lunde C., Nardmann J., Vollbrecht E., Running M., Jackson D., Hake S., Werr W. *thick tassel dwarf1* encodes a putative maize ortholog of the Arabidopsis *CLAVATA1* leucine-rich repeat receptor-like kinase. *Development.* 2005a;132:1235-1245. DOI 10.1242/dev.01671.
- Bommert P., Nagasawa N.S., Jackson D. Quantitative variation in maize kernel row number is controlled by the *fasciated ear2* locus. *Nat. Genet.* 2005b;45:334-337. DOI 10.1038/ng.2534.

- Bommert P., Nagasawa N.S., Jackson D. Quantitative variation in maize kernel row number is controlled by the *FASCIATED EAR2* locus. *Nat. Genet.* 2013;45:334-337.
- Bommert P., Satoh-Nagasawa N., Jackson D., Hirano H.Y. Genetics and evolution of inflorescence and flower development in grasses. *Plant Cell Physiol.* 2005c;46:69-78. DOI 10.1093/pcp/pci504.
- Bommert P., Whipple C. Grass inflorescence architecture and meristem determinacy. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2017. DOI 10.1016/j.semdb.2017.10.004.
- Bonnet O.T. The development of the wheat spike. *J. Agr. Res.* 1936; 53:445-451.
- Bortiri E., Chuck G., Vollbrecht E., Rocheford T., Martienssen R., Hake S. *ramosa2* encodes a *LATERAL ORGAN BOUNDARY* domain protein that determines the fate of stem cells in branch meristems of maize. *Plant Cell.* 2006;18:574-585. DOI 10.1105/tpc.105.039032.
- Brown R.H., Bregitzer P. A *Ds* insertional mutant of a barley miR172 gene results in indeterminate spikelet development. *Crop Sci.* 2011; 51:1664-1672.
- Chu H., Qian Q., Liang W., Yin C., Tan H., Yao X., Yuan Z., Yang J., Huang H., Luo D., Ma H., Zhang D. The *FLORAL ORGAN NUMBER4* gene encoding a putative ortholog of Arabidopsis *CLAVATA3* regulates apical meristem size in rice. *Plant Physiol.* 2006;142: 1039-1052. DOI 10.1104/pp.106.08673.
- Chuck G., Meeley R.B., Hake S. The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene indeterminate spikelet1. *Genes Dev.* 1998;12:1145-1154.
- Chuck G., Meeley R., Hake S. Floral meristem initiation and meristem cell fate are regulated by the maize AP2 genes *ids1* and *sid1*. *Development.* 2008;135:3013-3019. DOI 10.1242/dev.024273.
- Chuck G., Meeley R., Irish E., Sakai H., Hake S. The maize *tassel-seed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet1*. *Nat. Genet.* 2007; 39:1517-1521.
- Chuck G., Muszynski M., Kellogg E., Hake S., Schmidt R.J. The control of spikelet meristem identity by the *branched silkless1* gene in maize. *Science.* 2002;298:1238-1241. DOI 10.1126/science.1076920.
- Clark L.G., Judziewicz E.J. The grass subfamilies Anomochlooideae and Pharoideae (Poaceae). *Taxon.* 1996;45:641-645. DOI 10.2307/1224248.
- Debernardi H., Lin G., Chuck J., Faris D., Dubcovsky J. MicroRNA172 plays a crucial role in wheat spike morphogenesis and grain threshability. *Development.* 2017;144:1966-1975. DOI 10.1242/dev.146399.
- Derbyshire P., Byrne M.E. *MORE SPIKELETS 1* is required for spikelet fate in the inflorescence of *Brachypodium* Derbyshire. *Plant Physiol.* 2013;161:1291-1302. DOI 10.1104/pp.112.212340.
- Dobrovolskaya O.B., Amagai Y., Popova K.I., Dresvyannikova A.E., Martinek P., Krasnikov A.A., Watanabe N. Genes *WHEAT FRIZZY PANICLE* and *SHAM RAMIFICATION 2* independently regulate differentiation of floral meristems in wheat. *BMC Plant Biol.* 2017; 17(Suppl. 2):252. DOI 10.1186/s12870-017-1191-3.
- Dobrovolskaya O., Pont C., Sibout R., Martinek P., Badaeva E., Murat F., Chosson A., Watanabe N., Prat E., Gautier N., Gautier V., Poncet C., Orlov Y.L., Krasnikov A.A., Bergès H., Salina E., Laikova L., Salse J. *FRIZZY PANICLE* drives supernumerary spikelets in bread wheat. *Plant Physiol.* 2015;167:189-199. DOI 10.1104/pp.114.250043.
- Gallavotti A., Zhao Q., Kyojuka J., Meeley R.B., Ritter M.K., Doebley J.F., Pè M.E., Schmidt R.J. The role of *barren stalk1* in the architecture of maize. *Nature.* 2004;432:630-635. DOI 10.1038/nature 03148.
- Gao X., Liang W., Yin C., Ji S., Wang H., Su X., Guo C., Kong H., Xue H., Zhang D. The *SEPALLATA*-like gene *OsMADS34* is required for rice inflorescence and spikelet development. *Plant Physiol.* 2010;153:728-740. DOI 10.1104/pp.110.156711.
- Ikeda K., Ito M., Nagasawa N., Kyojuka J., Nagato Y. Rice *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1*, encoding an F-box protein, regulates

- meristem fate. *Plant J.* 2007;51:1030-1040. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03200.x.
- Ikedda K., Nagasawa N., Nagato Y. *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1* temporally regulates meristem identity in rice. *Dev. Biol.* 2005;282:349-360. DOI 10.1016/j.ydbio.2005.03.016.
- Ikedda-Kawakatsu K., Maekawa M., Izawa T., Itoh J., Nagato Y. *Aber-rant PANICLE ORGANIZATION 2/RFL*, the rice ortholog of *Arabidopsis LEAFY*, suppresses the transition from inflorescence meristem to floral meristem through interaction with *APO1*. *Plant J.* 2012;69:168-180. DOI 10.1111/j.1365-313X.2011.04781.
- Je B.I., Gruel J., Lee Y.K., Bommert P., Arevalo E.D., Eveland A.L., Wu Q., Goldshmidt A., Meeley R., Bartlett M., Komatsu M., Sakai H., Jonsson H., Jackson D. Signaling from maize organ primordia via *FASCIATED EAR3* regulates stem cell proliferation and yield traits. *Nat. Genet.* 2016;48:785-791. DOI 10.1038/ng.3567.
- Jiang L., Qian Q., Mao L., Zhou Q.Y., Zhai W.X. Characterization of the rice floral organ number mutant *fon3*. *J. Integ. Plant Biol.* 2005;47:100-106.
- Kellogg E.A., Camara P.E., Rudall P.J., Ladd P., Malcomber S.T., Whipple C.J., Doust N.A. Early inflorescence development in the grasses (Poaceae). *Front. Plant Sci.* 2013;4:250. DOI 10.3389/fpls.2013.00250.
- Kim C., Jeong D.H., An G. Molecular cloning and characterization of *OsLRK1* encoding a putative receptor-like protein kinase from *Oryza sativa*. *Plant Sci.* 2000;152:17-26.
- Kobayashi K., Yasuno N., Sato Y., Yoda M., Yamazaki R., Kimizu M., Yoshida H., Nagamura Y., Kyojuka J. Inflorescence meristem identity in rice is specified by overlapping functions of three *API/FUL*-like MADS box genes and *PAP2*, a *SEPALLATA* MADS box gene. *Plant Cell.* 2012;24:1848-1859. DOI 10.1105/tpc.112.097105.
- Komatsu M., Chujo A., Nagato Y., Shimamoto K., Kyojuka J. *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. *Development.* 2003a;130:3841-3850. DOI 10.1242/dev.00564.
- Komatsu M., Maekawa M., Shimamoto K., Kyojuka J. The *LAX1* and *FRIZZY PANICLE 2* genes determine the inflorescence architecture of rice by controlling rachis-branch and spikelet development. *Dev. Biol.* 2001;231:364-373. DOI 10.1006/dbio.2000.9988.
- Komatsu K., Maekawa M., Ujiie S., Satake Y., Furutani I., Okamoto H., Shimamoto K., Kyojuka J. *LAX* and *SPA*: major regulators of shoot branching in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003b;100:11765-11770. DOI 10.1073/pnas.1932414100.
- Koppolu R., Anwar N., Sakuma S., Tagiri A., Lundqvist U., Pourkheirandish M., Rutten T., Seiler C., Himmelbach A., Ariyadasa R., Youssef H.M., Stein N., Sreenivasulu N., Komatsuda T., Schnurbusch T. *Six-rowed spike4 (Vrs4)* controls spikelet determinacy and row-type in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110:13198-13203. DOI 10.1073/pnas.1221950110.
- Laudencia-Chinguanco D., Hake S. The indeterminate *floral apex1* gene regulates meristem determinacy and identity in the maize inflorescence. *Development.* 2002;129:2629-2638.
- Lee D.Y., An G. Two AP2 family genes, *SUPERNUMERARY BRACT (SNB)* and *OSINDETERMINATE SPIKELET 1 (OsIDS1)*, synergistically control inflorescence architecture and floral meristem establishment in rice. *Plant J.* 2012;69:445-461.
- Lee D.Y., Lee J., Moon S., Park S.Y., An G. The rice heterochronic gene *SUPERNUMERARY BRACT* regulates the transition from spikelet meristem to floral meristem. *Plant J.* 2007;49:64-78. DOI 10.1111/j.1365-313X.2006.02941.x.
- Li X., Qian Q., Fu Z., Wang Y., Xiong G., Zeng D., Wang X., Liu X., Teng S., Hiroshi F., Yuan M., Luo D., Han B., Li J.Y. Control of tillering in rice. *Nature.* 2003;422:618-621. DOI 10.1038/nature01518.
- Malcomber S.T., Preston J.C., Reinheimer R., Kossuth J., Kellogg E.A. Developmental gene evolution and the origin of grass inflorescence diversity. *Adv. Bot. Res.* 2006;44:423-479. DOI 10.1016/S0065-2296(06)44011-8.
- Mayer K.F.X., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jurgens G., Lux T. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell.* 1998;95:805-815. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81703-1.
- McSteen P., Hake S. *barren inflorescence2* regulates axillary meristem development in the maize inflorescence. *Development.* 2001;128:2881-2891.
- McSteen P., Laudencia-Chinguanco D., Colasanti J. A floret by any other name: control of meristem identity in maize. *Trends Plant Sci.* 2000;5:61-66. DOI 10.1016/S1360-1385(99)01541-1.
- Müller R., Bleckmann A., Simon R. The receptor kinase *CORYNE* of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal *CLAVATA3* independently of *CLAVATA1*. *Plant Cell.* 2008;20:934-946. DOI 10.1105/tpc.107.057547.
- Muramatsu M.A. Presumed genetic system determining the number of spikelets per rachis node in the tribe Triticeae. *Breed. Sci.* 2009;59:617-620. DOI 10.1270/jsbbs.5.
- Nagasawa N., Miyoshi M., Kitano H., Satoh H., Nagato Y. Mutations associated with floral organ number in rice. *Planta.* 1996;198:627-633.
- Nardmann J., Werr W. The shoot stem cell niche in angiosperms: expression patterns of *WUS* orthologues in rice and maize imply major modifications in the course of mono- and dicot evolution. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23:2492-2504. DOI 10.1093/molbev/msl125.
- Oikawa T., Kyojuka J. Two-step regulation of *LAX PANICLE1* protein accumulation in axillary meristem formation in rice. *Plant Cell.* 2009;21:1095-1108. DOI 10.1105/tpc.108.065425.
- Pourkheirandish M., Komatsuda T. The importance of barley genetics and domestication in a global perspective. *Ann. Bot.* 2007;100(5):999-1008. DOI 10.1093/aob/mcm139.
- Poursarebani N., Seidensticker T., Koppolu R., Trautewig C., Gawronski P., Bini F., Govind G., Rutten T., Sakuma S., Tagiri A., Wolde G.M., Youssef H.M., Battal A., Ciannamela S., Fusca T., Nussbaumer T., Pozzi C., Börner A., Lundqvist U., Komatsuda T., Salvi S., Tuberosa R., Uauy C., Sreenivasulu N., Rossini L., Schnurbusch T. The genetic basis of composite spike form in barley and 'Miracle-Wheat'. *Genetics.* 2015;201:155-165. DOI 10.1534/genetics.115.176628.
- Rao N.N., Prasad K., Kumar P.R., Vijayraghavan U. Distinct regulatory role for *RFL*, the rice *LFY* homolog, in determining flowering time and plant architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105:3646-3651. DOI 10.1073/pnas.0709059105.
- Ritter M.K., Padilla C.M., Schmidt R.J. The maize mutant *barren stalk1* is defective in axillary meristem development. *Am. J. Bot.* 2002;89:203-210. DOI 10.3732/ajb.89.2.203.
- Sakuma S., Salomon B., Komatsuda T. The domestication syndrome genes responsible for the major changes in plant form in the triticeae crops. *Plant Cell Physiol.* 2011;52:738-749. DOI 10.1093/pcp/pcr025.
- Satoh-Nagasawa N., Nagasawa N., Malcomber S., Sakai H., Jackson D. A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature.* 2006;441:227-230. DOI 10.1038/nature04725.
- Shitsukawa N., Kinjo H., Takumi S., Murai K. Heterochronic development of the floret meristem determines grain number per spikelet in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. *Ann. Bot.* 2009;104:243-251. DOI 10.1093/aob/mcp129.
- Shitsukawa N., Takagishi A., Ikari C., Takumi S., Murai K. *WFL*, a wheat *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is associated with spikelet formation as lateral branch of the inflorescence meristem. *Genes Genet. Syst.* 2006;81:13-20. DOI 10.1266/ggs.81.13.
- Simons K.J., Fellers J.P., Trick H.N., Zhang Z., Tai Y.S., Gill B.S., Faris J.D. Molecular characterization of the major wheat domestication gene *Q*. *Genetics.* 2006;172:547-555. DOI 10.1534/genetics.105.044727.
- Somssich M., Je B., Simon R., Jackson D. *CLAVATA-WUSCHEL* signaling in the shoot meristem. *Development.* 2016;143:3238-3248. DOI 10.1242/dev.133645.
- Sreenivasulu N., Schnurbusch T. A genetic playground for enhancing grain number in cereals. *Trends Plant Sci.* 2012;17:91-101. DOI 10.1016/j.tplants.2011.11.003.

- Suzaki T., Ohneda M., Toriba T., Yoshida A., Hirano H.-Y. *FON2 SPARE1* redundantly regulates floral meristem maintenance with *FLORAL ORGAN NUMBER2* in rice. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000693. DOI 10.1371/journal.pgen.1000693.
- Suzaki T., Sato M., Ashikari M., Miyoshi M., Nagato Y., Hirano H.Y. The gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to *Arabidopsis* CLAVATA1. *Development.* 2004;131:5649-5657. DOI 10.1242/dev.01441.
- Suzaki T., Yoshida A., Hirano H.Y. Functional diversification of CLAVATA3-related CLE proteins in meristem maintenance in rice. *Plant Cell.* 2008;20:2049-2058. DOI 10.1105/tpc.107.057257.
- Taguchi-Shiobara F., Yuan Z., Hake S., Jackson D. The *fasciated ear2* gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like protein that regulates shoot meristem proliferation in maize. *Genes Dev.* 2001;15:2755-2766. DOI 10.1101/gad.208501.
- Tanaka W., Ohmori Y., Ushijima T., Matsusaka H., Matsushita T., Kumamaru T., Kawano S., Hirano H.Y. Axillary meristem formation in rice requires the *WUSCHEL* ortholog *TILLERS ABSENT1*. *Plant Cell.* 2015;27:1173-1184. DOI 10.1105/tpc.15.00074.
- Thompson B.E., Hake S. Translational biology: from *Arabidopsis* flowers to grass inflorescence architecture. *Plant Physiol.* 2009;149:38-45. DOI 10.1104/pp.108.129619.
- Vollbrecht E., Springer P.S., Goh L., Buckler E.S. IV, Martienssen R. Architecture of floral branch systems in maize and related grasses. *Nature.* 2005;436:1119-1126. DOI 10.1038/NATURE03892.
- Yi G., Choi J.H., Jeong E.G., Chon N.S., Jena K.K., Ku Y.C., Kim D.H., Eun M.Y., Jeon J.S., Nam M.H. Morphological and molecular characterization of a new frizzy panicle mutant, "fzp-9(t)", in rice (*Oryza sativa* L.). *Hereditas.* 2005;142:92-97. DOI 10.1111/j.1601-5223.2005.01915.x.
- Yoshida A., Sasao M., Yasuno N., Takagi K., Daimon Y., Chen R., Yamazaki R., Tokunaga H., Kitaguchi Y., Sato Y., Nagamura Y., Ushijima T., Kumamaru T., Iida S., Maekawa M., Kyozuka J. *TAWAWAI*, a regulator of rice inflorescence architecture, functions through the suppression of meristem phase transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110:767-772. DOI 10.1073/pnas.1216151110.
- Zhang B., Liu X., Xu W., Chang J., Li A., Mao X., Zhang X., Jing R. Novel function of a putative MOC1 ortholog associated with spikelet number per spike in common wheat. *Sci. Rep.* 2015;12211. <http://www.nature.com/articles/srep12211.pdf>.
- Zhu Q.H., Hoque M.S., Dennis E.S., Upadhyaya N.M. *Ds* tagging of *BRANCHED FLORETLESS 1 (BFL1)* that mediates the transition from spikelet to floret meristem in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biol.* 2003;3:6. DOI 10.1186/1471-2229-3-6.

Концепция создания Российской национальной системы функциональных продуктов питания

Ю.В. Фотев¹, В.Ф. Пивоваров², А.М. Артемьева³, И.М. Куликов⁴, Ю.К. Гончарова⁵, А.И. Сысо⁶, Н.П. Гончаров^{7, 8} 

¹ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур, Московская область, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

⁴ Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Московская область, Россия

⁵ Всероссийский научно-исследовательский институт риса, Краснодар, Россия

⁶ Институт почвоведения и агрохимии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁷ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁸ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

Статистические данные свидетельствуют о негативных прогнозах демографических показателей населения России, включая численность и состояние здоровья населения. Ухудшающаяся в последние десятилетия среда обитания человека обуславливает кардинальные изменения в ассортименте и разнообразии потребляемых им продуктов питания и в значительной степени способствует снижению их биологической ценности. Обеднение продуктов питания растительного и животного происхождения жизненно важными минеральными элементами, витаминами и физиологически активными компонентами представляет собой серьезную долговременную угрозу для здоровья населения и национальной безопасности страны. Индустриальные способы обогащения ими продуктов питания имеют известные ограничения: узкий набор микронутриентов, их взаимодействие между собой и доступность для отдельных групп населения. Одним из способов решения проблемы является интродукция и селекция новых для России видов и сортов сельскохозяйственных растений, а также организация промышленного производства функциональных продуктов питания (ФПП), способствующих предупреждению и снижению риска развития хронических заболеваний и замедляющих процессы старения. Решение такой многоплановой проблемы лежит в том числе в изменении структуры потребления продуктов питания и их химического состава, обусловленного как сортиментом выращиваемых видов и сортов пищевых растений, так и условиями их возделывания: составом и качеством используемых почв и применяемых минеральных и органических удобрений. С учетом сложившейся демографической ситуации в России необходимо разработать комплексную национальную программу выделения новых растительных генетических источников с повышенным содержанием функциональных пищевых ингредиентов на основе традиционных и малораспространенных видов зерновых, овощных, плодовых и ягодных культур и включения их в сельскохозяйственное использование. Это позволит расширить существующие и создать новые инновационные технологические процессы в пищевой промышленности. Преимуществами создания и развития национальной системы ФПП в России будут улучшение здоровья населения и продолжительности жизни, снижение затрат Фонда обязательного медицинского страхования при успешной реализации программы и развитие бизнес-структур, задействованных в производстве ФПП.

Ключевые слова: демография в России; здоровье населения; продолжительность жизни; функциональные продукты питания; селекция на пищевую ценность; малораспространенные культуры.

Concept of producing of the Russian national system of functional food

Yu.V. Fotev¹, V.F. Pivovarov², A.M. Artemyeva³, I.M. Kulikov⁴, Y.K. Goncharova⁵, A.I. Syso⁶, N.P. Goncharov^{7, 8} 

¹ Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production, Moscow region, Russia

³ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

⁴ All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow region, Russia

⁵ All-Russian Rice Research Institute, Krasnodar, Russia

⁶ Institute of Soil Science and Agrochemistry, SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁷ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁸ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Statistics show negative forecasts of the demographic indicators of the Russian population including their size and health. The human habitat which has been deteriorating in recent decades causes cardinal changes in the assortment and variety of food and significantly contributes to the reduction of their biological value. The depletion of food products (FP) of vegetable and animal origin in vital mineral elements, vitamins and other physiologically active components represents a serious long-term threat to human health and the national security. Industrial methods of enriching FP have certain limitations: a narrow set of micronutrients, their interaction among themselves and accessibility for not all groups of the population. One way to reduce the negative consequences is through the introduction and breeding of new for Russia species and varieties of agricultural plants and organize a mass production of functional foods (FF) that contribute to the prevention and/or suspension of the development of dangerous diseases and slowing down the aging process. The solution of this multifaceted problem lies in changing the consumption structure of foods and their chemical composition conditioned by both the assortment of grown plant species and cultivars of food plants, as well as the composition and quality of soils, fertilizers and the conditions for crop cultivation. Taking into account the prevailing demographic situation in the Russian Federation, it is necessary to create

a comprehensive national program for the allocation of new high-content sources of FF ingredients based on traditional and underutilized crops, cultivars and forms of cereal, vegetable and fruit crops and their inclusion in agricultural production as well as existing and newly created technological processes in food industry. The advantages of creating and developing a national system of the functional food in Russia will be: the improvement of public health and life expectancy, the reduction of the Federal Compulsory Medical Insurance Fund expenditures and the development of business structures involved in the production of the FF.

Key words: demography in Russia; life expectancy; public health; functional food; breeding for nutritional quality; underutilized crops.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Фотев Ю.В., Пивоваров В.Ф., Артемьева А.М., Куликов И.М., Гончарова Ю.К., Сысо А.И., Гончаров Н.П. Концепция создания Российской национальной системы функциональных продуктов питания. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):776-783. DOI 10.18699/VJ18.421

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Fotev Yu.V., Pivovarov V.F., Artemyeva A.M., Kulikov I.M., Goncharova Y.K., Syso A.I., Goncharov N.P. Concept of producing of the Russian national system of functional food. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):776-783. DOI 10.18699/VJ18.421 (in Russian)

За последние десятилетия в нашей стране произошли значительные изменения в демографической ситуации, существенно отличающиеся от тренда, сложившегося в европейских странах. По результатам работы Межгосударственного статистического комитета стран СНГ, в 2014 г. среди стран бывшего СССР, вошедших в СНГ, самые низкие показатели продолжительности жизни были в России (70.9 года) и Кыргызстане (70.4 года) (Ожидаемая продолжительность жизни, 2000–2014. URL: http://www.cisstat.com/rus/macro/prodol_zizni.pdf). «Такой уровень ожидаемой продолжительности жизни, как в России в 2014 г., в развитых странах был в 1970–1975 гг., т. е. 40–45 лет назад» (Аганбегян, 2015, с. 66). Несколько ранее, в 1963 г. этот показатель в США составлял 66.6 года для мужчин и 73.4 – для женщин, во Франции – 67.2 и 74.1 года, в Швеции – 71.6 и 75.7 года (Народонаселение стран мира, 1978). По данным на 2014 г. показатель продолжительности жизни среди 28 стран-членов ЕС составил 80.9 года (83.6 года для женщин и 78.1 – для мужчин) (Mortality and life expectancy statistics/Eurostat. URL: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Mortality_and_life_expectancy_statistics). В четырнадцатом ежегодном демографическом докладе «Население России» (2008) отмечалось, что за последние 50 лет «кривая дожития населения Россия не сдвинулась ни на йоту в сторону ректангуляции, напротив, она стала более пологой. При этом дожитие женщин до возраста 60 лет осталось на уровне середины 1950-х, а у мужчин даже заметно снизилось» (с. 57). В настоящее время в России самая низкая продолжительность жизни в Европе и самая большая в мире разность между продолжительностью жизни у мужчин и женщин – 12 лет (Тарко, 2013).

Затянувшаяся стагнация в деле охраны здоровья и жизни россиян и связанное с этим нарастающее отставание от мировых достижений оборачиваются огромными демографическими потерями (Вишневский, 2009). По одному из прогнозных сценариев численность населения РФ к 2030 г. сократится до 128 млн человек (Население...

2010). Таким образом, статистические данные свидетельствуют о долговременном резко негативном тренде демографических показателей населения России, включающих численность и состояние здоровья ее населения.

Развитие национальных систем функциональных продуктов питания

В отличие от России, в странах Европы, в США и Японии начиная с 1970–1980-х гг. выработывались новая стратегия действий, мероприятия и новый тип профилактики, направленные на уменьшение риска смертности от инфекционных болезней. Если сравнивать страны со схожими исходными демографическими показателями, то, например, с 1901 по 1950 г. продолжительность жизни в России (32–58 лет) и Японии (37–61 год) отличалась незначительно. Однако уже с 1947 по 1965 г. ожидаемая при рождении средняя продолжительность жизни выросла в Японии с 50.1 до 67.7 года у мужчин и с 54.0 до 72.9 года у женщин (Ogawa, Matsukura, 2007). В 1990-х гг. японцы по продолжительности жизни вырвались вперед, и в 2004 г. продолжительность жизни японских мужчин достигла 78.6 года (второй в мире показатель следом за Исландией), а женщин – 85.6 года (наивысший в мире показатель). Такого результата удалось добиться в значительной мере за счет принятия в стране в 1991 г. законодательных актов о функциональных продуктах питания (ФПП – FOSHU, Food for Specific Health Use), и сейчас Япония занимает одно из первых мест в мире по продолжительности жизни, несмотря на перенаселение островов и обусловленный этим постоянный стресс.

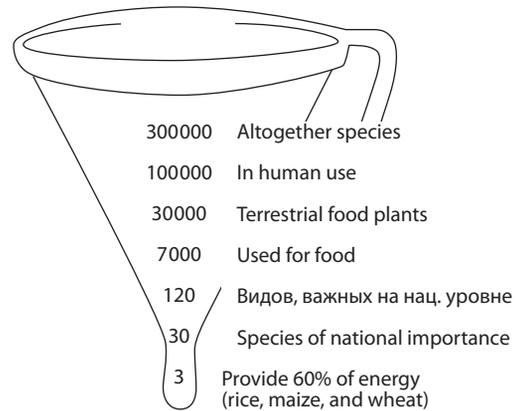
Основанием для принятия столь важных законов послужила серия исследовательских проектов. Еще в 1984 г. Министерство образования, науки и культуры Японии (в настоящее время Министерство образования, культуры, спорта, науки и технологий) спонсировало крупномасштабный национальный проект для исследования связи между наукой о продуктах питания (нутрициологией) и медициной (Arai, 2002). За основу был взят постулат:

«Продукт питания должен быть лекарством». В 1988–1991 гг. был реализован второй проект под названием «Анализ продуктов питания, модулирующих функции тела», а в 1992 г. – третий проект «Анализ и молекулярный дизайн функциональных продуктов питания». В результате были исследованы новые фитохимические соединения (фукостеролы), обладающие антираковыми свойствами, а также антиоксиданты разного химического строения (куркуминоиды). Система FOSHU направлена на то, чтобы помочь выявлять, изучать и продвигать производство продуктов питания, нацеленных на решение серьезных проблем со здоровьем населения. В Японии объем рынка FOSHU оценивался в 5 млрд долларов США в 2003 г. и 5.73 млрд долларов США в 2006 г.; в 2005 г. более 500 продуктов питания имели маркировку FOSHU (Side, 2006).

Аналогичные по функциям системы ФПП созданы в Европейском союзе, Великобритании, США, Республике Корея, КНР и Австралии. В г. Даллас (штат Техас, США) организован и проводит активную научную и учебную деятельность, конференции, выпускает научно-образовательную литературу Центр функциональных продуктов питания (FFC) (<http://www.functionalfoodscenter.net/>). В настоящее время функциональное питание в большинстве развитых стран мира стало действенной альтернативой медикаментозной терапии.

Функциональное питание – альтернатива медикаментозной терапии

Известно, что рацион питания современного человека характеризуется значительным однообразием используемых для приготовления пищи видов растений по сравнению с более ранними периодами человеческой истории. Так, недавними раскопками в Израиле, относящимися ко времени Ашельской культуры (около 780 тыс. лет назад), установлено присутствие в рационе питания древних людей 55 таксонов растений, включая орехи, плоды, семена, овощи и подземные запасающие органы (Melamed et al., 2016). Из примерно 30 000 видов высших цветковых растений, которые можно использовать в пищу, люди в разное время собирали или выращивали только около 7 000 видов (Wilson, 1992), а в настоящее время из них сельскохозяйственно значимы не более 200 видов (см. рисунок). При этом около 75 % пищевых ресурсов в мире люди получают, используя лишь 12 видов растений и 5 видов животных (What is agrobiodiversity? Food and Agriculture Organization of the United Nations. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5609e/y5609e00.pdf>). В семействе Злаковых (Gramineae Juss.) насчитывается свыше 10 000 видов, но широко возделываются только несколько культур. По данным ФАО, до 60 % потребляемой человеком энергии обеспечивается за счет углеводов всего трех видов растений – риса, кукурузы и пшеницы (Staple foods: What do people eat? URL: <http://www.fao.org/docrep/u8480e/u8480e07.htm>). Следует отметить, что в этих данных не учтен довольно большой объем сахара, производимого из еще одного злака – сахарного тростника (*Saccharum officinarum* L.). Рисом питается почти половина человечества. В России всего лишь шесть видов овощных культур (капуста, томаты, огурцы, морковь, свекла столовая и лук репчатый) обеспечивают свыше 90 % продукции товарного овощеводства.



Relative species diversities in the wild and cultivated vegetation according to (Wilson, 1992).

В то же время известны страны со значительным разнообразием потребляемых в пищу овощных растений. По оценке М.И. Мамедова (2015), в Японии используют в пищу 180–200 видов овощных культур. За последнее время в мире резко возрос интерес к новым продовольственным культурам, ранее известным лишь в отдельных странах: амаранту (разные виды, входящие в род *Amaranthus* L.) (Saubhik, 2016) и киноа (*Chenopodium quinoa* Willd.) (<http://www.fao.org/quinoa-2013/en/>), обладающим значительной пищевой ценностью за счет повышенного содержания белка, обогащенного лизинном. В случае предрасположенности организма к тому или иному заболеванию, например диабету, потребление определенных продуктов (в частности, момордики *Momordica charantia* L.) способно затормозить развитие болезни.

Сужение ассортимента выращиваемых видов растений сопровождается также обеднением их химического состава. За 50 лет (1950–1999) в США содержание Са в группе из 16 овощных культур снизилось на 23 %, Fe – на 27 % (Davis et al., 2004). В моркови и томатах с 1963 по 1992 г. установлено снижение содержания кальция и магния на 27–35 %. В Великобритании за период с 1930-х до 1980-х гг. содержание Са в плодах томата уменьшилось на 47 %, Mg – на 36 %, Cu – на 90 % (Mayer, 1997). Схожая ситуация наблюдается и с содержанием элементов по другим культурам. По группе микроэлементов скорость снижения их содержания достигает 0.2–0.3 % в год. Кроме того, исследователи отмечают значительную внутривидовую изменчивость по содержанию витаминов и минеральных элементов. Так, по аскорбиновой кислоте у томатов различия между сортообразцами достигают трехкратного уровня, а по накоплению Mg у сортообразцов капусты брокколи – двукратного. Снижение потребления эссенциальных макро- и микроэлементов увеличивает риск возникновения опасных заболеваний. Наблюдения показывают, что уменьшение потребления, например, Mg на 100 мг в день дает природ заболеваемости раком поджелудочной железы на 24 % (Dibaba et al., 2015).

Много работ посвящено происходящим в настоящее время климатическим изменениям и их влиянию на жизнедеятельность растений. Получены данные, что ан-

тропогенное возрастание концентрации CO₂ в атмосфере понижает содержание нутриентов в злаковых культурах (Myers et al., 2014).

В РФ разработаны государственные стандарты – ГОСТ Р 52349-2005, ГОСТ Р 54059-2010, ГОСТ Р 55577-2013, устанавливающие термины и определения, классификацию и общие требования к ФПП и функциональным пищевым ингредиентам (ФПИ). Стандартами регламентируется использование в пищевой промышленности биодобавок, включающих витамины, макро- и микроэлементы. Тем не менее, несмотря на технологические преимущества и пользу от их применения, имеются очевидные пределы индустриальных методов повышения пищевой ценности продуктов питания, связанные с ограниченным набором микронутриентов, их взаимодействием между собой и доступностью для отдельных групп населения.

Вышеизложенное обуславливает необходимость поиска видов и форм растений, отличающихся высоким содержанием ФПИ (в соответствии с ГОСТ Р 52349-2005) для последующего использования в селекционных программах при формировании национальной системы ФПП. При создании сортов с высокой пищевой ценностью целесообразно применять как методы традиционной селекции, так и новые технологии, основанные на редактировании геномов (TALEN и CRISPR/Cas) и метаболической инженерии (Blancquaert et al., 2017).

В XXI в. необходимы фундаментальные знания в тех областях пищевой биотехнологии и профилактической медицины, которые позволят увеличить среднюю продолжительность жизни, обеспечить длительное сохранение физического и духовного здоровья, социальную и нравственную удовлетворенность и активную жизнь пожилых и рождение здорового поколения (Доронин, Шендеров, 2002). Главными критериями, позволяющими относить существующие или вновь создаваемые продукты питания к ФПП, являются улучшение физического и психического здоровья и предотвращение или уменьшение частоты возникновения заболеваний у их потребителей.

Можно выделить следующие преимущества создания и развития национальной системы ФПП в России:

- улучшение здоровья населения и увеличение продолжительности жизни;
- снижение затрат Фонда обязательного медицинского страхования (ФОМС) при успешной реализации программы;
- развитие бизнес-структур, задействованных в производстве ФПП;
- дополнительные поступления в госбюджет налоговых платежей и платежей от лицензирования и сертификации качества и производства ФПП.

Эффективная селекция растений на повышение питательной ценности создаваемых сортов и гибридов с повышенным содержанием минеральных веществ, витаминов и других полезных ингредиентов должна занять в реализации подобной программы в России одно из ведущих мест. Для этого целесообразно использовать сочетание методов классической селекции, включающей поиск и отбор по биохимическим признакам, и молекулярно-генетических методов картирования и анализа генетического разнообразия растений-доноров.

Исследовательский задел и существующая инфраструктура научно-исследовательских учреждений России для обеспечения населения страны ФПП

Исходя из данных, что качество овощной продукции во многом определяет здоровье и продолжительность жизни, во Всероссийском научно-исследовательском институте селекции и семеноводства овощных культур (ВНИИССОК) с 1990-х гг. разрабатывается новое направление – создание ФПП на основе сырья интродуцированных нетрадиционных овощных растений: амаранта, якона, стахиса, овощной хризантемы, водяного кресса (Кононков и др., 2008). Воспроизводимое сырье вводимых в культуру растений отличается широким набором биологически активных веществ (БАВ) с антиоксидантной активностью, витаминов, химических элементов: кальция, органогенного кремния, йода, селена, железа и др.

В результате селекционной работы было создано девять отечественных сортов амаранта. Впервые сделан детальный анализ пищевых и лекарственных низкомолекулярных метаболитов листовой биомассы амаранта, на основе которой получена полифункциональная биологически активная добавка к пище «Фиточай Амарантил», источник бетацианинов, оксикоричных кислот и флавоноидов.

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН (ЦСБС СО РАН, Новосибирск) имеет давние традиции исследования биохимического состава интродуцируемых видов растений, берущие свое начало еще в 1950-х гг. С 2003 г. в ЦСБС СО РАН проводятся исследования биохимической ценности новых для России овощных интродуцентов – кивано (*Cucumis metuliferus* E. Meyer ex Naudin), момордики (*Momordica charantia* L.), вигны (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), бенинказы (*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.), хауттуйнии (*Houttuynia cordata* Thunb.), китайской брокколи, или кай-лан (*Brassica alboglabra* L.H. Bailey), и других видов. Все эти растения могут успешно выращиваться в Сибири. Впервые в России созданы пять сортов этих культур, включенных в «Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» (2018). Это сорта вигны Сибирский размер и Юньнаньская, момордики – Гоша, кивано – Зеленый дракон, бенинказы – Акулина, плоды которых богаты витаминами, каротиноидами, полифенольными соединениями, макро- и микроэлементами (Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Co, Mo), пектинами, антиоксидантами (Интродукция..., 2013; Фотев и др., 2018; и др.). В ЦСБС СО РАН созданы и поддерживаются живые коллекции овощных интродуцентов, насчитывающие свыше 133 видов, относящихся к 44 родам и 13 семействам, число сортообразцов в Генбанке семян – 10754, среди них 267 межвидовых гибридов. Особо следует отметить, что на основе изучения видовой коллекции разработаны критерии эффективности отбора видов и форм для интродукции в Сибирском регионе (Фотев и др., 2009). Высокой биохимической ценностью обладают созданные в ЦСБС СО РАН 19 сортов томата, в том числе первый в РФ сорт для защищенного грунта, полученный гибридизацией с дикорастущим видом томата *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill., – Дельта 264, а также 7 сортов перца сладкого и первый созданный

в азиатской части России гибрид F_1 баклажана Сибирский аргумент, которые были включены с 1999 по 2013 г. в Госреестр РФ.

Во Всероссийском селекционно-технологическом институте садоводства и питомниководства (ВСТИСП, Москва) реализуется комплекс мер по сортоизучению, селекции, размножению плодовых и ягодных культур и эффективному внедрению новых сортов в производство. В настоящее время в Госреестре РФ новые сорта этого учреждения занимают одно из ведущих мест, а особенно для Центрального и примыкающих к нему регионов: сорта малины – 56 %, смородины черной – 20 %, вишни – 20 %, сливы – 21 %, земляники – 24 %, смородины красной – 23 %, крыжовника – 15 % с высоким содержанием БАВ и антиоксидантов, которые широко внедряются в пищевую промышленность в качестве источника лечебно-профилактического действия. Разработана система производства и ускоренного размножения посадочного материала перспективных, с высоким содержанием эссенциальных нутриентов плодовых и ягодных культур как источников сырья для создания продуктов функционального назначения.

Давние традиции всестороннего исследования биохимических признаков пищевых растений (Конарев, Хорева, 2000) и их селекции, в том числе при помощи специально созданных двуродительских расщепляющихся популяций с последующим картированием QTL и ассоциативным картированием (Артемяева и др., 2014), имеются во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР, Санкт-Петербург). Установлены закономерности накопления питательных и биологически активных соединений зерновыми (Полонский и др., 2018) и овощными культурами. В последнем случае – различными видами и разновидностями капусты, моркови, свеклы столовой, тыквы. Определены особенности распределения по сортотипам и эколого-географическим группам источников ценных биохимических признаков, которые могут быть успешно использованы при селекции на качество. Все созданные в ВИР за последние пятнадцать лет сорта овощных культур наряду с признаками высокой продуктивности, товарности, скороспелости и декоративности имеют ценный биохимический состав, в том числе высокое содержание отдельных свободных аминокислот, органических и жирных кислот, сахаров и витаминов. Таковы сорта китайской и розеточной капуст Аленушка, Юна, Королла, МЭГГИ, ВитаВИР, японской капусты Русалочка, цветной капусты Ариэль с кремовой окраской головки, моркови Фея и Деликатесная, тыквы Димка, Марсианка, Волшебная карета и ряда других овощных культур.

В Институте цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) проводятся исследования мирового уровня по ключевым направлениям, связанным с изучением наследственности и изменчивости пищевых растений и их использованием в селекционном процессе (Новосельская-Драгович, 2015). Выполнено сравнительно-генетическое изучение видов рода *Triticum* L. и их сородичей, проведена ревизия существующей системы рода и предложена новая, включающая в себя все фертильные рукотворные виды (Goncharov, 2011), открывающая воз-

можность широкого использования редких и выведенных в настоящее время из возделывания видов рода (Goncharov et al., 2007). Показано, что один из эндемичных видов пшениц *Triticum aestivum* Jakubz. служит перспективным источником антиоксидантов (Гордеева, 2014). При этом важность создания агрохимически эффективных сортов в настоящее время – уже общее место в национальных селекционных программах (Абугалиева и др., 2011).

Во Всероссийском научно-исследовательском институте риса (ВНИИ риса, Краснодар) выведен ряд сортов черnozерного и краснозерного риса с высоким содержанием антиоксидантов и других полезных веществ (до 20 раз выше, чем у традиционных белозерных сортов). Это сорта Мавр, Гагат, Черные глаза, Рыжик, Кардинал, Южная ночь, Рубин и Марс (Зеленская и др., 2018). Показано, что ложка отрубей черного риса содержит больше антоцианинов, чем ложка черники. При этом 50 г черного риса обеспечивают до 35 % от рекомендуемой дневной нормы селена, меди, цинка и марганца, так как по их содержанию он значительно превосходит белозерный рис. По содержанию полифенолов черnozерные сорта риса превосходят краснозерные в 8 раз, а по содержанию антоцианинов – в 60, что позволяет им проявлять в 45 раз более высокую антирадикальную активность (Yao et al., 2010). В настоящее время готовятся для передачи в Госсортоиспытание сорта риса с еще более высокими урожайностью, устойчивостью к заболеваниям и содержанием полезных веществ. Потенциал продуктивности созданных сортов – 8–10 т/га, выход крупы – от 73 до 83 % (Гончарова, 2015).

В Институте почвоведения и агрохимии СО РАН (ИПА СО РАН, Новосибирск) ведутся исследования содержания и форм химических соединений макро- и микроэлементов (N, P, K, Na, Ca, Mg, S, Mn, Cu, Mo, B, Co, Zn, I, Br, F, Cl, Sr, As, Se) в почвах, растениях и водах Сибири. Изучается их поведение в системе «почва–растение», связь между свойствами почв, элементным химическим и биохимическим (по БАВ) составами ресурсов пищевых растений, включая овощные. Проведено биогеохимическое и эколого-биогеохимическое районирование регионов юга Западной Сибири (Ильин, Сысо, 2001; Сысо, 2007). ИПА СО РАН имеет аккредитованную испытательную лабораторию по исследованию почв, растений и вод.

Лабораторная база, на которой может проводить необходимые исследования почв и растений в образовательном процессе при подготовке специалистов по ФПП, имеется в Новосибирском государственном аграрном университете (НГАУ).

В Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре РАН (ННЦ-НБС, пос. Никита, Республика Крым) создана классическая и до сих востребованная в биохимических лабораториях России методика биохимического анализа пищевых растений (Кривенцов, 1982). В составе ННЦ-НБС функционирует лаборатория ароматических и лекарственных растений, где проводятся исследования по широкому спектру ФПИ. Созданы ценные по биохимическому составу сорта пряно-вкусовых и лекарственных растений, включенные в Госреестр сортов: иссоп лекарственный *Hyssopus officinalis* L. ‘Никитский белый’, полынь лечебная *Artemisia abrotanum* L. ‘Эвксин’,

полынь *Artemisia dracuncululus* L. 'Изумруд', чабер горный *Satureja montana* L. 'Крымский смарагд' и др.

Пути решения проблемы обеспечения ФПП населения России

Для компенсации снижения пищевой ценности продуктов питания необходимо создать в России эффективно функционирующую национальную систему ФПП. Разные подразделения научно-исследовательских учреждений, подведомственных Минобрнауки РФ, имеют необходимые компетенции и кадры для решения задачи выделения видов, форм и выведения сортов традиционных и новых для РФ культур, продукция которых отличается повышенным содержанием макро- и микроэлементов, а также других биологически ценных ингредиентов. Для решения поставленной задачи необходима консолидация усилий специалистов, работающих в разных НИИ, путем формирования временного творческого коллектива либо организации самостоятельного «Центра функциональных продуктов питания», например, в рамках заключенного в 2017 г. восьмистороннего Договора о сотрудничестве между институтами, подведомственными Минобрнауки России, и НГАУ Минсельхоза РФ. Целевой ориентир при создании российской системы ФПП должен включать выполнение следующих задач:

- Выделение на основе комплексного изучения наиболее перспективных для системы ФПП видов и форм зерновых, овощных, плодовых и ягодных культур.
- Всестороннее исследование содержания ФПИ в сортообразцах зерновых, овощных, плодовых и ягодных культур в разных климатических зонах России (Сибирь, Северо-Запад, средняя полоса РФ, Краснодарский край, Крым и другие регионы России).
- Исследование влияния почвенных условий минерального питания растений на их элементный и биохимический состав.
- Всестороннее изучение генетических ресурсов злаковых и овощных культур для последующего целенаправленного повышения пищевой ценности новых сортов и гибридов, в том числе получаемых с использованием современных молекулярно-биологических методов.
- Разработка и реализация селекционных программ выведения сортов и создания гибридов нетрадиционных злаковых и овощных культур нового поколения с высоким содержанием ФПИ и с последующим проведением их широкого экологического испытания.
- Создание селекционно-семеноводческих компаний для селекции, семеноводства и внедрения в производство сортов растений функционального направления, являющихся источниками высокого содержания биологически активных соединений, и новых производств по выпуску ФПП на основе данных сортов и гибридов – источников ФПИ.
- Организация широкой сети по продаже создаваемых ФПП и/или внедрение их в уже существующие торговые сети.
- Распространение ФПП в лечебно-оздоровительных целях на предприятиях, в школах, вузах и в других учреждениях.

- Подготовка совместных научных публикаций, конференций, обучающих семинаров для специалистов АПК.
- Введение в вузах соответствующего профиля дисциплин, позволяющих готовить специалистов по созданию и внедрению ФПП.
- Введение в «Номенклатуру специальностей научных работников» специальности «функциональные продукты питания».
- Осуществление взаимодействия со СМИ по пропаганде отечественной концепции «Пищевые продукты могут быть лекарством», научно-популярные публикации и выступления в СМИ. Организация «горячей линии» по консультированию физических лиц и организаций по вопросам качества ФПП.

Acknowledgments

The study of the intraspecies variability of morphological and biochemical characters in vegetables was conducted in the Central Siberian Botanical Garden and supported by State Budgeted Project 0312-2017-0002 «Analysis of the intraspecies structure of resource plant species in Asian Russia; gene pool collection and preservation». Use was made of the scientific bioresource collection of the Central Siberian Botanical Garden «Field and greenhouse collections of live plants», USU 440534. The identification of wheat species at the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0018.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Абугалиева А.И., Савин Т.В., Моргунов А.И., Чакмак И., Зеленский Ю.И. Содержание Fe и Zn в зерне пшеницы (сортовой генофонд и генетические ресурсы Казахстана). Алматы, 2011. [Abugaliyeva A.I., Savin T.V., Morgunov A.I., Chakmak I., Zelen-skiy Y.I. Content of Fe and Zn in Wheat Grain (Varietal Gene Pool and Genetic Resources of Kazakhstan). Almaty, 2011. (in Russian)]
- Аганбегян А.Г. Повышение крайне низкой продолжительности жизни населения России – важнейшая неотложная задача. Экон. стратегии. 2015;5-6:60-79. [Aganbegyan A.G. Increasing the extremely low life expectancy of the population of Russia is the most important urgent task. Ekonomicheskkiye Strategii = Economic Strategies. 2015;5-6:60-79. (in Russian)]
- Артемьева А.М., Руднева Е.Н., Кочерина Н.В., Чесноков Ю.В. QTL анализ морфологических признаков качества у *Brassica rapa* L. Овощи России. 2014;(2):14-17. DOI 10.18619/2072-9146-2014-2-14-17. [Artem'eva A.M., Rudneva E.N., Kocherina N.V., Chesnokov Y.V. QTL analysis of morphological traits of quality in *Brassica rapa* L. Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia. 2014;(2):14-17. DOI 10.18619/2072-9146-2014-2-14-17 (in Russian)]
- Вишневецкий А.Г. Демографический кризис в России. ИФРИ, Париж, 2009. [Vishnevskiy A.G. The Demographic Crisis in Russia. IFRI, Paris, 2009. (in Russian)]
- Гончарова Ю.К. Генетические основы повышения продуктивности риса. Краснодар, 2015. [Goncharova Yu.K. Genetic Basis for Increasing Rice Productivity. Krasnodar, 2015. (in Russian)]
- Гордеева Е.И. Генетическая регуляция фиолетовой окраски перикарпа зерна мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2014. [Gordeyeva Y.I. Genetic Regulation of Purple Color of Grain Pericarp of Common Wheat (*Triticum aestivum* L.). Cand. Sci.(Biol.) Diss. Novosibirsk, 2014. (in Russian)]

- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений. (офиц. изд.). М.: Росинформагротех, 2018. [National Register of Breeding Achievements Admitted for Use. Vol. 1. Plant Cultivars. Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2018. (in Russian)]
- Доронин А.Ф., Шендеров Б.А. Функциональное питание. М., 2002. [Doronin A.F., Shenderov B.A. Functional Nutrition. Moscow, 2002. (in Russian)]
- Зеленская О.В., Зеленский Г.Л., Остапенко Н.В., Туманьян Н.Г. Генетические ресурсы риса (*Oryza sativa* L.) с окрашенным перикарпом зерна. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(3):296-303. DOI 10.18699/VJ18.363. [Zelenskaya O.V., Zelensky G.L., Ostapenko N.V., Tumanyan N.G. Genetic resources of rice (*Oryza sativa* L.) with colored pericarp. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(3):296-303. DOI 10.18699/VJ18.363 (in Russian)]
- Ильин В.Б., Сысо А.И. Микроэлементы и тяжелые металлы в почвах и растениях Новосибирской области. Новосибирск, 2001. [Il'in V.B., Syso A.I. Microelements and Heavy Metals in Soils and Plants in the Novosibirsk Region. Novosibirsk, 2001. (in Russian)]
- Интродукция нетрадиционных плодовых, ягодных и овощных растений в Западной Сибири. Отв. ред. И.Ю. Коропачинский, А.Б. Горбунов. Новосибирск, 2013. [Koropachinsky I.Y., Gorbunov A.B. (Eds.). Introduction of Non-Traditional Fruit, Berry, and Vegetable Plants in Western Siberia. Novosibirsk, 2013. (in Russian)]
- Конарев А.В., Хорева В.И. Биохимические исследования генетических ресурсов растений в ВИРЕ. СПб., 2000. [Konarev A.V., Khoreva V.I. Biochemical Research of Plant Genetic Resources in VIR. St. Petersburg, 2000. (in Russian)]
- Кононков П.Ф., Пивоваров В.Ф., Гинс В.К., Гинс М.С. Интродукция и селекция овощных культур для создания нового поколения продуктов функционального действия. М., 2008. [Kononkov P.F., Pivovarov V.F., Gins V.K., Gins M.S. Introduction and Breeding of Vegetable Crops for Creation a New Generation of Products of Functional Action. Moscow, 2008. (in Russian)]
- Кривенцов В.И. Методические рекомендации по анализу плодов на биохимический состав. Ялта, 1982. [Kriventsov V.I. Methodological Recommendations for Analysis of Biochemical Composition of Fruits. Yalta, 1982. (in Russian)]
- Мамедов М.И. Овощеводство в мире: производство основных овощных культур, тенденция развития за 1993–2013 годы по данным FAO. Овощи России. 2015;2:3-9. DOI 10.18619/2072-9146-2015-2-3-9. [Mamedov M.I. Vegetable production in the world: production of main vegetable crops and development trends in 1993–2013 based on FAO data. Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia. 2015;2:3-9. DOI 10.18619/2072-9146-2015-2-3-9. (in Russian)]
- Народонаселение стран мира. Справочник. М., 1978. [World Population by Countries. Factbook. Moscow, 1978. (in Russian)]
- Население России 2006. Четырнадцатый ежегодный демографический доклад. Отв. ред. А.Г. Вишневский. М.: Гос. ун-т, Высш. шк. экономики, 2008. [Vishnevsky A.G. (Ed.). Population of Russia 2006. Fourteenth Annual Demographic Report. Moscow: National Research University Higher School of Economics, 2008. (in Russian)]
- Население России 2008. Шестнадцатый ежегодный демографический доклад. Отв. ред. А.Г. Вишневский. М.: Гос. ун-т, Высш. шк. экономики, 2010. [Vishnevsky A.G. (Ed.). Population of Russia 2008. Sixteenth Annual Demographic Report. Moscow: National Research University Higher School of Economics, 2010. (in Russian)]
- Новосельская-Драгович А.Ю. Генетика и геномика пшеницы: запасные белки, экологическая пластичность и иммунитет. Генетика. 2015;51(5):568-583. DOI 10.7868/S0016675815050045. [Novoselskaya-Dragovich A.Yu. Genetics and genomics of wheat: storage proteins, ecological plasticity, and immunity. Russ. J. Genet. 2015;51(5):476-490. DOI 10.1134/S102279541505004X.]
- Ожидаемая продолжительность жизни при рождении, 2000–2014. URL: http://www.cisstat.com/rus/macro/prodol_zizni.pdf (дата обращения: 04.03.2018). [Life Expectancy at Birth, 2000–2014. URL: http://www.cisstat.com/eng/macro/prodol_zizni.pdf (reference date: 04.03.2018). (in Russian)]
- Полонский В.И., Лоскутов И.Г., Сумина А.В. Селекция на содержание антиоксидантов в зерне как перспективное направление для получения продуктов здорового питания. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(3):343-352. DOI 10.18699/VJ18.370. [Polonskiy V.I., Loskutov I.G., Sumina A.V. Breeding for antioxidant content in grain as a promising trend in obtaining healthy food products. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(3):343-352. DOI 10.18699/VJ18.370. (in Russian)]
- Сысо А.И. Закономерности распределения химических элементов в почвообразующих породах и почвах Западной Сибири. Новосибирск, 2007. [Syso A.I. Regularities in the Distribution of Chemical Elements in Soil-forming Rocks and Soils in West Siberia. Novosibirsk, 2007. (in Russian)]
- Тарко А.М. Опыт анализа динамики больших временных рядов демографических параметров стран мира и России. Пространство и время. 2013;1(11):94-102. [Tarko A.M. Experience in analyzing the dynamics of large time series of demographic parameters in the countries of the world and in Russia. Prostranstvo i Vremya = Space and Time. 2013;1(11):94-102. (in Russian)]
- Фотев Ю.В., Артемьева А.М., Фатеев Д.А., Наумова Н.Б., Бугровская Г.А., Белоусова В.П., Кукушкина Т.А. Особенности морфологии, биохимического состава и генетического полиморфизма китайской брокколи – новой для России овощной культуры. Овощи России. 2018;1:12-19. DOI 10.18619/2072-9146-2018-1-12-19. [Fotev Y.V., Artem'eva A.M., Fateev D.A., Naumova N.B., Bugrovskaya G.A., Belousova V.P., Kukushkina T.A. Features of the morphology, biochemical composition, and genetic polymorphism of Chinese broccoli, a new vegetable crop for Russia. Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia. 2018;1:12-19. DOI 10.18619/2072-9146-2018-1-12-19. (in Russian)]
- Фотев Ю.В., Кудрявцева Г.А., Белоусова В.П. Интродукция экзотических теплолюбивых овощных растений в Сибири. Овощеводство Сибири. Новосибирск, 2009;176-188. [Fotev Y.V., Kudryavtseva G.A., Belousova V.P. The introduction of exotic heat-loving vegetable plants in Siberia. In: Vegetable Industry in Siberia (Collection of scientific articles). Novosibirsk, 2009;176-188. (in Russian)]
- Arai S. Global view on functional foods: Asian perspectives. Br. J. Nutr. 2002;88(Suppl.2):139-143. DOI 10.1079/BJN2002678.
- Blancquaert D., Steur H., Gellynck X., Straeten D. Metabolic engineering of micronutrients in crop plants. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2017; 1390:59-73. DOI 10.1111/nyas.13274.
- Davis D.R., Epp M.D., Riordan H.D. Changes in USDA food composition data for 43 garden crops, 1950 to 1999. J. Am. Coll. Nutr. 2004;23(6):669-682.
- Dibaba D., Xun P., Yokota K., White E., He K. Magnesium intake and incidence of pancreatic cancer: the vitamins and lifestyle study. Br. J. Cancer. 2015;113(11):1615-1621. DOI 10.1038/bjc.2015.382.
- Goncharov N.P. Genus *Triticum* L. taxonomy: the present and the future. Plant Syst. Evol. 2011;295(1-4):1-11. DOI 10.1007/s00606-011-0480-9.
- Goncharov N.P., Bannikova S.V., Kawahara T. Wheat artificial amphiploids with *Triticum timopheevii* genome: preservation and reproduction of wheat artificial amphiploids. Genet. Resour. Crop Evol. 2007;54(7):1507-1514. DOI 10.1007/s10722-006-9141-1. <http://www.fao.org/quinoa-2013/en/> (reference date: 04.03.2018). <http://www.functionalfoodcenter.net/> (reference date: 04.03.2018).
- Mayer A.-M. Historical changes in the mineral content of fruits and vegetables. Br. Food J. 1997;99(6):207-211.
- Melamed Y., Kislev M.E., Geffen E., Lev-Yadun S., Goren-Inbar N. The plant component of an Acheulian diet at Gesher Benot Ya'aqov,

- Israel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016;113(51):14674-14679. DOI 10.1073/pnas.1607872113.
- Mortality and life expectancy statistics/Eurostat. URL: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Mortality_and_life_expectancy_statistics (дата обращения: 04.03.2018).
- Myers S.S., Zanobetti A., Kloog I., Huybers P., Leakey A.D.B., Bloom A.J., Carlisle E., Dietterich L.H., Hasegawa T., Holbrook N.M., Nelson L.R., Raboy V., Sakai H., Sartor K.A., Schwartz J., Seneweera S., Tausz M., Usui Y. Increasing CO₂ threatens human nutrition. *Nature*. 2014;510:139-142. DOI 10.1038/nature13179.
- Ogawa N., Matsukura R. Ageing in Japan: The health and wealth of older persons. In: United Nations Expert Group Meeting on Social and Economic Implications of Changing Population Age Structures. 31 August–2 September, 2005. Mexico City. N.Y.: United Nations, 2007;199-220.
- Saubhik D. Amaranthus: A Promising Crop of Future. Singapore, 2016.
- Side C. Overview on marketing functional foods in Europe. Functional Food Network General Meeting. 2006. (цит. по: Siro et al., 2008).
- Siro I., Kapolna E., Lugasi A. Functional food product development, marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite*. 2008; 51(3):456-467. DOI 10.1016/j.appet.2008.05.060.
- Staple foods: What do people eat? URL: <http://www.fao.org/docrep/u8480e/u8480e07.htm> (reference date: 04.03.2018).
- What is agrobiodiversity? Food and Agriculture Organization of the United Nations. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5609e/y5609e00.pdf> (reference date: 04.03.2018).
- Wilson E.O. *The Diversity of Life*. N.Y., 1992.
- Yao Y., Wei S., Mengjie Z., Guixing R. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity of colored grains in China. *J. Agric. Food Chem.* 2010;8(2):770-774. DOI 10.1021/jf903234c.

Исходный материал для селекции яровой мягкой пшеницы в условиях Новосибирской области

В.В. Пискарев¹, Е.В. Зуев², А.Н. Брыкова²

¹ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

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

Работа направлена на оценку исходного материала по выраженности хозяйственно ценных признаков (продолжительность вегетации, устойчивость к полеганию и высота растения, масса 1000 зерен, масса зерна колоса и урожайность зерна) у коллекционных образцов пшеницы мягкой яровой различного эколого-географического происхождения. Оценка представлена в виде 9-балльной системы выраженности признака в годы исследования, что позволяет выделять образцы с наибольшим выражением признака в годы изучения относительно среднего по опыту. Всего за 28 лет было изучено 5439 образцов, из них в течение двух и более лет – 1106. Показано, что у изученных образцов в целом не наблюдалось корреляционной зависимости между урожайностью и продолжительностью вегетационного периода, тогда как между урожайностью и высотой растения выявлена средняя зависимость ($r = 0.6$). Выявлены образцы (Лютесценс 675, Иркутская 49, Симбирка, Hybrid F3 S-141, Hybrid F4, Hybrid F3 S-289, Hybrid F4 S-2300 и Памяти Вавенкова), формирующие среднюю (4.5–5 балла) и выше средней (6–7) урожайность за короткий вегетационный период (69–85 дней). Высоким средним баллом (8.6–9) по массе 1000 зерен характеризовались 16 образцов, у которых этот показатель варьировал от 37.0 г (N43 и IAO-9) до 56.0 г (Hofed 1). Высоким усредненным баллом (8–9) при оценке массы зерна с колоса характеризовались образцы: Памяти Леонтьева, Экада 70, Симбирцит, Don Jose, Yong-Liang 4 и Long-Mai 11, сформировавшие колос со средней массой от 0.96 до 2.30 г. Стабильно высоким баллом (9), выражающим урожайность, отличались образцы Condestavel, PF 843025, Приленская 19, Памяти Леонтьева, Омская Краса. На основании полученных результатов выявлены источники, характеризующиеся высокой выраженностью хозяйственно ценных признаков, что позволяет привлекать новый географически отдаленный исходный материал для селекции сортов, адаптированных к условиям региона.

Ключевые слова: пшеница мягкая яровая; источник; хозяйственно полезные признаки; корреляция.

Sources for the breeding of soft spring wheat in the conditions of Novosibirsk region

V.V. Piskarev¹, E.V. Zuev², A.N. Brykova²

¹ Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk oblast, Russia

² N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Saint-Petersburg, Russia

The sources were identified among collection samples characterized by highly pronounced economic and valuable features, which allows new geographically remote source material to be taken to the regional breeding practices. This research aims to assess the agronomic traits (duration of the growing period, lodging resistance and plant height, 1000-grain weight, grain weight and yield) in soft spring wheat varieties of different ecological and geographical origin. Estimation was carried out by a 9-point system of expression of the trait during the study, which allows identifying samples with the greatest expression of the trait in the years of study with respect to the average experience. 5439 samples have been studied over 28 years, with 1106 of them, over two years or more. The study was carried out according to the methods of VIR on plots of 2 m². It was shown that the samples mainly had no correlation between the yield and the duration of the growing period, while the average dependence ($r = 0.6$) was revealed between the yield and the height of the plants. Varieties forming the intermediate (4.5–5 points) and above average (6–7) yield in a short growing period (69–85 days) were identified (Lutescens 675, Irkutskaya 49, Simbirca, Hybrid F3 S-141, Hybrid F4, Hybrid F3 S-289 and Hybrid F4 S-2300 and Pamyati Vavenkova). A high average score (8.6–9) at 1000 grains weight was shown for 16 varieties with variation from 37 g (N43 and IAO-9) to 56 g (Hofed 1). A high average score (8–9) in the evaluation of grain weight was shown for Pamyati Leont'eva, Ekada 70, Simbirtsit, Don Jose, Yong-Liang 4 and Long-Mai 11, which formed ears with an average weight from 0.96 to 2.30 g. A consistently high score (9) reflecting the yield was in the varieties Condestavel, PF 843025, Prilenskaya 19, Pamyati Leont'eva, Omskaya Krasa.

Key words: soft spring wheat; source; agronomical useful characters; correlation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Пискарев В.В., Зуев Е.В., Брыкова А.Н. Исходный материал для селекции яровой мягкой пшеницы в условиях Новосибирской области. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):784-794. DOI 10.18699/VJ18.422

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Piskarev V.V., Zuev E.V., Brykova A.N. Sources for the breeding of soft spring wheat in the conditions of Novosibirsk region. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):784-794. DOI 10.18699/VJ18.422 (in Russian)

Received 05.03.2018

Accepted for publication 12.07.2018

© AUTHORS, 2018

e-mail: piskaryov_v@mail.ru

Одним из основных способов создания сортов сельскохозяйственных культур до сих пор остается гибридизация с последующим отбором рекомбинантных генотипов с яркой выраженностью комплекса селекционно-ценных признаков (Апанасенко и др., 2015; Характеристики сортов..., 2016). При создании новых сортов, адаптированных для западносибирского региона, часто использовали образцы с высокой продуктивностью, качеством продукции и устойчивостью к стрессовым факторам из коллекции Всероссийского института растениеводства (ВИР) (Лихенко и др., 2014). В связи с особенностями природных условий Сибири (Воронина, Гриценко, 2011) селекционерам необходимо учитывать ряд признаков и свойств: скороспелость, устойчивость к засухе в первой половине вегетации, устойчивость к поздним весенним и ранним осенним заморозкам, устойчивость к листовостеблевым инфекциям.

Значительное проявление отдельных признаков или их сочетания можно наблюдать у отдельных образцов коллекции ВИР (Василова и др., 2016; Зуев и др., 2016; Коновалова, Богдан, 2016). При этом прямое использование генофонда затруднено (Friedrich et al., 2014; Singh, Kumar, 2016) из-за, как правило, низкой адаптивности материала и преобладания в потомстве рекомбинантов с низкой урожайностью (Souza, Sorrells, 1991), которые выбраковываются на первых этапах селекционного процесса. Подобная тенденция наблюдается и при географически отдаленной гибридизации (Лепехов, 2016).

Несмотря на то что в сорока крупных генбанках в мире сохраняется более 560 тыс. образцов пшеницы (Bhullar et al., 2009), селекционеры оперируют в основном ограниченным количеством из этого разнообразия (Reif et al., 2005), что приводит к генетической эрозии коммерческих сортов пшеницы. Для более широкого использования сохраняемого в коллекциях генофонда необходимо не только генотипирование образцов (Friedrich et al., 2014; Addison et al., 2016), но и фенотипирование в тех условиях, для которых будет создаваться сорт, и выявление наиболее адаптированного к ним исходного материала, характеризующегося, кроме того, высокой выраженностью хозяйственно ценных признаков (Tadesse et al., 2016).

Выявление новых генетических факторов, определяющих высокую выраженность хозяйственно ценных признаков, в выделенных образцах коллекции будет способствовать созданию сортов с требуемыми параметрами (Randhawa et al., 2013; Wessels, Botes, 2014). Уверенно прогнозировать селекционную ценность коллекционных образцов можно, только когда известен их потенциал (Давыдова, Казаченко, 2013). Поэтому расширенное и углубленное изучение коллекции, направленное на выявление новых источников и доноров селекционно-ценных признаков пшеницы, представляет собой важную и актуальную задачу.

Целью работы было изучение образцов пшеницы мягкой яровой, поступавших в различные годы из коллекции ВИР, и выявление источников агрономически ценных признаков для использования в селекционных программах в условиях лесостепи Западной Сибири.

Материал и методы

Исследования проводили в течение 28 лет (1972–1973, 1976–1980, 1994–2011, 2013–2014, 2016) в лесостепи Приобья на опытных полях СибНИИРС. Всего было изучено 5439 образцов яровой мягкой пшеницы коллекции ВИР из 78 стран мира, в том числе: сорта и линии из России – 1814, Китая – 487, Казахстана – 316, Чили – 222, Мексики – 213, Германии – 204, Австралии – 177, США – 171, Аргентины – 160 и др. Наиболее полно изучены признаки: продолжительность вегетационного периода и его межфазных периодов, высота растения и устойчивость к полеганию, засухоустойчивость, продуктивная кустистость, масса 1000 зерен, масса зерна с главного колоса, урожайность. В табл. 1 приведено число образцов, которые были охарактеризованы по основным хозяйственным важным признакам. Можно отметить, что лишь около 54 % образцов характеризовались достаточной жизнеспособностью для дальнейшего изучения в условиях Западной Сибири и формировали необходимое количество семян в первый год.

Для сравнения погодных условий в годы исследования нами был рассчитан гидротермический коэффициент с мая по август ($ГТК = \text{сумма осадков} / 0.1 \times \text{сумма эффективных температур} > 10^\circ\text{C}$). Среднегодовое значение ГТК равно 1.20. Типичные для зоны условия увлажнения ($ГТК = 1.20 \pm 0.10$) складывались в 1979, 2004, 2005, 2010, 2011 и 2014 гг. Недостаточное увлажнение ($ГТК$ от 1.04 до 0.40) наблюдалось в 1994, 1997, 1999, 2003 и 2008 гг. Остальные годы характеризовались избыточным увлажнением ($ГТК = 1.40\text{--}3.17$).

В полевых опытах использовали общепринятую для зоны агротехнику. Семена образцов высевали в оптимальные сроки на делянках площадью 2 м². Предшественник – чистый пар. С 1972 по 2003 г. стандартом был среднеспелый сорт Новосибирская 67. В другие годы, по мере включения в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в РФ, стандартами были сорта Новосибирская 15 (ранний сорт, 2003–2016 гг.), Новосибирская 29 (среднеранний сорт, 2003–2010), Новосибирская 31 (среднеранний, 2011–2016), Обская 2 (среднеспелый, 2014–2016), Сибирская 12 (среднепоздний, 2006–2014). Стандарты размещали через каждые 20 экспериментальных образцов. Работу выполняли с учетом методических указаний ВИР (Руденко и др., 1977; Мережко и др., 1999). После уборки проводили анализ структуры урожайности. Линейную корреляцию признаков и наименьшую существенную разницу (НСР) при 5 % уровне значимости рассчитывали по методикам, изложенным в (Доспехов, 1985), с использованием программы Excel.

При создании и анализе оценочной базы данных наряду с главной задачей – получением полной характеристики изученного материала в отдельные годы, проводилось сравнение образцов по селекционно-ценным признакам как в пределах одного года изучения, так и в разные годы, с целью выявления лучших образцов. Для удобства сравнения образцов в различные годы использовали 9-балльную систему выражения количественных признаков (9 – самое

Table 1. Numbers of spring common wheat accessions characterized according to traits of breeding values in Novosibirsk oblast

Trait	Accessions studied			
	In total	For 1 year	For 2 years	For 3 or more years
Sprouting–earling time	5439	2965	1106	1367
Earing–wax maturity time	5439	2965	1106	1367
Sprouting–wax maturity time	5439	2964	1102	1373
Plant height	4611	2322	1038	1251
Lodging resistance	5150	2839	1196	1115
Resistance to powdery mildew	961	840	121	–
Resistance to leaf rust	900	787	113	–
Drought tolerance	3252	2125	896	231
Productive tillering	2908	1706	426	776
The length of spike	407	354	52	–
Spikelet number per spike	408	354	54	–
Grain number per spike	499	446	53	–
Grain weight per spike	3190	1645	402	1143
1000-grain weight	3 743	2037	507	1449
Yield	5135	2716	1068	1351

высокое, 7 – высокое, 5 – среднее, 3 – низкое, 1 – самое низкое значение признака), которая применяется в отделе генетических ресурсов пшеницы ВИР начиная с 1980 г. (Зуев и др., 1999). Принцип расчетов был следующим: для каждого количественного признака в пределах одного года изучения определяют максимальные и минимальные значения, разницу делят на пять, находят интервал балла, который соответствует НСР при $p < 0.05$ в отдельные годы изучения образцов; на его основании программа автоматически вводит соответствующий балл для каждого количественного признака. Для установления лучших образцов по отдельным селекционно-ценным признакам использовали средний балл, рассчитанный как среднее арифметическое за конкретные годы изучения. Для выделения источников использовали только двухлетние, трехлетние и более данные.

Результаты

Период «всходы–колошение» изменялся от 28.5 дня у образцов NP 710 (к-43884, Индия) и к-42171 (Китай) до 63 дней у линии 43-694 (к-64125, Казахстан). По мнению Н.П. Гончарова и П.Л. Гончарова (2009), оптимальная продолжительность периода для лесостепи Приобья составляет 40–45 дней, что соответствует группе среднепоздних сортов (Сибирская 12 – 41.6 дня). При этом образцы с ранним выколашиванием в сочетании со схожей со стандартами урожайностью являются ценным исходным материалом для таежной и подтаежной зон региона. В целом наиболее короткий период «всходы–колошение» наблюдали у образцов в 2003 г. (среднее значение по изученным образцам – 32 дня, с пределами варьирования 23 и 40 дней) при недостаточном увлажнении (62 и 49 % от среднемноголетнего) в сочетании с высокими температурами в мае–июне (+2.8 и +3.3 ° к среднемноголетнему

значению). Самый продолжительный период отмечен в 2007 г. (среднее – 46, варьирование – 35–58 дней) при избыточном увлажнении (170 и 111 %) на фоне повышенной температуры в мае (+1 °) и недостатка тепла в июне (–1.8 °) в сравнении со среднемноголетними значениями (осадки в мае – 37.0 мм, июне – 55 мм; средняя температура за месяц в мае – 10.9 °С, июне – 16.9 °С).

Высоким средним баллом (8.5–9) за годы исследования характеризовались 15 образцов (рис. 1): Тулун 15 (к-64599, РФ, Иркутская обл.); Pusa 4 (к-30553, Индия); к-46317 (Армения); Ingal (к-62513, США); Castillian (к-44482, Австралия); к-47974, Hybrid F6 S-6594 (к-47178), Hybrid F6 S-6613 (к-47186) и Hybrid F5 S-4436 (к-47165) из Мексики и к-42130, к-42171, к-42183, к-42186, к-42225 и Jin-Chun 5 (к-62540) из Китая.

Короткий период «всходы–колошение» был отмечен для образцов яровой мягкой пшеницы из Китая, Чили, Мексики, США, Перу, Казахстана и Ленинградской области РФ. Самый длинный межфазный период наблюдали для сортов и линий из Китая, Бразилии, Италии и Греции.

Стандартные сорта имели следующие значения периода «всходы–колошение»: Новосибирская 67 – 39.4 дня, Новосибирская 15 – 34.8, Новосибирская 29 – 38.3, Новосибирская 31 – 39.2, Обская 2 – 39.3, Сибирская 12 – 41.6 дня.

Период «колошение–созревание» изменялся от 17 дней у линии 43-694 (к-64125, Казахстан) до 58 дней у образца к-42180 (Китай). Оптимальная продолжительность периода для лесостепи Приобья 35–43 дня (Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2009), что соответствует всем группам сортов – от ранних (стандарт Новосибирская 15) до среднепоздних (стандарт Сибирская 12). В целом наиболее короткий период «колошение–созревание» наблюдали у образцов в 1999 г. (среднее значение по изучен-



Fig. 1. Common spring wheat accessions showing short sprouting-earing times in the forest-steppe Ob region: 1, days; 2, score.



Fig. 2 Common spring wheat accessions showing short earing-wax ripening times in the forest-steppe Ob region. Designations follow Fig. 1.

ным образцам – 32 дня, с пределами варьирования 22 и 41 день), когда была сильная засуха в период вегетации (ГТК = 0.4 при среднемноголетнем значении коэффициента 1.20). Самый продолжительный период отмечен в 1972 г. (среднее – 59, варьирование 45–78 дней) при избыточном увлажнении в мае–июле (143, 135 и 124 % по отношению к среднемноголетним значениям 37, 55 и 61 мм) и недостатке тепла в течение всего вегетационного периода (в среднем –2.1° за период с мая по август).

Высоким средним баллом (9) характеризовались шесть образцов: к-20571 (Испания), к-24818 (РФ, Иркутская обл.), к-29970 (РФ, Вологодская обл.), к-42002 (Китай), Red Fern Ottawa (к-45395, Канада). Фактические значения у выделенных образцов варьировали от 17 до 40 дней (рис. 2).

Короткий период «колошение–созревание» имели образцы из Китая, Казахстана, Ленинградской области РФ,

США и Швеции. Длинный период был у сортов и линий из Китая, Греции, Мексики и Италии.

Стандартные сорта имели следующие значения периода «колошение–созревание»: Новосибирская 67 – 37.8 дня, Новосибирская 15 – 35.7, Новосибирская 29 – 35.2, Новосибирская 31 – 37.4, Обская 2 – 34.7, Сибирская 12 – 40.7 дня.

Период «всходы–созревание» изменялся от 64 дней у Сенбал 1 (к-63730, Южная Корея) до 107 дней у образца Encruzilhada (к-47242, Бразилия). Оптимальная продолжительность периода для лесостепи Приобья 75–88 дней (Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2009), что соответствует группам спелости от среднеранних (стандарт Новосибирская 31) до среднепоздних (стандарт Сибирская 12). Для условий подтаежной зоны оптимальная продолжительность периода 70–75 дней, для степной зоны – 90–100.

Table 2. Soft spring wheat accessions combining short sprouting–wax ripening time and above-average yield in the forest-steppe Ob region

VIR accession no.	Name	Origin	Sprouting–wax ripening		Yield	
			days	grade	g/m ²	grade
53331	Lutescens675	RF, Samara.	69.0	9.0	256.5	4.5
41087	Irkutskaya 49	RF, Irkutsk	74.5	9.0	264.5	4.5
56928	Simbirka	RF, Ul'yanovsk	68.8	9.0	249.0	4.5
47141	Hybrid F3 S-141	Mexico	85.0	9.0	264.5	5.0
47295	Hybrid F4 (26560)	»	74.0	9.0	256.0	5.0
47152	Hybrid F3 S-289	»	81.5	9.0	290.5	5.0
47162	Hybrid F4 S-2300	»	80.0	9.0	324.5	6.0
65132	Pamyati Vavenkova	RF, Novosibirsk.	71.3	9.0	366.7	7.0
st	Novosibirskaya 67	»	76.8	5.8	257.3	4.4
st	Novosibirskaya 15	»	70.5	7.9	263.8	4.8
st	Novosibirskaya 29	»	73.5	7.0	268.2	4.6
st	Novosibirskaya31	»	76.6	6.2	465.0	7.4
st	Obskaya 2	»	74.0	5.0	380.0	7.0
st	Sibirskaya 12	»	82.3	4.0	280.9	5.2
Mean*			79.4		194.3	

* Hereafter, the mean value is calculated for all samples studied throughout all years of the study.

В целом наиболее короткий вегетационный период наблюдали у образцов в 2008 г. (среднее значение по изученным образцам – 69 дней, с пределами варьирования от 60 до 81 дня). Самый продолжительный период отмечен в 1972 г. (среднее – 102, варьирование 87–138 дней).

Высокий средний балл (8.5–9) по продолжительности вегетационного периода имели образцы из России: к-33177 (Ленинградская обл.), Бурятская (к-48772, Бурятия), Ангара 86 (к-58465), Линия 2 (к-64882), Иркутская 49 (к-41087) из Иркутской области, Камчадалка (к-38586, Красноярский край), Местная 97 (к-40759, Сахалинская обл.), Зорян (к-60977, Краснодарский край), Саратовская 33 (к-43284, Саратовская обл.), Лютесценс 675 (к-53331, Самарская обл.), Симбирка (к-56928, Ульяновская обл.), Памяти Вавенкова (к-65132, Новосибирская обл.), а также линии к-47187, к-47150, к-47198, к-47217, к-47221, ВИР-25-2 (к-60236) из Мексики, ST-174 (к-61055, Чехия), Jin-Chun 5 (к-62540, Китай), Festival (к-44498, Австралия). Всего выделено 49 образцов с фактическими значениями продолжительности периода от 64 до 85 дней, при этом рекомендовать для включения в гибридизацию с целью создания скороспелых сортов можно лишь 8 образцов, урожайность которых была выше средней (табл. 2).

Большинство образцов из Казахстана, Чили, Мексики, Тувы (РФ) имели короткий вегетационный период в условиях Новосибирской области. Поздними были сорта и линии из Бразилии. Среди китайских пшениц имелось достаточное количество как скороспелых, так и позднеспелых образцов.

Наблюдалась положительная средняя корреляция ($r = 0.6$, варьирование по годам 0.5–0.8) между вегетационным периодом и периодом «всходы–колошение» и

сильная положительная корреляция ($r = 0.7$, варьирование по годам 0.6–0.9) между вегетационным периодом и периодом «колошение–созревание».

Высота растения изменялась от 25 см у образцов к-48171 (Индия) и Psathias (к-55119, Кипр) в 1976 г. до 131 см у линии N 744 (к-47231, Бразилия) в 1972 г. В целом наиболее короткий стебель формировали образцы, изученные в 1994 г. (среднее значение 46 см, с пределами варьирования от 20 до 65 см), самый длинный стебель отмечен в 2002 г. (среднее – 98, варьирование 60–125 см). Оптимальная для лесостепи Приобья высота растения пшеницы 80–90 см (Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2009). Значительное полегание (средний балл за год по всем образцам – 3) отмечено в 1979 и 2009 гг., при этом даже в эти годы выявлены образцы, устойчивые к полеганию (9 баллов). Следует отметить, что 1979 г. характеризовался оптимальным для региона ГТК (1.30), а 2009 г. – лишь небольшим переувлажнением (ГТК = 1.56). Полегание в 2009 г. было вызвано шквалистым ветром и ливнем в третьей декаде июля (203 % осадков в сравнении со среднемноголетним значением 26 мм), тогда как в 1979 г. – схожими условиями в третьей декаде августа.

Среднерослыми (70–80 см) и устойчивыми к полеганию (9 баллов) были образцы: Аму (к-50845, Швеция), Ангара 86 (к-58465, РФ, Иркутская обл.), Ботаническая 4 (к-59388, РФ, Московская обл.), Эритроспермум 14 (к-60461, РФ, Самарская обл.), Приморская 1441 (к-60538, РФ, Приморский край), Иволга (к-60975, РФ, Московская обл.), Ета (к-61520, Польша), Казахстанская 16 (к-62203, Казахстан), Дархан 5 (к-62230, Монголия), Дархан 11 (к-62232, Монголия), Лютесценс 937 (к-62253, РФ, Бурятия), Тулайковская Белозерная (к-62641, РФ, Самарская

обл.), Прохоровка (к-62644, РФ, Саратовская обл.), Воронежская 10 (к-64101, РФ, Воронежская обл.), Тулунская 12 (к-64361, РФ, Иркутская обл.), Attis (к-64873, Германия), Nandu (к-64888, Германия). Всего выявлено 116 образцов, характеризующихся средней высотой и устойчивостью к полеганию, при этом в качестве источников можно рекомендовать лишь 16 образцов, формирующих урожайность выше средней по балльной оценке, в среднем за годы исследования (Приложение 1)¹.

Масса 1000 зерен изменялась от 17.0 г у образца к-24818 (РФ, Иркутская обл.) до 56 г у образца Hofed 1 (к-44566, Австралия). В целом наиболее крупное зерно формировали образцы, изученные в 1972 г. (среднее значение по изученным образцам – 42 г, с пределами варьирования от 25 до 56 г) и 2003 г. (42 г, варьирование 30–51 г). Самое мелкое зерно образцы формировали в 1996 г. (среднее – 26 г, варьирование 13–41 г).

Высоким средним баллом (9) по массе 1000 зерен характеризовались 16 образцов, представленных в Приложении 2: Dowerin (к-44489, Австралия), Грекум 114 (к-45858, РФ, Московская обл.), Nepal 297 (к-62539, Индия), Харьковская 18 (к-62894, Украина), Ульяновская 100 (к-65250, РФ, Ульяновская обл.), Омская Краса (к-65599, РФ, Омская обл.), Hofed 1 (к-44566, Австралия) и др. Следует отметить, что не все образцы формировали урожайность выше средней в годы изучения. Среднюю и выше средней урожайность (5–9 баллов) имели лишь 7 образцов из 16. Лучший образец по совокупности показателей – сорт Омская Краса, формирующий высокую урожайность (500 г/м²) в сочетании с высокой массой 1000 зерен (44.5 г).

По крупности зерна стандарты распределились следующим образом: Новосибирская 67 – 34.3 г (средней крупности), Новосибирская 15 – 34.0 г (средней крупности), Новосибирская 29 – 36.2 г (средней крупности), Новосибирская 31 – 37.0 г (средней крупности), Обская 2 – 42.0 г (крупное), Сибирская 12 – 35.5 г (средней крупности).

Масса зерна колоса варьировала от 0.13 г у образцов к-42046, ВЗ(а) (к-28827) из Китая и Cartilla (к-20637, Испания) до 2.30 г у сорта Экада 70 (к-64547, РФ, Ульяновская обл.). Оптимальная для лесостепи Приобья масса зерна колоса 0.8–1.0 г (Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2009). В целом наибольшую массу зерна колоса формировали образцы, изученные в 2002 г. (среднее значение 1.89 г, с пределами варьирования от 1.00 до 3.00 г). Самой низкой массой зерна колоса образцы характеризовались в 1977 г. (среднее – 0.25 г, варьирование – 0.03–1.76 г). В оба года наблюдался небольшой избыток увлажнения, но распределение осадков значительно различалось. Так, в 2002 г. значительная часть осадков выпала во второй декаде июня (82 мм, среднемноголетнее значение – всего 16 мм), тогда как в 1977 г. – в августе (67 мм, 214 % от нормы), при этом в 1977 г. во второй декаде июня, в момент закладки основных элементов структуры колоса (первая-вторая декады июня), осадков было лишь 4 мм.

Высоким средним за годы изучения баллом (8–9) при оценке массы зерна с колоса характеризовались образцы:

Памяти Леонтьева (к-65245, РФ, Омская обл.), Экада 70 (к-64547) и Симбирцит (к-64548) из Ульяновской области РФ, Don Jose (к-51195, Аргентина), Yong-Liang 4 (к-62456) и Long-Mai 11 (к-62542) из Китая (Приложение 3). Среди них представляют ценность для селекции образцы, характеризующиеся урожайностью не ниже среднего: Памяти Леонтьева (525.0 г/м²), Симбирцит (358.3) и Экада 70 (408.3 г/м²).

Стандарты имели следующие показатели массы зерна с колоса: Новосибирская 67 – 0.97 г, Новосибирская 15 – 1.08, Новосибирская 29 – 1.23, Новосибирская 31 – 1.54, Обская 2 – 1.67, Сибирская 12 – 1.25 г.

Урожайность варьировала от 22.0 г/м² у образца к-23002 (Югославия, до 1990 г.) до 525 г/м² у сорта Памяти Леонтьева (к-65245, РФ, Омская обл.). Потенциальная урожайность для лесостепи Приобья составляет 5–6 т/га, что соответствует 500–600 г/м² (Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2009). В целом наибольшая урожайность формировалась у образцов, изученных в 2000 г. (среднее значение по изученным образцам 407 г/м², с пределами варьирования от 250 до 575 г/м²). Самая низкая урожайность формировалась у образцов в 1994 г. (среднее – 51 г/м², варьирование – 40–137 г/м²). Высокую среднюю урожайность образцов в 2000 г. можно объяснить оптимальными условиями года и своевременными осадками (ГТК = 1.93), тогда как в 1994 г., несмотря на то что год был не самый засушливый (ГТК = 0.82), в самые важные фазы развития пшеницы (кущение и выход в трубку–колошение) растения испытывали стресс от недостатка влаги (в мае осадков было на 21 % меньше нормы, в июне – на 46 %, причем основные осадки выпали во второй-третьей декаде мая и третьей декаде июня) и высоких температур (средняя температура мая была на 2.4 °, июня – на 4.5 °С выше среднемноголетней). Схожие результаты по зависимости урожайности от влаго- и теплообеспеченности в мае и июне были получены на селекционных линиях и сортах, созданных в СибНИИРС, которые изучались нами в течение пяти лет (2003–2008) (Пискарев и др., 2010).

Из изученных в различные годы образцов стабильно высоким баллом (9), выражающим урожайность, характеризовались: Condestavel (к-45112, Португалия), PF 843025 (к-63093, Бразилия) и образцы из России – Приленская 19 (к-63470, Якутия), Памяти Леонтьева (к-65245, Омская обл.), Омская Краса (к-65599, Омская обл.) (табл. 3).

Высокий балл (7.8–8.3) в среднем за годы изучения отмечен у девяти образцов: Омская 37 (к-64985), Экада 6 (к-64543), Мария 1 (к-65130), Симбирцит (к-64548), Баганская 95 (к-64864), Серебристая (к-64994), Экада 70 (к-64547) из России; к-44155 (Индия) и Торчинська (к-65151, Украина).

Пятьдесят четыре образца, выделенных по отдельным селекционно-ценным признакам за многолетний период изучения, переданы для селекционной работы в СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН. В 2015–2017 гг. в отделе генетических ресурсов пшеницы ВИР создана база оценочных данных «Результаты полевого изучения образцов яровой мягкой пшеницы в условиях Новосибирской области».

В результате проведенного корреляционного анализа, представленного в табл. 4, нами выявлены средняя за-

¹ Приложения 1–4 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx12.pdf>

Table 3. Soft spring wheat accessions with high yields in the forest–steppe Ob region

VIR accession no.	Name	Origin	Sprouting–wax ripening, days	Yield	
				g/m ²	Grade
64985	Omskaya 37	RF, Omsk	81.5	407.5	7.5
64543	Ekada 6	RF, Ul'yanovsk	79.3	345.0	7.7
65130	Mariya 1	RF, Kemerovo	84.3	433.3	7.7
64548	Simbirtsit	RF, Ul'yanovsk	74.0	358.3	7.7
64864	Baganskaya 95	RF, Novosibirsk	91.5	470.8	8.0
44155	–	India	77.2	407.5	8.0
64994	Serebristaya	RF, Omsk	84.8	481.3	8.0
65151	Torchin'ska	Ukraine	81.0	463.3	8.3
64547	Ekada 70	RF, Ul'yanovsk	80.0	408.3	8.3
45112	Condestavel	Portugal	74.0	510.0	9.0
63093	PF 843025	Brazil	76.0	503.5	9.0
63470	Prilenskaya 19	RF, Yakutiya	86.5	425.0	9.0
65599	Omskaya Krasa	RF, Omsk	89.0	500.0	9.0
65245	Pamyati Leont'eva	»	89.5	525.0	9.0
st	Novosibirskaya 67	RF, Novosibirsk	76.8	257.3	4.4
st	Novosibirskaya 15	»	70.5	263.8	4.8
st	Novosibirskaya 29	»	73.5	268.2	4.6
st	Novosibirskaya 31	»	76.6	465.0	7.4
st	Obskaya 2	»	74.0	380.0	7.0
st	Sibirskaya 12	»	82.3	280.9	5.2
Mean			79.4	194.3	

Table 4. Analysis of yield dependence on the manifestation of economically significant quantitative traits in the soft spring wheat accessions studied

Characters correlating with productivity	<i>r</i>	<i>t</i> _{fact}
Sprouting–earling time	0.02	3.82*
Earing–wax maturity time	–0.10	15.75**
Sprouting–wax maturity time	–0.06	8.81**
Plant height	0.60	115.31**
1000-grain weight	0.48	125.31**
Grain weight per spike	0.70	171.34**

Note. *t*_{fact} Student's *t* test; * significant at $p < 0.01$; ** significant at $p < 0.001$.

висимость урожайности от высоты растения ($r = 0.60$) и массы 1 000 зерен ($r = 0.48$) изученных образцов и сильная зависимость урожайности от массы зерна колоса ($r = 0.70$). Продолжительность межфазных периодов и периода от всходов до колошения у изученных образцов не коррелирует с урожайностью в целом.

Кроме рассмотренных выше признаков, важными характеристиками исходного материала при планировании привлечения источников в скрещивания являются устойчивость к болезням и засухоустойчивость в регионе. Ввиду не частой повторяемости засушливых лет, полноценной оценки все образцы не получили, поэтому нами охарактеризованы лишь источники, выделенные по другим признакам (Приложение 4). Так, среди образцов с высокой массой 1 000 зерен можно выделить два с высокой засухоустойчивостью (7 баллов) – Sappogo Haru Komugi 9 и IAO-9, и сорт Омская 20, который характеризуется высокой устойчивостью к полеганию и средней длиной соломины.

Среди выделенных источников, ценных для селекции, можно отметить 19 образцов, устойчивых к мучнистой росе (7–99 баллов) и 16 устойчивых к бурой ржавчине пшеницы (см. Приложение 4). Особого внимания заслуживают сорта Экада 70, Экада 6, Омская 37, Серебристая и образец PF 843025, которые, помимо устойчивости к одному или двум патогенам, отличались высокой урожайностью.

Обсуждение

Важной биологической характеристикой, которая определяет ценность сорта пшеницы и его пригодность к возделыванию в той или иной климатической зоне, являются продолжительность и структура вегетационного

периода растений. Для лесостепи Западной Сибири, в связи с особенностями климата, необходимо создавать сорта с укороченным периодом от всходов до созревания, но при этом формирующие приемлемый урожай. По результатам многолетней работы были выявлены образцы, сочетающие эти признаки в условиях лесостепи Приобья. Следует отметить, что лучшим образцом, у которого раннее созревание (71.3 дня, почти на уровне раннего сорта Новосибирская 15) сочетается с высокой урожайностью (7 баллов из 9), по результатам многолетних исследований, оказался допущенный к использованию в Западной Сибири сорт Памяти Вавенкова. Наблюдаемая нами закономерность, что проще использовать в селекции районированные в регионе сорта ввиду их лучшей приспособленности, согласуется с работами других авторов (Давыдова, Казаченко, 2013). Это находит свое отражение в родословных сортах, допущенных к использованию на территории Российской Федерации. Как правило, одна из родительских форм оказывается либо распространенным в регионе сортом, либо созданной в данном регионе линией (Государственный реестр..., 2018). Сорт Памяти Вавенкова является одной из родительских форм раннего сорта Новосибирская 16, который проходит государственное сортоиспытание с 2016 г.

Ранее в других работах была показана зависимость урожайности сортов зерновых культур от продолжительности вегетационного периода (Ведров, Халипский, 2009; Мных и др., 2014; Мальчиков, Мясникова, 2015). Это не согласуется с полученными нами результатами. Анализ урожайности изучаемых образцов и продолжительности вегетационного периода и его отдельных составляющих показал отсутствие такой зависимости ($r = -0.1...0.0$; $p > 0.001$). Данный факт позволяет выявлять доноров высокой урожайности, характеризующихся различными сроками созревания. Так, вегетационный период выделенных в нашей работе источников высокой урожайности варьирует от 74 дней у сорта Симбирцит до 91.5 дня у сорта Баганская 95.

Высота растений – важный показатель архитектоники растений и уборочного индекса зерна и урожая (Massaferrì et al., 2008; Sadeque, Turner, 2010). Она контролируется многими генами, из которых наиболее важные – гены *Rht* (reduced height) (Лобачев, 2000). Они наиболее эффективны в условиях достаточного увлажнения/орошения, внесения удобрений и защиты растений от сорняков и паразитов. При чрезмерном укорачивании соломины ухудшаются условия функционирования фотосинтетического аппарата (Образцов, 1981). Для гена *Rht-D1b* при изучении изогенных линий АНК-12 был показан плейотропный эффект снижения массы 1000 зерен (Лихенко, Шаманин, 2003; Изогенная линия АНК-12, 2018). Необходимость использования в селекционных программах для условий Западной Сибири среднерослых и высокорослых сортов продиктована тем фактом, что урожайность часто связана с высотой растения, особенно в условиях недостаточного увлажнения (Тимошенко, Самуилов, 2011; Цыбенков, Билтуев, 2016). В результате корреляционного анализа данных у 2470 изученных образцов нами выявлена достоверная средняя положительная зависимость высоты и урожайности ($r = 0.6$, $p > 0.001$). Поэтому необходимо

использовать в селекции генетические источники высокой урожайности, устойчивые к полеганию и характеризующиеся средней высотой или высокорослые. Такими источниками могут служить рекомендованные в нашей работе сорта, сочетающие относительно высокую урожайность и устойчивость к полеганию со средней высотой 70–80 см.

Крупность зерна в условиях Западной Сибири, в связи с особенностями распределения осадков в период вегетации, играет существенную роль в повышении продуктивности колоса. Основными характеристиками крупности зерна служат размер и масса зерновки; косвенным показателем, учитывающим оба признака, является масса 1000 зерен. Косвенным подтверждением необходимости создания крупносеменных сортов яровой мягкой пшеницы в регионе может быть средняя положительная корреляция урожайности и массы 1000 зерен ($r = 0.5$; достоверна при $p < 0.001$), рассчитанная по результатам многолетнего изучения образцов.

В.Г. Захаров и О.Д. Яковлева (2016) выявили существенное превышение показателя массы 1000 зерен у сортов второго периода сортосмены в регионе над значением сорта первого периода сортосмены. Регрессионный анализ показал, что с прохождением очередной сортосмены в результате селекции величина признака увеличивалась на 0.9 г. Нами выявлено заметное увеличение массы 1000 зерен изучаемых образцов в последние годы (корреляция между годами исследования и средней массой 1000 зерен $r = 0.6$; $p > 0.001$).

Масса зерна колоса – один из наиболее важных элементов структуры урожая пшеницы на ранних этапах селекционного процесса, так как селекционеры осуществляют индивидуальный отбор нового селекционного материала по колосу. Проведенный корреляционный анализ позволил выявить значительную зависимость урожайности от массы зерна колоса ($r = 0.7$; $p > 0.001$), что согласуется с результатами других авторов (Коробейникова, Красильников, 2015; Волкова, 2016; Коновалова, Богдан, 2016). Кроме того, три из шести источников с высокой массой зерна колоса выделяются по урожайности.

Урожайность яровой мягкой пшеницы складывается из трех основных компонентов: числа продуктивных колосьев на единицу площади, числа зерен в колосе и массы зерна колоса. Число колосьев значительно зависит от норм посева (Прохоренко и др., 2007) и слабо – от коэффициента продуктивной кустистости генотипа (Цильке, 1974) с авторегулирующими способностями сорта яровой пшеницы в стеблестое (Лубнин, 2006). Поэтому выявить доноров высокой урожайности сложно из-за наложения сильного модифицирующего влияния среды. Тем не менее в результате многолетнего исследования нами получен ряд сортов, сочетающих высокую урожайность с высокой выраженностью других ценных признаков, что позволяет рекомендовать их как исходный материал для селекции в условиях Западной Сибири. По результатам корреляционного анализа данных нами выявлена тенденция увеличения урожайности изучаемых образцов за последние годы (корреляция между годами и урожайностью $r = 0.3$, но недостоверная).

При рассмотрении родословных 141 районированного (по состоянию на 1 февраля 2018 г.) по 9–11 регионам

сорта можно заметить, что из выделенных в результате исследования источников скороспелости при создании сортов были использованы лишь сорта Тулун 15 (в родословной среднераннего сорта Тулунская 11), характеризующийся коротким периодом от всходов до колошения, но при этом не выделившийся по урожайности (4.1 балла), и Симбирка (в родословной среднеспелого сорта Ульяновская 105), которая также формирует среднюю урожайность (4.5 балла из 9). Из выявленных источников высокой массы 1000 зерен лишь сорт Грекум 114 является одним из родителей районированного по Восточной Сибири с 2012 г. сорта Бурятская 551. Для сорта Бурятская 551 характерна высокая масса 1000 зерен относительно районированных в Сибирском регионе сортов (по данным Госсортокомиссии РФ масса 1000 зерен до 44 г). Самым успешным из используемых в селекции сортов среди выделенных в результате исследования источников можно назвать сорт Омская 20, который является одним из родителей сразу четырех сортов, включенных в Госреестр РФ по Уралу и Сибири: Алтайская 105, Омская 38, Башкирская 28 и Салават Юлаев.

Таким образом, изучение коллекции пшеницы мягкой яровой, проведенное с 1972 по 2016 г., позволяет выделить образцы, характеризующиеся высокой выраженностью селекционно-ценных признаков, таких как короткий период «всходы–колошение», «колошение–восковая спелость» и «всходы–созревание», высокая масса 1000 зерен, масса зерна колоса, урожайность и устойчивость к полеганию.

Acknowledgments

Experiments were conducted by researchers A.N. Lubnin, V.F. Dorofeev, N.V. Vavenkov, A.F. Zyryanova, V.I. Zhukov, A.Ya. Sotnik, and P.I. Stepochkin. The evaluation of the results was supported by the Institute of Cytology and Genetics, State Budgeted Project 0324-2018-0018; and by VIR, State Budgeted Project 0662-2018-0018.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Апанасенко В.В., Егорова И.Н., Бардунов А.О. Сортовое районирование сельскохозяйственных культур в Новосибирской области на 2015 год. Филиал ФГБУ «Госсортокомиссия» по Новосибирской области. Новосибирск: Ареал, 2015. [Apanasenko V.V., Egorova I.N., Bardunov A.O. Varietal Zoning of Crops in the Novosibirsk Region in 2015. State Commission of the Russian Federation for Selection Achievements Test and Protection, Novosibirsk branch. Novosibirsk: Areal Publ., 2015. (in Russian)]

Василова Н.З., Асхадуллин Д.Ф., Асхадуллин Д.Ф., Багавиева Э.З., Тазутдинова М.Р., Хусаинова И.И., Насихова Г.Р. Полевая устойчивость образцов яровой мягкой пшеницы к *Erysiphe (Blumeria) graminis* в условиях Предкамской зоны Республики Татарстан. Зерновое хоз-во России. 2016;6:59-62. [Vasilova N.Z., Askhadullin D.F., Askhadullin D.F., Bagavieva E.Z., Tazutdinova M.R., Khusainova I.I., Nasikhova G.R. Field resistance of spring soft wheat samples to *Erysiphe (Blumeria) graminis* in the conditions of the near-Kama area, Tatarstan. Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2016;6:59-62. (in Russian)]

Ведров Н.Г., Халипский А.Н. Сравнительная оценка сортов яровой пшеницы Западно-Сибирской и Восточно-Сибирской селекции.

Вестн. КрасГАУ. 2009;7:95-102. [Vedrov N.G., Halipskiy A.N. Comparative assessment of spring wheat varieties bred in West and East Siberia. Vestnik KrasGAU = Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University. 2009;7:95-102. (in Russian)]

Волкова Л.В. Урожайность яровой мягкой пшеницы и ее связь с элементами продуктивности в разные по метеорологическим условиям годы. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2016;6(55):9-15. [Volkova L.V. Yield of spring wheat and its relationship to performance elements under different weather conditions. Agrarnaya Nauka Evro-Severo-Vostoka = Agrarian Science of Northeastern European Russia. 2016;6(55):9-15. (in Russian)]

Воронина Л.В., Гриценко А.Г. Климат и экология Новосибирской области. Новосибирск: СГГА, 2011. [Voronina L.V., Gritsenko A.G. The Climate and Ecology of the Novosibirsk Region. Novosibirsk: SGGA Publ., 2011. (in Russian)]

Гончаров Н.П., Гончаров П.Л. Методические основы селекции растений. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2009. [Goncharov N.P., Goncharov P.L. Methodological Principles of Plant Breeding. Novosibirsk: Geo Publ., 2009. (in Russian)]

Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на территории Российской Федерации. URL: <http://reestr.gossort.com/reg/main/290> (Дата обращения 01.02.2018). [National Register of Breeding Achievements Admitted for Use in the Russian Federation. URL: <http://reestr.gossort.com/reg/main/290> (Accessed 01.02.2018)]

Давыдова Н.В., Казаченко А.О. Особенности подбора исходного материала для селекции яровой мягкой пшеницы в условиях Центрального Нечерноземья. Вестн. Алт. гос. аграр. ун-та. 2013;5:5-9. [Davydova N.V., Kazachenko A.O. Features of the selection of initial material for spring soft wheat breeding in the conditions of the Central non-Chernozem region. Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University. 2013;5:5-9. (in Russian)]

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. [Dosphehov B.A. Methods of Field Experiment (with the basics of the statistical processing of research results). Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)]

Захаров В.Г., Яковлева О.Д. Изменение качества зерна яровой мягкой пшеницы в процессе селекции. URL: [http://zhros.ru/num46\(4\)_2016/13.html](http://zhros.ru/num46(4)_2016/13.html) (дата обращения 20.05.2017). [Zakharov V.G., Yakovleva O.D. Changes of the Quality of Spring Wheat Grain in the Breeding Process. URL: [http://zhros.ru/num46\(4\)_2016/13.html](http://zhros.ru/num46(4)_2016/13.html) (Date of application 20.05.2017). (in Russian)]

Зуев Е.В., Белан И.А., Россеева Л.П., Мешкова Л.В., Блохина Н.П. Исходный материал для селекции пшеницы мягкой яровой в условиях Омской области. Успехи соврем. науки и образования. 2016;11:122-125. [Zuev E.V., Belan I.A., Rosseeva L.P., Meshkova L.V., Blokhina N.P. Sources for soft spring wheat breeding in the Omsk region. Uspekhi Sovremennoi Nauki i Obrazovaniya = Advances in Modern Science and Education. 2016;11:122-125. (in Russian)]

Зуев Е.В., Ляпунова О.А., Брыкова А.Н., Сурганова Л.Д., Никифоров М.Н., Разумова И.И., Плотникова Л.Н., Поточкина С.Н., Бородин Р.К., Иванова О.А., Кожушко Н.Н., Жукова А.Э., Чмелева З.В., Климентьева Н.Ф. Характер изменчивости скороспелых образцов яровой мягкой пшеницы в различных эколого-географических условиях. Каталог мировой коллекции ВИР. СПб.: ВИР, 1999;708:67. [Zuev E.V., Lyapunova O.A., Brykova A.N., Surganova L.D., Nikiforov M.N., Razumova I.I., Plotnikova L.N., Potokina S.N., Borodina R.K., Ivanova O.A., Kozhushko N.N., Zhukova A.E., Chmeleva Z.V., Kliment'eva N.F. The pattern of variability of early-ripening soft spring wheat accessions under various ecogeographical conditions. Katalog Mirovoi Kollektzii VIR = VIR World Collection Catalogue. St. Petersburg: VIR Publ., 1999; 708:67. (in Russian)]

Изогенная линия АНК-12. URL: <http://www-sbras.nsc.ru/win/elbib/atlas/show.dhtml?Isogen+id+24> (Дата обращения 25.05.2018).

- [Isogenic Line ANK-12. URL: <http://www-sbras.nsc.ru/win/elbib/atlas/show.dhtml?Isogen+id+24> (Date of application 25.05.2018). (in Russian)]
- Коновалова И.В., Богдан П.М. Корреляция признаков у яровой мягкой пшеницы в условиях Приморского края. Вестн. Гос. аграр. ун-та Сев. Зауралья. 2016;3(34):74-79. [Konovalova I.V., Bogdan P.M. Correlation of quantitative traits in spring soft wheat in Primorskiy Kray. Vestnik Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta Severnogo Zaural'ya = Bulletin of the Northern Trans-Ural State Agricultural University. 2016;3(34):74-79. (in Russian)]
- Коробейникова О.В., Красильников В.В. Сравнительное изучение сортов яровой пшеницы на сортоучастке ФГБОУ ВПО Ижевская ГСХА. Зерновое хоз-во России. 2015;2:17-21. [Korobeynikova O.V., Krasil'nikov V.V. Comparative study of spring wheat varieties in the variety testing plot of the Izhevsk State Agricultural Academy. Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2015;2:17-21. (in Russian)]
- Лепехов С.Б. Признаки с отрицательными эффектами и их значение для селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(3):337-343. DOI 10.18699/VJ16.114. [Lepekhov S.B. Traits with negative effects and their benefits for soft wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(3):337-343. DOI 10.18699/VJ16.114. (in Russian)]
- Лихенко И.Е., Шаманин В.П. Использование изогенных линий в моделировании и селекции яровой мягкой пшеницы в условиях Северного Зауралья. Омск: Изд-во ОмГАУ, 2003. [Likhenko I.E., Shamanin V.P. The Use of Isogenic Lines in the Modeling and Breeding of Spring Soft Wheat under the Conditions of the Northern Ural. Omsk: OmSAU Publ., 2003. (in Russian)]
- Лихенко И.Е., Артёмова Г.В., Степочкин П.И., Сотник А.Я., Гринберг Е.Г. Генофонд и селекция сельскохозяйственных растений. Сиб. вестн. с.-х. науки. 2014;5:35-41. [Likhenko I.E., Artemova G.V., Stepochkin P.I., Sotnik A.Ya., Grinberg E.G. Gene pool and breeding of agricultural plants. Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences. 2014;5:35-41. (in Russian)]
- Лобачев Ю.В. Проявление генов низкорослости у яровых пшениц в Нижнем Поволжье. Саратов: Изд-во СГАУ, 2000. [Lobachev Yu.V. Manifestation of the Short Stature Genes from Spring Wheat in the Lower Volga Region. Saratov: SSAU Publ., 2000. (in Russian)]
- Лубнин А.Н. Селекция мягкой яровой пшеницы в Сибири. Новосибирск: ИПЦ «Юпитер», 2006. [Lubnin A.N. Breeding of Soft Spring Wheat in Siberia. Novosibirsk: IPC Jupiter Publ., 2006. (in Russian)]
- Мальчиков П.Н., Мясникова М.Г. Возможности создания сортов яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) с широкой изменчивостью параметров вегетационного периода. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(2):176-184. [Malchikov P.N., Myasnikova M.G. Approaches to the development of durum wheat cultivars (*Triticum durum* Desf.) with wide variability of the growing season. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(2):176-184. (in Russian)]
- Мережко А.Ф., Удачин Р.А., Зуев Е.В., Филатенко А.А., Сербин А.А., Ляпунова О.А., Косов В.Ю., Куркиев У.К., Охотникова Т.В., Наврузбеков Н.А., Богуславский Р.Л., Абдулаева А.К., Чикида Н.Н., Митрофанова О.П., Потоккина С.А. Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и тритикале. Методические указания. СПб.: ВИР, 1999. [Merezhko A.F., Udachin R.A., Zuev E.V., Filatenko A.A., Serbin A.A., Lyapunova O.A., Kosov V.Yu., Kurkiev U.K., Okhotnikova T.V., Navruzbekov N.A., Boguslavskii R.L., Abdulaeva A.K., Chikida N.N., Mitrofanova O.P., Potokkina S.A. Replenishment, Preservation in Live Form, and Study of the World Collection of Wheat, Aegilops, and Triticale. Methodical guidelines. St. Petersburg: VIR Publ., 1999. (in Russian)]
- Мных С.В., Бугрей И.В., Рыжов В.А. Влияние длины вегетационного периода на урожайность риса. Современные технологии сельскохозяйственного производства и приоритетные направления развития аграрной науки: Материалы междунар. науч.-практ. конф. 2014;124-126. [Mnykh S.V., Bugrey I.V., Ryzhov V.A. Influence of growing season duration on rice yield. Modern technologies in agriculture and frontiers in the agrarian science. Proceedings of the international scientific and practical conference. 2014;124-126. (in Russian)]
- Образцов А.С. Биологические основы селекции растений. М.: Колос, 1981. [Obraztsov A.S. Biological Foundations of Plant Breeding. Moscow: Kolos Publ., 1981. (in Russian)]
- Пискарев В.В., Тимофеев А.А., Цильке Р.А. Результаты селекции яровой мягкой пшеницы на продуктивность в условиях лесостепи Западной Сибири. Сиб. вестн. с.-х. науки. 2010;8:18-24. [Piskarev V.V., Timofeyev A.A., Tsil'ke R.A. The results of spring common wheat breeding for productivity under the conditions of forest steppe in Western Siberia. Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences. 2010;8:18-24. (in Russian)]
- Прохоренко К.С., Горяев Д.Ю., Дмитриев В.Е. Использование методов контрастных сроков посева при изучении нормы высева яровой пшеницы. Вестн. КрасГАУ. 2007;3:84-87. [Prokhorenko K.S., Goryaev D.Yu., Dmitriev V.E. The use of methods of contrasting sowing terms in the study of the rate of spring wheat sowing. Vestnik KrasGAU = Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University. 2007;3:84-87. (in Russian)]
- Руденко М.И., Шитова И.П., Корнейчук В.А. Методические указания по изучению мировой коллекции пшеницы. Л.: ВИР, 1977. [Rudenko M.I., Shitova I.P., Korneychuk V.A. Methodological Guidelines for the Study of the World Wheat Collection. Leningrad: VIR Publ., 1977. (in Russian)]
- Тимошенкова Т.А., Самуилов Ф.Д. Зависимость продуктивности современных сортов яровой пшеницы от их морфологических особенностей в условиях степи Оренбургского Предуралья. Вестн. Казан. ГАУ. 2011;3(21):154-158. [Timoshenkova T.A., Samuilov F.D. Dependence of the productivity of modern spring wheat varieties on their morphological features in the steppe of the Orenburg Ural. Vestnik Kazanskogo GAU = Bulletin of the Kazan State Agrarian University. 2011;3(21):154-158. (in Russian)]
- Характеристики сортов растений, впервые включенных в 2016 году в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию: официальное издание. М.: Росинформагротех, 2016. [Characteristics of Plant Varieties, Included for the First Time in 2016 in the State Register of Breeding Achievements Admitted for Use: official edition. Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2016. (in Russian)]
- Цильке Р.А. Изменчивость характера наследования количественных признаков у мягкой яровой пшеницы в зависимости от условий вегетации. Сиб. вестн. с.-х. науки. 1974;2:31-39. [Tsil'ke R.A. Variability of the nature of inheritance of quantitative traits in soft spring wheat depending on vegetation conditions. Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences. 1974;2:31-39. (in Russian)]
- Цыбенков Б.Б., Билтуев А.С. Связь урожайности яровой пшеницы с элементами продуктивности в аридных условиях Бурятии. Вестн. Гос. аграр. ун-та Сев. Зауралья. 2016;2(33):87-93. [Tsybenov B.B., Biltuev A.S. The relationship of productivity of spring wheat to productivity elements under arid conditions of Buryatia. Vestnik Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta Severnogo Zaural'ya = Bulletin of the Northern Trans-Ural State Agricultural University. 2016; 2 (33):87-93. (in Russian)]
- Addison Ch.K., Mason R.E., Brown-Guedira G., Guedira M., Hao Yu., Miller R.G., Subramanian N., Lozada D.N., Acuna A., Arguello M.N., Johnson J.W., Sutton A.M., Harrison S.A. QTL and major genes influencing grain yield potential in soft red winter wheat adapted to the southern United States. Euphytica. 2016;209:665-677. DOI 10.1007/s10681-016-1650-1.

- Bhullar N.K., Street K., Mackay M., Yahiaoui N., Keller B. Unlocking wheat genetic resources for the molecular identification of previously undescribed functional alleles at the *Pm3* resistance locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(23):9519-9524. DOI 10.1073/pnas.0904152106.
- Friedrich C., Longin H., Reif J.C. Redesigning the exploitation of wheat genetic resources. *Trends Plant Sci.* 2014;19(10):631-636. DOI 10.1016/j.tplants.2014.06.012.
- Maccaferri M., Sanguineti M.C., Corneti S., Ortega J.L., Salem M.B., Bort J., Ambrogio E., Moral L.F., Demontis A., El-Ahmed A., Maalouf F., Machlab H., Martos V., Moragues M., Motawaj J., Nachit M., Nserallah N., Ouabbou H., Royo C., Slama A., Tuberosa R. Quantitative trait loci for grain yield and adaptation of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) across a wide range of water availability. *Genetics.* 2008;178:489-511.
- Randhawa H.S., Graf R.J., Pozniak C., Clarke J.M., Asif M., Hucl P., Spaner D., Fox S.L., Humphreys D.G., Knox R.E., Depauw R.M., Singh A.K., Cuthbert R.D. Application of molecular markers to wheat breeding in Canada. *Plant Breed.* 2013;132(5):458-471.
- Reif J.C., Zhang P., Dreisigacker S., Warburton M.L., Ginkel M., Hoisington D., Bohn M., Melchinger A.E. Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2005; 110:859-864. DOI 10.1007/s00122-004-1881-8.
- Sadeque A., Turner M.A. QTL analysis of plant height in hexaploid wheat doubled haploid population. *Thai J. Agric. Sci.* 2010;43: 91-96.
- Singh M., Kumar S. Broadening the Genetic Base of Grain Cereals. Springer, India, 2016. DOI 10.1007/978-81-322-3613-9.
- Souza E., Sorrells M.E. Prediction of progeny variation in oat from parental genetic relationships. *Theor. Appl. Genet.* 1991;82(2):233-241. DOI 10.1007/BF00226219.
- Tadesse W., Amri A., Ogbonnaya F.C., Sanchez-Garcia M., Sohail Q., Baum M. Wheat. In: Genetic and Genomic Resources for Grain Cereals Improvement. Elsevier Inc., 2016;2:81-124. DOI 10.1016/B978-0-12-802000-5.00002-2.
- Wessels E., Botes W.C. Accelerating resistance breeding in wheat by integrating marker-assisted selection and doubled haploid technology. *S. Afr. J. Plant Soil.* 2014;31(1):35-43.

ORCID ID

V.V. Piskarev orcid.org/0000-0001-9225-5227

E.V. Zuev orcid.org/0000-0001-9259-4384

A.N. Brykova orcid.org/0000-0002-2215-5068

Analysis of strawberry genetic collection (*Fragaria* L.) for *Rca2* and *Rpf1* genes with molecular markers

I.V. Luk'yanchuk , A.S. Lyzhin, I.I. Kozlova

I.V. Michurin Federal Scientific Centre, Michurinsk, Tambov region, Russia

Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) varieties are susceptible to many fungal diseases. Identification of forms, carrying resistance genes, is an important stage in breeding programs leading to resistant varieties. The use of molecular markers allows to determine with high reliability the presence of the necessary genes in the genome and to identify promising forms. Some of the common strawberry's diseases, causing significant damage to strawberry plantations, are anthracnose (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) and red stele root rot (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman). Dominant *Rca2* gene is involved in monogenic resistance to *C. acutatum* pathogenicity group 2. *Rpf1*, *Rpf2*, *Rpf3* genes are determined in monogenic resistance to red stele root rot. The purpose of this study was molecular genetic testing genotypes of genus *Fragaria* L. to identify carriers of *Rca2* allele anthracnose resistance and *Rpf1* allele red stele root rot resistance. The objects of study were the wild species of the genus *Fragaria* L. and strawberry varieties (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) of different ecological and geographic origin. To assess allelic state *Rca2* anthracnose resistance gene the dominant SCAR marker STS-Rca2_240 was used, was linked to the resistance gene *Rca2* with a genetic distance of 2.8 cM. *Rpf1* gene red stele root rot resistance was identified with the dominant SCAR marker R1A, was linked to the resistance gene *Rpf1* with a genetic distance of 3.0 cM. The resistant allele of the marker STS-Rca2_240 was identified in the Laetitia variety (*Rca2Rca2* or *Rca2rca2* genotype), which allows us to recommend it as a promising source in breeding for anthracnose resistance. The other studied forms have homozygous recessive state of the marker STS-Rca2_240 (putative genotype *rca2rca2*). The resistant allele of the marker SCAR-R1A in the varieties and wild species of strawberry under study is absent, which presumably indicates their homozygous recessive genotype of *Rpf1* gene (*rpf1rpf1*).

Key words: strawberry; molecular markers; resistance; anthracnose; red stele root rot; *Rca2* and *Rpf1* genes.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Luk'yanchuk I.V., Lyzhin A.S., Kozlova I.I. Analysis of strawberry genetic collection (*Fragaria* L.) for *Rca2* and *Rpf1* genes with molecular markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):795-799. DOI 10.18699/VJ18.423

Анализ генетической коллекции земляники (*Fragaria* L.) по генам *Rca2* и *Rpf1* с использованием молекулярных маркеров

И.В. Лукъянчук , А.С. Лыжин, И.И. Козлова

Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина, Мичуринск, Тамбовская область, Россия

Сорта земляники садовой (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) восприимчивы ко многим грибным заболеваниям. Идентификация форм, несущих гены устойчивости, является важным этапом селекционных программ по созданию устойчивых сортов. Использование молекулярных маркеров позволяет с высокой надежностью определить присутствие в геноме необходимых генов и идентифицировать перспективные формы. К числу распространенных заболеваний земляники, наносящих значительный ущерб насаждениям, относятся антракнозная гниль (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) и фитофторозное увядание (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman). Моногенная устойчивость к *C. acutatum* второй группы патогенности контролируется доминантным геном *Rca2*. Моногенная устойчивость земляники к фитофторозной корневой гнили детерминирована несколькими олигогенами – *Rpf1*, *Rpf2*, *Rpf3*. Целью настоящего исследования было молекулярно-генетическое тестирование генотипов рода *Fragaria* L. для идентификации носителей аллелей *Rca2* устойчивости к антракнозу и *Rpf1* устойчивости к фитофторозной корневой гнили. Объектами исследования являлись дикорастущие виды рода *Fragaria* L. и сорта земляники ананасной (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) различного эколого-географического происхождения. Для оценки аллельного состояния гена *Rca2* устойчивости к антракнозу использовали доминантный SCAR-маркер STS-Rca2_240, локализованный на расстоянии 2.8 cM от гена. Для выявления гена *Rpf1* устойчивости к фитофторозной корневой гнили использовали доминантный SCAR-маркер R1A, находящийся на расстоянии 3.0 cM от гена. Доминантный аллель маркера STS-Rca2_240 идентифицирован у сорта Laetitia (генотип *Rca2Rca2* или *Rca2rca2*), что позволяет рекомендовать его в качестве перспективного источника устойчивости к антракнозу для селекции. Остальные изученные формы характеризуются рецессивным гомозиготным состоянием маркера STS-Rca2_240 (предполагаемый генотип *rca2rca2*). Доминантный аллель маркера SCAR-R1A у изучаемых сортов и дикорастущих видов земляники не выявлен, что предположительно свидетельствует об их рецессивном гомозиготном генотипе по гену *Rpf1* (*rpf1rpf1*).

Ключевые слова: земляника; молекулярные маркеры; устойчивость; антракноз; фитофтороз; гены *Rca2*; *Rpf1*.

Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) is the most popular and economically important berry crop (Hummer, Hancock, 2009). The commercial plantations of strawberry are cultivated in 75 countries and it account for over 2/3 of the world berries production (FAOStat, 2018). At the same time, the strawberry is susceptible to many diseases and the mass development of them can lead to the 100 % death of the crop (Folta, Davis, 2006).

Anthracoze (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) and red stele root rot (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman) are among the most harmful strawberry diseases causing significant damage to strawberry plantations in Europe and America (Smith, 2008; Newton et al., 2010). The most of commercial strawberry varieties of foreign breeding are susceptible to anthracnose and red stele root rot (Van de Weg, 1997a; Denoyes-Rothan et al., 2005). For the last years the pathogens of anthracnose and red stele root rot being tested in strawberry plantings of Russia and besides *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* is included in the list of Quarantine pests, weeds and plant diseases in Russia (Aleksandrov et al., 2007; Golovin, 2014; Dudchenko et al., 2015).

Anthracoze affects the aboveground part of strawberry: fruits, flowers, petioles, leaves, stolons, causing a significant suppression of the plant, and sometimes there can be the death of plant. Pathogen can be located on a plant for a long time in latent state, this fact significantly complicates the reliable identification and protective measures (Leandro et al., 2001). The losses of marketable yield of strawberries because of anthracnose may reach 80 % (Dudchenko et al., 2015).

P. fragariae var. *fragariae* affect the root system, inhibiting the growth, causing withering and afterwards death of the plants. It is difficult to diagnose the pathogen visually because of similarity of symptoms of infection and stress factors (de los Santos et al., 2004; Aleksandrov et al., 2007). The occurrence of pathogen can be observed mainly after using of infected planting material, and the oospores can persist in soil in the absence of host plant according to the different data from 3 to 17 years (Duncan, Cowan, 1980; Szkuta, 2006).

In connection with it, the development of new highly resistant to pathogens strawberry varieties is an important breeding task. The cultivation of varieties with genetic resistance to diseases will increase the profitability of plantations and as well as positively effect the ecological state of strawberry agrocenoses due to reduce to pesticide load (Korbin, 2011).

To improve the strawberry assortment it is very important: to deepen the genetic research, to reveal the patterns of loci inheriting economically important trait and to identify the donors. One of the promising trends to raise the efficiency of strawberry genetic studies became the use of contemporary techniques of molecular genetic analysis of genome applying DNA markers. At present time the molecular markers are wide applied in the analysis of genetic diversity, mapping, and strawberry variety genotype identification. But molecular markers are less involved in strawberry breeding (Whitaker, 2011).

The purpose of current study was to carry out molecular genetic testing of genus *Fragaria* L. genotypes. It was necessary to identify carrier of *Rca2* anthracnose resistance gene and *Rpfl* red stele root rot resistance gene.

Materials and methods

Biological material was represented by wild species of the genus *Fragaria* L.: *F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., *F. ovalis* Rydb., *F. virginiana* Rydb. ssp. *platypetala* and strawberry varieties (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) of different ecological and geographical origin from genetic collection of the FSSI “I.V. Michurin Federal Scientific Centre (FSC)”, such as Lastochka, Privlekatelnaya, Urozhainaya CGL, Feyerverk, Flora and Yarkaya breeding by FSSI “I.V. Michurin FSC” (Russia), Baron Solemacher (Germany), Elsanta, Korona, Kimberly, Vicoda, Vima Tarda, Vima Xima, Vima Zanta (Netherlands), Florence (England), Kent (Canada), Laetitia (Italy), Red Gauntlet (Scotland).

To assess allelic state *Rca2* anthracnose resistance gene was used the dominant SCAR marker STS-Rca2_240. The SCAR marker STS-Rca2_240 was multiplexed with the microsatellite marker EMFv020 used as the positive PCR control (Lerceteau-Kohler et al., 2005).

The *Rpfl* red stele root rot resistance gene was identified with the dominant marker SCAR-R1A (Haymes et al., 2000).

Primer sequences and product length are reported in Table 1. Used in this study primers were synthesized by Syntol (Russia).

Total genomic DNA was extracted from the fresh leaves using the Diversity Arrays Technology P/L (DArT) protocol. However, the use of the basic protocol did not allow obtaining DNA extract with the degree of purity necessary for PCR analysis because despite of the high concentration of DNA in solution, inhibition of test PCR was observed. To reduce the content of inhibitory impurities in the DNA solution, an additional double purification of DNA with 5M NaCl with reprecipitation with 70 % ethanol included the following steps was used. 100 µl of 5M NaCl and 400 µl of 70 % ethanol were added to the DNA solution; mix centrifuged at 13,000 rpm for 5 min; the supernatant was removed; the precipitate was washed twice with 80 % ethanol, dried at room temperature and dissolved in deionized water. As a result of these steps, DNA extract with necessary of concentration and purity for PCR reaction was obtained.

PCR reactions were performed in 15 µl final volume containing: 20 ng of genomic DNA, 0.2 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer, 0.2 U of Taq DNA polymerase (0.8 U for multiplex PCR STS-Rca2_240 + EMFv020) and 1.5 µl of PCR-buffer (+ (NH₄)₂SO₄, -KCl). All components produced by Thermo Fisher Scientific.

The amplification was performed in T100 Thermal Cycler (BioRad). PCR conditions for the multiplex PCR reaction (STS-Rca2_240 and EMFv020) were as described by Lerceteau-Kohler et al. (2005) as follow: 3 min denaturation at 95 °C, 35 cycles of 50 s at 95 °C, 50 s at 64 °C, and 1 min at 72 °C, and a final extension step of 5 min at 72 °C.

PCR conditions for the SCAR-R1A marker were as described by Haymes et al. (2000) as follow: 3 min denaturation at 94 °C, 25 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 60 °C, and 1 min at 72 °C, and a final extension step of 7 min at 72 °C.

The amplification products were separated on a 2 % agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) was used as a molecular weight marker.

Table 1. Primer sequences and product length in base pairs of the molecular markers used in the study

Gene	Marker	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
<i>Rca2</i>	STS-Rca2_240	F 5'-GCCACGTCAGTCAAATTCAA-3' R 5'-TCATGGACAGTGGTCTCAGC-3'	240
	EMFv020 (контроль ПЦР)	F 5'-CAGGCGCCAACGGCGTCTTGT-3' R 5'-CAGCGCCGACGTATCCCTAGG-3'	~170
<i>Rpf1</i>	SCAR-R1A	F 5'-TGCATCATTAAATGTAGAAGTCTTT-3' R 5'-TGATGCGACATACAAAAATATTAG-3'	285

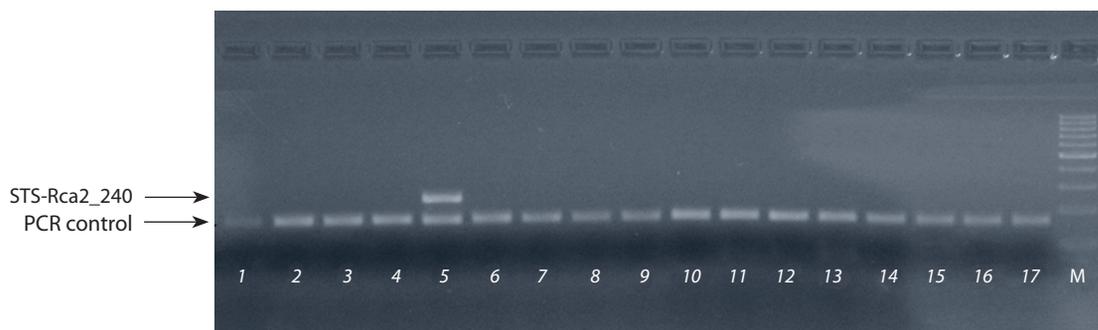


Fig. 1. Electrophoresis profile of marker STS-Rca2_240 at strawberry genotypes.

1 – Elsanta, 2 – Kent, 3 – Red Gauntlet, 4 – Florence, 5 – Laetitia, 6 – Vima Tarda, 7 – Urozhnayaya CGL, 8 – Vicoda, 9 – Feyerverk, 10 – Privlekatelnaya, 11 – Kimberly, 12 – Vima Zanta, 13 – Korona, 14 – Yarkaya, 15 – Flora, 16 – Lastochka, 17 – Vima Xima, M – DNA ladder.

Results and discussion

Fragaria × ananassa Duch. is difficult object for molecular genetic analysis. The high ploidy level (8x), the combination of different basic genomes in the genotype, complex gene interactions, and polygenic control of traits make it difficult to study the genetics of strawberry. Disease resistance in strawberry in most cases is also controlled quantitatively.

Currently, however, monogenic resistance factors have been identified for some pathogens (*C. acutatum*, *P. fragariae* var. *fragariae*) (Van de Weg, 1997a, b; Lerceteau-Kohler et al., 2002) and this allows effective screening of resistant genotypes using molecular markers.

Anthracoze resistance in strawberry is controlled by quantitative and monogenic factors. Resistance to *C. acutatum*, pathogenicity group 1 is quantitative (Denoyes-Rothan et al., 2004). Single dominant gene, *Rca2*, controls the resistance to *C. acutatum*, pathogenicity group 2 (Lerceteau-Kohler et al., 2002).

The SCAR marker STS-Rca2_240 was linked to the resistance gene *Rca2* with genetic distance of 2.8 cM. The PCR product associated with the resistance *Rca2* allele has 240 bp. The linked inheritance of the marker alleles and the *Rca2* gene allows, based on the presence or absence of the marker alleles, to identify the allelic state of the *Rca2* gene (Lerceteau-Kohler et al., 2005).

In studied collection of strawberry, the resistant allele of the marker STS-Rca2_240 was identified in the Laetitia variety (*Rca2Rca2* or *Rca2rca2* genotype). The other studied forms have homozygous recessive state of the marker STS-Rca2_240 linked to *Rca2* resistance gene (putative genotype *rca2rca2*) (Fig. 1, Table 2).

The absence of a dominant allele of the STS-Rca2_240 marker in the anthracnose resistant variety Vicoda can be presumably due to two factors: the recombination that occurred in the variety (or its parental forms) between the *Rca2* resistance gene and the marker STS-Rca2_240 (Lerceteau-Kohler et al. (2005) noted similar recombination for the US292 genotype and its parent form Arking.) or the presence of other genetic resistance factors.

The recessive state SCAR marker STS-Rca2_240 in species *F. virginiana* ssp. *platipetala* and strawberry variety Elsanta confirmed in literature data (Njuguna, 2010; Sturzeanu et al., 2016). It should be noted that, according to W. Njuguna (2010), the dominant allele of the STS-Rca2_240 marker linked to the *Rca2* gene is present in the Red Gauntlet variety, while, according to our research, in this variety the *Rca2* gene is presumably represented by the recessive allele. Such a discrepancy in the results may be presumably due to an identification error and requires additional research. However, according to the results of artificial infection, the Red Gauntlet variety is susceptible to *C. acutatum* (Simpson et al., 1994), which indirectly confirms our data.

Monogenic resistance to red stele root rot of strawberry determined several genes. W.E. Van de Weg analyzing the interaction model of strawberry varieties and races of *P. fragariae* var. *fragariae* identified 5 resistance factors (R1–R5), corresponding to specific pathogen avirulence gene (Avr1–Avr5) (Van de Weg, 1997b). The main role in the formation of strawberry red stele root rot resistance belongs to three genes – *Rpf1*, *Rpf2*, *Rpf3* (Whitaker, 2011). *Rpf1* gene ensuring resistance of strawberry genotypes to 16 races of *P. fragariae* var. *fragariae* (Sasnauskas et al., 2007).

Table 2. Presence (1) or absence (0) PCR products of the indicated markers, linked to *c Rca2* anthracnose resistance gene and *Rpf1* red stele root rot resistance gene in different strawberry varieties

Species/variety	<i>Rca2</i>	<i>Rpf1</i>	Putative genotype
	STS-Rca2_240	SCAR-R1A	
<i>F. orientalis</i> Los.	0	0	<i>rca2rca2rpf1rpf1</i>
<i>F. moschata</i> Duch.	0	0	
<i>F. ovalis</i> Rydb.	0	0	
<i>F. virginiana</i> Rydb. ssp. <i>platypetala</i>	0	0	
Baron Solemacher (<i>F. vesca</i> L.)	0	0	
Lastochka (922-67 × Privlekatelnaya)	0	0	
Privlekatelnaya (Rubinovy kulon × Allbritton)	0	0	
Urozhainaya CGL (Zenga Zengana × Redcoat)	0	0	
Feyerverk (Zenga Zengana × Redcoat)	0	0	
Flora (Zenga Zengana × Redcoat)	0	0	
Yarkaya (Zenga Zengana × Redcoat)	0	0	
Elsanta (Gorella × Holiday)	0	0	
Florence (Tioga × (Red Gauntlet × (Wiltguard × Gorella))) × (Providence × Providence)	0	0	
Kent ((Red Gauntlet × Tioga) × Raritan)	0	0	
Kimberly (Gorella × Chandler)	0	0	
Korona (Tamella × Induka)	0	0	
Laetitia (Chance seedling)	1	0	<i>Rca2rca2rpf1rpf1</i>
Red Gauntlet ((NJ New Jersey 1051 × Climax) × (Climax × 1051))	0	0	<i>rca2rca2rpf1rpf1</i>
Vicoda (Chance seedling)	0	0	
Vima Tarda (Vima Zanta × Vicoda)	0	0	
Vima Xima (Chance seedling)	0	0	
Vima Zanta (Elsanta × Korona)	0	0	

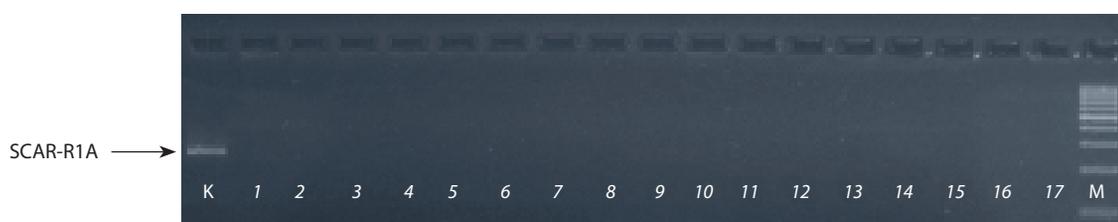


Fig. 2. Electrophoresis profile of marker SCAR-R1A at strawberry genotypes.

K – Tristar (control), 1 – Elsanta, 2 – Kent, 3 – Red Gauntlet, 4 – Florence, 5 – Laetitia, 6 – Vima Tarda, 7 – Urozhainaya CGL, 8 – Vicoda, 9 – Feyerverk, 10 – Privlekatelnaya, 11 – Kimberly, 12 – Vima Zanta, 13 – Korona, 14 – Yarkaya, 15 – Flora, 16 – Lastochka, 17 – Vima Xima, M – DNA ladder.

The marker SCAR-R1A was linked to the resistance gene *Rpf1* with genetic distance of 3.0 cM. The PCR product associated with the resistance *Rpf1* allele has 285 bp. In genotypes with a homozygous recessive state of the gene *Rpf1* (*rpf1rpf1*), this product is not amplified (Haymes et al., 2000). The molecular analyzes performed with SCAR-R1A marker showed the absent PCR product of 285 bp in studied strawberry varieties (Fig. 2), which presumably indicates their homozygous recessive genotype of *Rpf1* gene – *rpf1rpf1* (see Table 2).

The recessive state SCAR-R1A marker in the Elsanta and Kent varieties is confirmed in literature data (Haymes et al., 2000; Sturzeanu et al., 2016). According to the data

of W. Njuguna (2010), the populations of *F. virginiana* ssp. *platipetala* of various growing sites also have not the dominant allele SCAR-R1 marker linked to the *Rpf1* gene.

Thus, according to the results of molecular genetic analysis, the studied strawberry genotypes were identified as susceptible to red stele root rot by assessing the allelic state of the *Rpf1* gene. The Laetitia variety is characterized to anthracnose resistance by assessing the allelic state of the *Rca2* gene, which allows us to recommend it as a promising source in breeding for resistance to *C. acutatum*, pathogenicity group 2.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы/References

- Aleksandrov I.N., Skripka O.V., Dudchenko I.P., Surina T.A., Nikiforov S.V. Red stele root rot in strawberry. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2007;5:32-34. (in Russian)
- De los Santos B., Barrau C., Romero F. Strawberry fungal diseases. In: *Crop Management and Postharvest Handling of Horticultural Products*. 2004;4:233-268.
- Denoyes-Rothan B., Guerin G., Lerceteau-Kohler E., Risser G. Inheritance of a race-specific resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria ananassa*. *Phytopathology*. 2005;95:405-412. DOI 10.1094/PHYTO-95-0405.
- Denoyes-Rothan B., Lerceteau-Kohler E., Guerin G., Bosseur S., Bariac J., Martin E., Roudeillac P. QTL analysis for resistance to *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum* in octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Acta Hort.* 2004;663:147-151. DOI 10.17660/ActaHortic.2004.663.19.
- Dudchenko I.P., Skripka O.V., Kopina M.B. Outbreak of strawberry anthracnose in the Voronezh region. *Current Mycology in Russia: Materials of the III Int. Mycological Forum*. Moscow, 2015;5(4):28-29. (in Russian)
- Duncan J.M., Cowan J.B. Effect of temperature and soil moisture content on persistence and infectivity of *Phytophthora fragariae* in naturally infected soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1980;75:133-139.
- FAOStat. 2018. Available at <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>.
- Folta K.M., Davis T.M. Strawberry genes and genomics. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2006;25:399-415. DOI 10.1080/07352680600824831.
- Golovin S.E. New diseases of strawberries in the central Russia. *Plodovodstvo i Yagodovodstvo Rossii = Pomiculture and Small Fruits Culture in Russia*. 2014;1:88-95. (in Russian)
- Haymes K.M., Van de Weg W.E., Arens P., Maas J.L., Vosman B., Den Nijs A.P.M. Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry genotypes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2000;125(3):330-339.
- Hummer K., Hancock J.F. Strawberry genomics: botanical history, cultivation, traditional breeding, and new technologies. In: Folta K.M., Gardiner S.E. (Eds.). *Genetics and Genomics of Rosaceae* (ser. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*). Springer, 2009;413-436.
- Korbin M.U. Molecular approaches to disease resistance in *Fragaria* spp. *J. Plant Prot. Res.* 2011;51(1):60-65. DOI 10.2478/v10045-011-0011-2.
- Leandro L.F.S., Gleason M.L., Nutter F.W., Jr., Wegulo S.N., Dixon P.M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology*. 2001;91(7):659-664. DOI 10.1094/PHYTO.2001.91.7.659.
- Lerceteau-Kohler E., Guerin G., Denoyes-Rothan B. Identification of SCAR markers linked to *Rca2* anthracnose resistance gene and their assessment in strawberry germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111:862-870. DOI 10.1007/s00122-005-0008-1.
- Lerceteau-Kohler E., Roudeillac P., Markocic M., Guerin G., Praud K., Denoyes-Rothan B. The use of molecular markers for durable resistance breeding in the cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Acta Hort.* 2002;567(2):615-618. DOI 10.17660/ActaHortic.2002.567.132.
- Newton A.C., Duncan J.M., Augustin N.H., Guy D.C., Cooke D.E.L. Survival, distribution and genetic variability of inoculum of the strawberry red core pathogen, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, in soil. *Plant Pathol.* 2010;59(3):472-479. DOI 10.1111/j.1365-3059.2010.02273.x.
- Njuguna W. Development and Use of Molecular Tools in *Fragaria*. Oregon State Univ., 2010.
- Sasnauskas A., Rugienius R., Gelvonauskienė D., Zalunskaitė I., Staniėnė G., Siksniėnas T., Stanyš V., Bobinas C. Screening of strawberries with the red stele (*Phytophthora fragariae*) resistance gene *Rpf1* using sequence specific DNA markers. *Acta Hort.* 2007;760:165-169. DOI 10.17660/ActaHortic.2007.760.21.
- Simpson D.W., Winterbottom C.Q., Bell J.A., Maltoni M.L. Resistance to a single UK isolate of *Colletotrichum acutatum* in strawberry germplasm from Northern Europe. *Euphytica*. 1994;77(1-2):161-164.
- Smith B.J. Epidemiology and pathology of strawberry anthracnose: a North American perspective. *HortScience*. 2008;43(1):69-73.
- Sturzeanu M., Coman M., Ciuca M., Ancu I., Cristina D., Turcu A.G. Molecular characterization of allelic status of the *Rpf1* and *Rca2* genes in six cultivars of strawberries. *Acta Hort.* 2016;1139:107-112. DOI 10.17660/ActaHortic.2016.1139.19.
- Szkuta G. Czerwona zgnilizana korzeni truskawki [Red core of strawberry]. *Ochrona Roslin*. 2006;51:17-21.
- Van de Weg W.E. Resistance to *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in strawberry: the *Rpf2* gene. *Theor. Appl. Genet.* 1997a;94(8):1092-1096. DOI 10.1007/s001220050520.
- Van de Weg W.E. A gene-for-gene model to explain interactions between cultivars of strawberry and races of *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*. *Theor. Appl. Genet.* 1997b;94(3-4):445-451. DOI 10.1007/s001220050435.
- Whitaker V.M. Applications of molecular markers in strawberry. *J. Berry Res.* 2011;1:115-127. DOI 10.3233/BR-2011-013.

ORCID ID

I.V. Luk'yanchuk orcid.org/0000-0003-1626-840X

A.S. Lyzhin orcid.org/0000-0001-9770-8731

I.I. Kozlova orcid.org/0000-0003-4150-3037

Варьирование жирнокислотного состава масла семян в коллекции индуцированных мутантов льна масличного (*Linum humile* Mill.)

А.В. Тигова , А.И. Сорока

Институт масличных культур Национальной академии аграрных наук Украины, Запорожская область, Запорожский район, пос. Солнечный, Украина

Широкое разнообразие сфер применения семян льна требует от селекционеров выведения сортов с различными показателями, соответствующими назначению конечной продукции. Одним из способов решения этой задачи является метод экспериментального мутагенеза, позволяющий за относительно короткий срок создать в пределах одного вида мутантные линии с разнообразными морфометрическими и биохимическими признаками. В статье показано, что обработка семян льна масличного (*Linum humile* Mill.), сортов Айсберг и Солнечный новыми химическими мутагенами ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7, ДГ-9 – производными диметилсульфата, а также мутагенами диметилсульфата и этилметансульфоната привела к получению мутантных линий и образцов с измененными морфометрическими и биохимическими показателями. Семена исходных сортов обрабатывали 0.5 и 0.05 % водными растворами вышеуказанных веществ и высевали в поле для получения поколений М₁, М₂ и М₃. В итоге выявлено 27 типов мутаций, которые разделены на пять групп по морфометрическим характеристикам. Изучен жирнокислотный состав масла семян выделенных мутантных форм: содержание пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой (ω₆) и линоленовой (ω₃) кислот, а также соотношение ω₆/ω₃. Статистический анализ показал достоверную разницу между мутантными линиями и образцами по биохимическому составу масла. Продемонстрирована сильная отрицательная корреляционная взаимосвязь между содержанием линолевой и линоленовой кислот и положительная зависимость средней силы между содержанием стеариновой и олеиновой кислот у обоих сортов. Полученные мутантные образцы могут использоваться в качестве исходных форм для ведения селекционной работы по льну в различных направлениях.

Ключевые слова: лён; мутагенез; химический мутаген; диметилсульфат; этилметансульфонат; мутация; линия; образец; жирная кислота.

Variation of fatty acid composition in seed oil in the collection of induced oil flax (*Linum humile* Mill.) mutants

A.V. Tigova , A.I. Soroka

Institute of Oilseed Crops of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Zaporozhye, Settl. Solnechnyy, Ukraine

A wide variety of application fields for flax seeds requires for breeders to develop new varieties with different characteristics, corresponding to the intended final product. The method of experimental mutagenesis is one of the ways to solve this problem. This method allows mutant lines with an array of morphometric and biochemical traits to be created from a single species and within a relatively short period of time. The article demonstrates that treatment of *Linum humile* Mill. seeds of the cultivars Iceberg and Solnechnyy with the new chemical mutagens DG-2, DG-6, DG-7, DG-9 (derivatives of dimethyl sulfate (DMS)) as well as with the mutagens DMS and EMS resulted in the production of mutant lines and accessions with altered morphometric and biochemical parameters. Seeds of the initial cultivars were treated with 0.5 and 0.05 % aqueous solutions of the above mentioned substances and planted in the field to raise M₁, M₂, and M₃ generations. Ultimately, 27 types of mutations were identified and subdivided into five groups by morphometric characteristics. The fatty acid composition of seed oil for the isolated mutant specimens was studied: the content of palmitic, stearic, oleic, linoleic (ω₆) and linolenic (ω₃) acids, as well as the ω₆/ω₃ ratio. The statistical analysis showed significant distinctions between the mutant lines in the biochemical composition of the oil. A strong negative correlation between the content of linoleic and linolenic acids was demonstrated, as well as a positive relationship of average strength between the content of stearic and oleic acids for the both varieties. The mutant accessions obtained can be used as donor material for conducting breeding work on flax in various directions.

Key words: flax; mutagenesis; chemical mutagen; dimethyl sulfate; ethyl methanesulfonate; mutation; line; accession; fatty acid.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Тигова А.В., Сорока А.И. Варьирование жирнокислотного состава масла семян в коллекции индуцированных мутантов льна масличного (*Linum humile* Mill.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):800-811. DOI 10.18699/VJ18.424

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Tigova A.V., Soroka A.I. Variation of fatty acid composition in seed oil in the collection of induced oil flax (*Linum humile* Mill.) mutants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):800-811. DOI 10.18699/VJ18.424

Лён – одна из ценнейших сельскохозяйственных культур. Семена льна использовали в пищевых, медицинских и технических целях еще с древних времен. Первое упоминание о медицинском применении семян льна появляется в работах Авиценны, Гиппократы, Диоскорида, в средневековых травниках Европы и Азии (Лях и др., 2009). В настоящее время в развитых странах мира наблюдается повышенный интерес к культуре льна со стороны пищевой и фармацевтической промышленности (Пелипенко и др., 2014). За последние 15–20 лет были подробно изучены биохимический состав семян льна, значение для организма человека входящих в семена химических соединений и их метаболизм (Низова, Брач, 2010).

Льняное семя – богатый источник α -линоленовой кислоты, растворимых волокон, а также главный источник диетических фенольных соединений фитоэстрогенной природы, называемых лигнанами. Среди лигнанов самым распространенным является секоизоларицирезинола диглюкозид (SDG) (Prasad, 2000; Феськова и др., 2009). Это один из главных предшественников лигнанов млекопитающих – энтеролактона и энтеродиола, которые играют важную роль в защите от гормонозависимых видов рака (рак молочной железы, простаты, щитовидной железы и т. д.). Кроме того, в ряде работ (Prasad, 2001; Spence et al., 2003; Rodriguez-Leyva et al., 2010) лён рекомендуется применять при атеросклерозе, сахарном диабете, остеопорозе, при проблемах желудочно-кишечного тракта, болезнях кожи и некоторых других заболеваниях.

Основным химическим компонентом семян льна является масло, количество которого составляет в среднем от 27 до 47 % и даже более. По содержанию биологически ценных компонентов льняное масло занимает первое место среди других пищевых растительных масел (Бражников и др., 2015). Триглицериды масла льна состоят преимущественно из пяти жирных кислот: двух насыщенных – пальмитиновой (C 16:0) и стеариновой (C 18:0) и трех ненасыщенных – олеиновой (C 18:1), линолевой (C 18:2) и линоленовой (C 18:3), содержание которых, по нашим данным, для сорта-стандарта Украины «Южная ночь» в среднем составляет 6.4, 3.0, 19.7, 15.6 и 55.3 % соответственно. Целебные свойства льняного масла определяются прежде всего высоким содержанием в нем биологически активных незаменимых полиненасыщенных жирных кислот: линолевой (омега-6) и линоленовой (омега-3) с двумя и тремя двойными связями соответственно. На долю линоленовой кислоты обычно приходится 50–60 % от суммы жирных кислот масла. Наличие трех двойных связей в ее молекуле обуславливает высокую биологическую активность кислоты, быстрое высыхание масла и непродолжительный срок его хранения. Именно высокое содержание линоленовой кислоты позволяет делать из льняного масла высококачественные лакокрасочные материалы, специальные антикоррозионные покрытия и линолеум (Green, Marshall, 1984). В то же время высокая концентрация линоленовой кислоты обуславливает быстрое окисление (прогоркание) льняного масла. По этой причине оно может храниться не более трех месяцев. Проблема хранения льняного масла решается путем создания мутантов (Brutch, Kutuzova, 1999), а

затем и сортов, содержащих не более 2.5 % линоленовой кислоты (Dribnenki et al., 1996).

Из литературных данных известно, что синтез жирных кислот у льна начинается с образования пальмитиновой кислоты ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$) на основе ацетил-КоА и мелонил-КоА под действием мультиферментного комплекса. Стеариновая кислота ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$) синтезируется из пальмитиновой с помощью элонгаз, отвечающих за удлинение цепи жирных кислот. Этот процесс контролирует ген *FAB1*. Последовательное образование двойных связей в цепи стеариновой кислоты осуществляют различные десатуразы. Сначала стеарол-АСР десатуразы, которые кодируются генами *SAD1* и *SAD2*, формируют первую двойную связь в 9 положении углеродной цепи, образуя олеиновую кислоту ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$). Олеиновая кислота служит предшественником линолевой ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$), у которой добавляется еще одна двойная связь в 6 положении под действием жирнокислотных десатураз-2, кодируемых генами *FAD2A*, *FAD2B*. Из линолевой кислоты образуется α -линоленовая кислота ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$) при участии генов *FAD3A*, *FAD3B* и *FAD3C*, которые контролируют десатуразы-3, формирующие в 3 положении третью по счету двойную связь (Vrinten et al., 2005; Banik et al., 2011). Все перечисленные гены имеют множественные аллели, несущие делеции и точечные мутации (Krasowska et al., 2007; Khadake et al., 2009; Thambugala et al., 2013). Гены десатуразы-2 у льна признаны основными, определяющими жирнокислотный состав масла (Fofana et al., 2006). Совмещение мутаций по данному локусу в генотипе одного растения приводит к резкому повышению уровня содержания линолевой кислоты, а количество линоленовой кислоты снижается до 2 % (Vrinten et al., 2005).

Впервые высоколиноленовые (более 62.7 %), высокоолеиновые (более 25.1 %) и низколиноленовые (менее 2.3 %) линии льна были созданы в Австралии методом химического мутагенеза (Green, 1986). На основе линии с низким содержанием линоленовой кислоты был получен сорт (типа *solin*) *Linola*, с двойными рецессивными гомозиготами по комплементарным генам *ln1* и *ln2* (Dribnenki et al., 1996). Позднее получены другие сорта, обладающие сбалансированным для пищевых целей составом масла (Nichterlein et al., 1988).

В Институте масличных культур НААН Украины (г. Запорожье) с 1989 г. ведется успешная работа по созданию новых сортов льна масличного, которая осуществляется традиционными (гибридизация, массовый и индивидуальный отбор, экспериментальный мутагенез) и новейшими (пыльцевая селекция, культура пыльников) методами селекции для технических и пищевых целей. Согласно сегодняшним представлениям, при использовании льна в питании рекомендуется соблюдать соотношение $\omega 6/\omega 3$ -кислот 5–10/1 для обычного питания и 3–5/1 – для лечебного (Пороховинова и др., 2016). Поэтому селекцию сортов льна по жирнокислотному составу, дающих не техническое, а пищевое масло, проводят в основном на изменение содержания уровня линоленовой кислоты до указанных выше пределов соотношения $\omega 6/\omega 3$ -кислот, рекомендованных для здорового или лечебного питания.

Целью наших исследований было создание и оценка новых мутантных линий льна масличного с различным жирнокислотным составом масла для расширения генетического разнообразия и развития новых направлений использования льнопродукции.

Материалы и методы

Исходным материалом для создания генетического разнообразия послужили два образца из генетической коллекции Института масличных культур (ИМК) НААН Украины – сорта Айсберг и Солнечный льна масличного *Linum humile* Mill. Сорт Айсберг создан методом индуцированного мутагенеза путем обработки гамма-лучами семян сорта Циан в ИМК НААН. Данный сорт имеет белые лепестки, кремовые пыльники и коричневую окраску семян. Сорт Солнечный, селекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси, отличается низким содержанием (менее 2 %) линоленовой кислоты. У сорта Солнечный цветки голубые с фиолетовым оттенком, голубые пыльники и желтая окраска семян.

Семена льна масличного *L. humile* сортов Айсберг и Солнечный (по 300 шт. на вариант) замачивали в 0.05 и 0.5 % водных растворах мутагенов в течение 16 ч. В контроле семена замачивали в дистиллированной воде. Обработанные семена промывали и в тот же день высевали в открытый грунт. Собранные с растений M_1 семена посевом высевали на следующий год для получения растений M_2 . Каждая семья в M_2 – это потомство одного из растений M_1 . В поколении M_2 проводили учет видимых изменений, а их генетическую природу подтверждали после анализа наследования данных мутаций в поколении M_3 . Кроме того, в поколении M_3 выполнялся отбор новых образцов с измененными признаками, не наблюдавшимися в M_2 , наследование которых будет проверяться в последующих поколениях.

В качестве мутагенных агентов использовали хорошо известные мутагены ДМС (диметилсульфат) и ЭМС (этилметансульфонат), а также новые химические соединения серии ДГ, производные диметилсульфата (ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7 и ДГ-9), синтезированные в Институте биохимической химии и нефтехимии НАН Украины и любезно предоставленные к.х.н. П.Г. Дульневым. Производные серии ДГ ранее в экспериментальном мутагенезе на культуре льна не применялись. Эффективность действия этих соединений сравнивали с исходным веществом (ДМС), послужившим основой для синтеза вышеупомянутых соединений, и таким широко известным в сельскохозяйственной практике мутагеном, как ЭМС. В ряде работ указано, что мутагенное действие ДМС и ЭМС заключается чаще всего в реакции алкилирования гуанина в положении 7-го атома азота, что приводит к ошибочному спариванию гуанина с тиминном вместо цитозина, в результате чего могут возникать мутация типа транзиции, хромосомные инверсии, разрывы хромосом (Luan et al., 2007; Rajarajan et al., 2014; Deepthi, Remesh, 2016).

Выделенные по морфологическим и физиологическим признакам мутанты анализировали в лаборатории биохимии ИМК НААН Украины по таким биохимическим показателям, как содержание масла в семенах, и их жирнокислотному составу. Масличность определяли

по массе обезжиренного остатка в аппарате Сокслета (ДСТУ 7577:2014, 2015). Жирнокислотный состав масла находили методом газожидкостной хроматографии метиловых эфиров на хроматографе HEWLETT PACRARD HP 6890 (ГОСТ 30418-96, 1998). Для этого анализа случайным образом формировали выборку из 1000 семян от 20–30 растений каждого мутантного образца.

Математическую обработку полученных данных осуществляли согласно общепринятым методикам статистической обработки экспериментального материала (Wasserman, 2005).

Результаты и обсуждение

Обработка семян льна химическими мутагенами ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7, ДГ-9, ДМС и ЭМС в концентрациях 0.5 и 0.05 % приводила в поколении M_1 к существенному изменению выживаемости растений, а также к изменению ряда морфологических характеристик – высоты растений, количества боковых побегов на главном стебле и количества коробочек на одном растении (Тигова, Сорока, 2016).

В поколении M_2 нами был получен широкий спектр мутаций, представленный 27 типами изменений, которые были разделены на пять групп:

1. Мутации с нарушением синтеза хлорофилла у всходов и взрослых растений (8 типов): *albina*, *viridis-albina*, *xantha*, *chlorina*, *viridis*, *lutescent*, *striata*, *corroded*.
2. Мутации структуры стебля, побегов и листьев (5 типов): *три семядоли*, *высокорослые растения*, *низкорослые растения*, *карлики*, *зигзагообразный стебель*.
3. Изменение окраски лепестков венчика и пыльников, формы лепестков и бутонов (6 типов): *светло-голубые лепестки*, *белые пыльники*; *голубые лепестки*, *голубые пыльники*; *измененная форма лепестков*; *светло-розовые лепестки*, *кремовые пыльники*; *белые лепестки*, *кремовые пыльники*; *нераскрывающийся венчик*.
4. Мутации окраски семян (4 типа): *желтая*, *коричневая*, *горчичная*, *пестрая*.
5. Мутации по физиологическим признакам роста и развития (4 типа): *скороспелые растения*, *позднеспелые растения*, *мутация стерильности*, *нарушение развития семян*.

Характер мутационной изменчивости в значительной степени определялся видом и концентрацией использованного мутагена, а также генотипическими особенностями сорта. Установлена повышенная индуцированная мутабельность сорта Солнечный по сравнению с сортом Айсберг. Отличия в мутабельности сортов проявлялись в различных частоте и спектре видимых мутаций (Тигова, Сорока, 2017). Кроме того, при изучении спектра мутаций на фенотипическом уровне у разных сортов обнаружен параллелизм в экспериментальной мутационной изменчивости.

В поколении M_3 на основе отобранных образцов поколения M_2 с измененными морфофизиологическими характеристиками были выделены и проанализированы мутантные линии, различающиеся между собой как по маркерным, так и по хозяйственно ценным признакам, включая количество масла в семенах и жирнокислотный состав масла.

Table 1. Oil fatty acid compositions in the M₃ generation of mutants derived from oil-bearing cultivar Iceberg treated with mutagens at the concentration 0.5%

Muta- gen	Speci- men	Marker trait of the mutant line/specimen	Oil content, %	Fatty acid percentages in seed oil					(18:2)/ (18:3)
				palmitic C 16:0	stearic C 18:0	oleic C 18:1	linoleic C 18:2	linolenic C 18:3	
–	Control (white petals, brown seeds)		47.23	6.16	3.71	19.54	19.27	51.31	0.38
DG-2	MA-1	Modified flower shape	43.37	6.18	2.36	18.60	14.71	58.16	0.25
	MA-2	Blue petals, blue anthers	45.94	5.62	4.13	18.50	13.60	58.15	0.23
	MA-3	High plants*	46.97	6.67	3.31	18.15	14.56	57.31	0.25
	MA-4	Low plants*	43.93	6.96	1.63	17.27	14.31	59.82	0.24
DG-6	MA-5	High plants*	47.09	6.18	2.39	16.36	<i>11.02</i>	63.56	0.17
DG-7	MA-6	Early maturing plants	47.75	6.40	2.64	17.74	14.96	58.28	0.26
	MA-7	Late maturing plants*	44.69	6.74	1.36	16.37	15.36	59.67	0.26
	MA-8	Low plants	45.19	<i>5.06</i>	2.89	19.47	12.44	60.13	0.21
	MA-9	High plants*	46.05	6.23	2.68	16.49	14.08	60.58	0.23
	MA-10	Blue petals, blue anthers	47.30	6.32	4.15	20.39	14.50	54.65	0.27
	MA-11	Blue petals, yellow seeds	45.95	6.68	1.63	16.26	25.75	49.68	0.52
DG-9	MA-12	Blue petals, blue anthers	46.44	5.34	3.29	18.22	17.19	55.77	0.31
	MA-13	Blue petals, yellow seeds	46.95	5.35	2.21	16.99	32.00	43.45	0.74
	MA-14	Low plants*	48.88	6.59	2.90	17.55	18.54	54.41	0.34
	MA-15	High plants*	48.37	5.96	1.93	<i>15.61</i>	14.66	61.84	0.24
EMS	MA-16	Light-blue petals	46.12	5.74	<i>1.31</i>	18.81	12.73	62.03	0.21
	MA-17	High plants*	45.97	6.23	1.97	16.25	12.14	63.52	0.19
	MA-18	Low plants	47.96	6.59	2.79	18.11	15.27	57.24	0.27
	MA-20	Dwarf	44.12	5.82	3.43	22.89	13.18	54.68	0.24
	MA-22	Blue petals, yellow seeds	45.15	6.32	3.99	18.06	29.88	<i>41.76</i>	0.72
	MA-23	Blue petals, blue anthers	<i>43.01</i>	6.97	1.46	16.56	15.20	59.82	0.25
$\bar{X}_{\text{mean}} \pm S_x$			46.06 ± 0.35	6.19 ± 0.12	2.59 ± 0.20	17.84 ± 0.36	16.48 ± 1.23	56.88 ± 1.27	
Cv			3.52 ± 0.54	8.70 ± 1.34	34.54 ± 5.33	9.37 ± 1.45	34.34 ± 5.30	10.20 ± 1.57	
LSD _{0.05}			0.97	0.19	0.09	0.56	0.55	1.78	

Note. Here and in Tables 2–4, the least values among all specimens are shown in italic and the greatest, in bold.

* Specimens chosen in M₃ Verification in M₄ is required.

Так, общая маслячность сорта Айсберг в контроле составила 47.23 %. При обработке мутагенами ДГ-7, ДГ-9 и ЭМС в концентрации 0.5 % выделены линии и образцы МА-6, МА-10, МА-14, МА-15 и МА-18, у которых маслячность была на уровне контроля или превосходила этот показатель. Маслячность указанных образцов составила 47.75, 47.30, 48.88, 48.37 и 47.96 % соответственно (табл. 1).

Помимо маслячности, изменения затрагивали и содержание различных жирных кислот. В варианте кон-

центрации 0.5 % наблюдали изменчивость по уровню пальмитиновой кислоты (С 16:0) в масле при обработке всеми изученными мутагенами. В большинстве случаев отмечалось увеличение данного показателя. Наименьшее содержание пальмитиновой кислоты было у низкорослой линии МА-8 (5.06 %), полученной при обработке мутагеном ДГ-7, а наибольшее – у линии МА-23 (6.97 %) с голубой окраской лепестков и голубыми пыльниками, полученной при обработке мутагеном ЭМС. Содержание стеариновой кислоты (С 18:0) изменялось большей

Table 2. Oil fatty acid compositions in the M₃ generation of mutants derived from oil-bearing cultivar Iceberg treated with mutagens at the concentration 0.05%

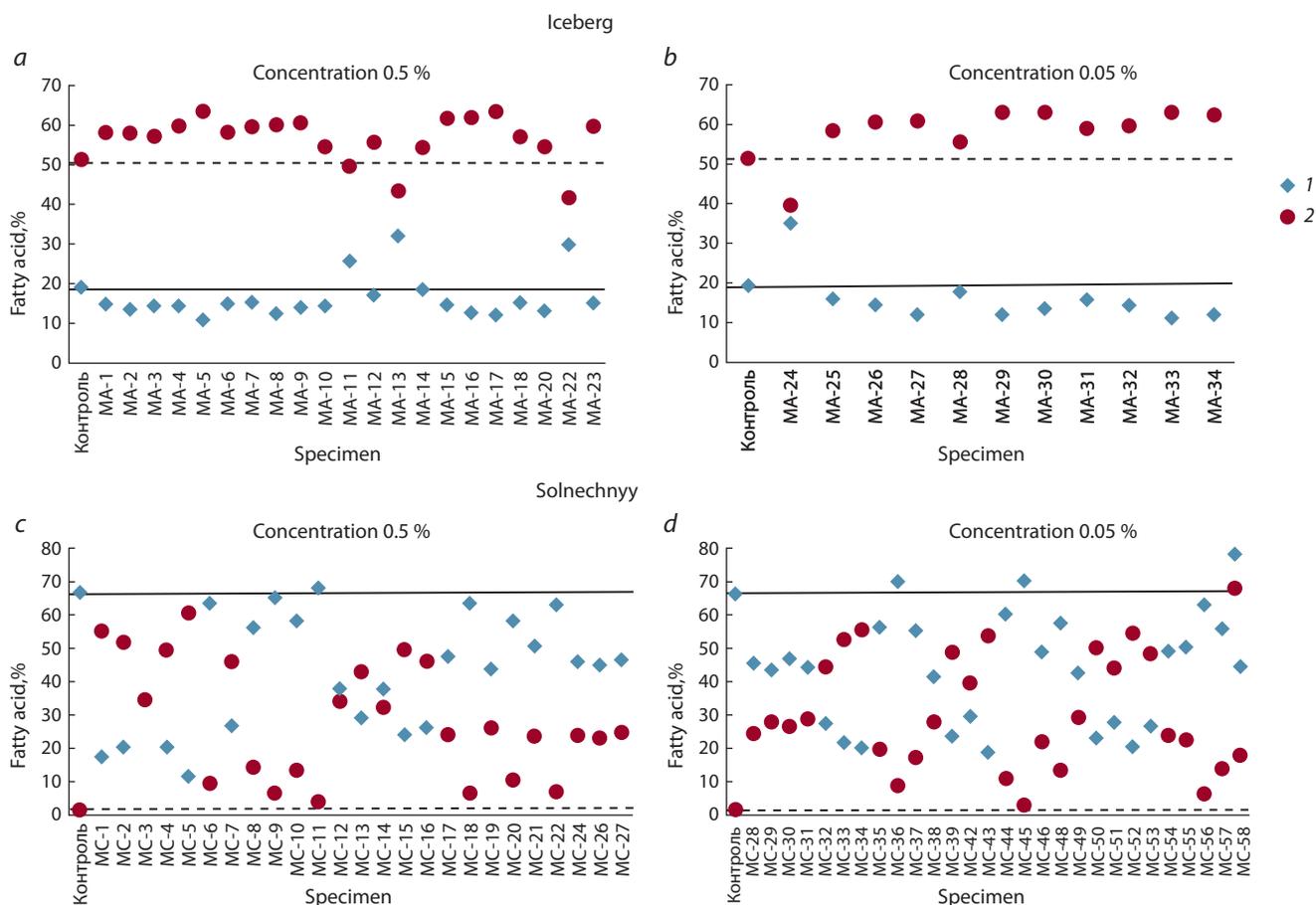
Muta- gen	Speci- men	Marker trait of the mutant line/specimen	Oil content, %	Fatty acid percentages in seed oil					(18:2)/ (18:3)
				palmitic C 16:0	stearic C 18:0	oleic C 18:1	linoleic C 18:2	linolenic C 18:3	
–	Control (white petals, brown seeds)		47.23	6.16	3.71	19.54	19.27	51.31	0.38
DG-2	MA-24	High plants*	46.00	6.40	2.16	16.67	35.15	39.63	0.89
	MA-25	Yellow seeds	42.77	6.04	2.41	17.11	16.05	58.39	0.27
	MA-26	Blue petals, blue anthers	42.12	6.54	1.63	16.82	14.48	60.53	0.24
	MA-27	Blue petals, yellow seeds	45.22	5.90	2.46	18.84	12.03	60.77	0.20
DG-6	MA-28	High plants*	45.28	6.54	2.28	17.95	17.72	55.51	0.32
DG-7	MA-29	High plants	44.90	6.81	2.21	15.94	12.05	62.99	0.19
	MA-30	Blue petals, blue anthers*	45.73	6.06	2.29	15.11	13.53	63.02	0.21
DG-9	MA-31	Blue petals, yellow seeds	44.18	6.20	2.33	16.85	15.68	58.94	0.27
	MA-32	High plants*	44.08	6.25	3.23	16.48	14.40	59.64	0.24
DMS	MA-33	High plants*	43.17	6.68	2.30	16.94	11.16	62.92	0.18
EMS	MA-34	High plants	45.58	6.19	2.01	17.42	12.02	62.36	0.19
$\bar{X}_{\text{mean}} \pm S_x$			44.46 ± 0.39	6.33 ± 0.09	2.30 ± 0.12	16.92 ± 0.29	15.84 ± 2.03	58.61 ± 2.02	
Cv			2.92 ± 0.62	4.55 ± 0.97	16.63 ± 3.55	5.77 ± 1.23	42.39 ± 9.04	11.45 ± 2.44	
LSD _{0.05}			0.76	0.20	0.08	0.55	0.55	1.87	

частью в сторону уменьшения этого показателя. Во всех вариантах обработки наблюдали снижение уровня стеариновой кислоты, кроме линий МА-2, МА-10 и МА-22 (4.13, 4.15 и 3.99 % соответственно), полученных при обработке мутагенами ДГ-2, ДГ-7 и ЭМС. Изменялось также содержание олеиновой кислоты в масле. Наибольший показатель (22.89 %) имела линия карликовых растений МА-20, полученная при обработке мутагеном ЭМС, а у образца МА-15 высокорослых растений было выявлено минимальное количество олеиновой кислоты – 15.61 % (см. табл. 1). Максимальное содержание линолевой кислоты (C 18:2) отмечено у линий МА-13 и МА-22 (32.00 и 29.88 % соответственно), а минимальное – у образца МА-5 высокорослых растений (11.02 %), имевшего также большое количество олеиновой кислоты. Более 63 % линоленовой кислоты содержится у образцов МА-5 и МА-17, выделенных при обработке мутагенами ДГ-6 и ЭМС. У этих же образцов наблюдался низкий уровень линолевой кислоты – 11.02 и 12.14 % соответственно. При обработке мутагенами в этой же концентрации 0.5 % в коллекции рассматриваемых образцов была выявлена линия МА-22 с голубой окраской лепестков и желтыми семенами с относительно низким количеством линоленовой кислоты, которое составило 41.76 % (см. табл. 1, рисунок, а).

Соотношение ω₆/ω₃ в масле в значительной степени варьировало. Минимальное значение этого признака

(0.17) имел образец МА-5 высокорослых растений, а максимальное (0.74) – линия МА-13 с голубой окраской лепестков и желтыми семенами. Коэффициент вариации для показателей масличности, уровня пальмитиновой и олеиновой кислот составил менее 10 % (см. табл. 1), что свидетельствует о слабой вариабельности данных признаков. В то же время для стеариновой и линолевой кислот коэффициент вариации превышал 10 %, что демонстрирует значительную изменчивость уровня данных кислот у мутантных линий, полученных при обработке химическими мутагенами в концентрации 0.5 %, и говорит о высоком потенциале для отбора по этим признакам.

При более низкой концентрации обработки (0.05 %) высокомасличных линий, превосходящих контроль по общему выходу масла, выявлено не было (табл. 2). У большинства мутантных линий содержание пальмитиновой кислоты (C 16:0) в масле превышало контроль. Максимальный уровень пальмитиновой кислоты зафиксирован у образца МА-33 (6.68 %), полученного при обработке мутагеном ДМС. Существенное уменьшение уровня этой кислоты по сравнению с контролем (6.16 %) выявлено только у одной линии – МА-27 (5.90 %). Кроме того, во всех вариантах обработки наблюдали уменьшение уровня стеариновой кислоты (C 18:0). Линий с повышенным содержанием стеариновой кислоты выделено не было. Минимальный уровень стеариновой кислоты (1.63 %) установлен при обработке мутагеном ДГ-2 у линии МА-26



Contents of (1) linoleic and (2) linolenic acids in seed oil from M3 plants derived from oil flax cultivars Iceberg and Solnechnyy by treatment with mutagens at the concentrations 0.5 and 0.05%.

с голубой окраской лепестков и голубыми пыльниками (см. табл. 2). Уровень олеиновой кислоты у описанных мутантных линий был ниже контроля. Наименьшее ее содержание наблюдали у образца МА-30 (15.11 %), полученного при обработке мутагеном ДГ-7.

Изменчивость по содержанию линолевой кислоты (C 18:2) варьировала в сторону уменьшения данного показателя (см. рисунок, б). Однако при обработке мутагеном ДГ-2 выделен образец МА-24 высокорослых растений с максимальным содержанием линолевой кислоты – 35.15 %, одновременно этот образец является относительно низколиноленовым (39.63 %). У большинства же отобранных линий уровень линолевой кислоты был ниже контроля. При обработке мутагеном ДМС получен образец МА-33 высокорослых растений с минимальным уровнем линолевой кислоты (11.16 %) и максимальным – пальмитиновой кислоты (6.68 %). У образца МА-30, выделенного после обработки мутагеном ДГ-7 и имевшего минимальный уровень олеиновой кислоты, было более 63 % линоленовой кислоты. Соотношение триглицеридов ω6/ω3 различалось между проанализированными линиями и образцами в значительной степени. Минимальное значение этого показателя (0.18) имел образец МА-33 высокорослых растений, полученный при обработке мутагеном ДМС, а максимальное (0.89) – образец МА-24 высокорослых растений, полученный при обработке

мутагеном ДГ-2. В варианте обработки семян мутагеном в концентрации 0.05 % коэффициент вариации для описанных мутантных линий и образцов по стеариновой, линолевой и линоленовой кислотам составил более 10 % (см. табл. 2), что свидетельствует о существенной изменчивости данных биохимических параметров масла семян льна.

У сорта Солнечный общая масличность контроля находилась на уровне 40.69 %. Обработка мутагенами в более высокой концентрации 0.5 % практически во всех вариантах приводила к получению линий и образцов, превосходивших контроль по данному показателю (табл. 3). Максимальную масличность (45.18 %) наблюдали у линии МС-27 с коричневой окраской семян, а минимальную (37.89 %) – у линии МС-24 со светло-розовой окраской лепестков и кремовыми пыльниками. Из литературных данных известно, что накопление запасных липидов в семенах регулируется большим количеством гормональных и метаболических сигнальных систем, входящих в ряд генетических программ (Baud, Lepiniec, 2010). Среди описанных факторов значительная роль уделяется транскрипционным детерминантам, многие из которых являются так называемыми главными регуляторами, поскольку способны влиять на активность генов, регулирующих синтез и накопление запасных веществ. Так, высокий уровень экспрессии гена *LEC1* у

Table 3. Oil fatty acid compositions in M₃ mutants derived from oil-bearing cultivar Solnechnyy treated with mutagens at the concentration 0.5%

Muta- gen	Speci- men	Marker trait of the mutant line/specimen	Oil content, %	Fatty acid percentages in seed oil					(18:2)/ (18:3)
				palmitic C 16:0	stearic C 18:0	oleic C 18:1	linoleic C 18:2	linolenic C 18:3	
–	Control (blue petals, yellow seeds)		40.69	6.05	5.81	20.03	66.53	1.59	41.84
DG-2	MS-1	White petals, brown seeds	44.37	6.65	2.62	17.87	17.52	55.34	0.32
	MS-2	White petals, variegated seeds	44.16	6.62	2.92	17.87	20.62	51.98	0.40
	MS-3	White petals, creamy anthers	39.72	6.56	3.27	20.82	34.69	34.67	1.00
	MS-4	Brown seeds	39.66	6.88	2.71	20.27	20.56	49.59	0.41
	MS-5	Light-pink petals, mustard-colored seeds	42.96	6.13	2.76	18.64	11.72	60.74	0.19
	MS-6	Light-pink petals, creamy anthers	42.31	6.92	2.57	17.40	63.63	9.47	6.72
	MS-7	Light-pink petals, variegated seeds*	44.76	5.98	2.81	18.19	26.99	46.04	0.59
	MS-8	High plants*	41.68	6.16	2.79	20.29	56.28	14.48	3.89
	MS-9	Low plants*	43.68	6.43	3.93	17.69	65.25	6.71	9.72
DG-7	MS-10	High plants*	42.97	6.38	2.44	19.23	58.22	13.73	4.24
	MS-11	Low plants*	44.63	6.63	4.10	16.72	68.32	4.24	16.11
	MS-12	White petals, variegated seeds*	44.61	6.86	3.11	17.90	38.01	34.13	1.11
	MS-13	White petals, creamy anthers	43.44	6.35	2.87	18.50	29.24	43.05	0.68
	MS-14	White petals, ariegated seeds	42.56	6.48	3.64	19.49	37.87	32.51	1.16
	MS-15	Light-pink petals, creamy anthers	44.28	6.32	3.17	16.67	24.12	49.72	0.49
	MS-16	Mustard-colored seeds	44.21	6.55	3.43	17.45	26.35	46.22	0.57
DG-9	MS-17	High plants*	39.46	6.04	3.80	18.31	47.51	24.34	1.95
	MS-18	Low plants*	43.83	6.16	4.41	19.02	63.75	6.66	9.57
	MS-19	Light-pink petals, creamy anthers	43.45	6.29	3.01	20.33	44.12	26.25	1.68
	MS-20	White petals, creamy anthers	43.02	6.17	4.92	20.16	58.18	10.58	5.50
	MS-21	White petals, mustard-colored seeds	43.23	6.04	3.40	15.87	50.99	23.70	2.15
EMS	MS-22	Zigzag stem	43.36	6.17	4.27	19.07	63.23	7.26	8.71
	MS-24	Light-pink petals, creamy anthers	37.89	6.17	3.47	20.22	46.11	24.03	1.92
	MC-26	White petals, creamy anthers	44.62	6.65	3.85	21.15	44.87	23.42	1.92
	MC-27	Brown seeds	45.18	6.36	3.00	19.03	46.68	24.93	1.87
	$X_{\text{mean}} \pm S_x$		42.96 ± 0.38	6.40 ± 0.05	3.33 ± 0.13	18.73 ± 0.28	42.59 ± 3.41	28.95 ± 3.49	
	Cv		4.42 ± 0.63	4.28 ± 0.61	19.35 ± 2.74	7.44 ± 1.05	40.04 ± 5.66	60.30 ± 8.53	
	LSD _{0.05}		0.70	0.20	0.11	0.59	1.45	1.03	

арабидопсиса, генов *GmDof4* и *GmDof11* у сои вызывал повышенную экспрессию генов из семейств, участвующих в биосинтезе жирных кислот, что приводило к существенному увеличению содержания масла в семенах (Сидоров, Цыдендамбаев, 2014). Поскольку биосинтез триацилглицеридов у высших растений характеризуется общими метаболическими путями, можно предположить, что большое количество мутантов сорта Солнечный с повышенной масличностью связано с мутацией одного из главных регуляторов факторов транскрипции, приведшей к сверхэкспрессии вышеупомянутых генов или их аналогов.

Что касается жирнокислотного состава масла у мутантов сорта Солнечный, полученных в вариантах с концентрацией 0.5 %, то, в частности, содержание пальмитиновой кислоты составляло от 5.98 до 6.92 %. Из табл. 3 видно, что обработка химическими мутагенами вызывала повышение уровня пальмитиновой кислоты практически у всех мутантов. Максимальное содержание этой кислоты наблюдалось у линии МС-6 со светло-розовой окраской лепестков и кремовыми пыльниками – 6.92 %. Уровень стеариновой кислоты (С 18:0) уменьшился по сравнению с контролем во всех вариантах обработки. Минимальное ее значение (2.44 %) было у образца МС-10 высокорослых растений, полученного при обработке мутагеном ДГ-7. Содержание олеиновой кислоты (С 18:1) в масле варьировало от 15.87 до 21.15 %. При этом минимальный уровень наблюдали у линии МС-21 с белой окраской лепестков и горчичными семенами, полученной при обработке мутагеном ДГ-9, а максимальный – у линии МС-26 с белой окраской лепестков и кремовыми пыльниками, полученной под действием мутагена ЭМС. Содержание линолевой кислоты менялось от 11.72 до 68.32 %. Максимальный уровень (68.32 %) выявлен у образца МС-11 низкорослых растений, полученного при обработке мутагеном ДГ-7 (см. табл. 3, рисунок, е). Кроме того, образец МС-11 характеризуется достаточно низким уровнем линоленовой кислоты (4.24 %), высокой масличностью (44.63 %) и относительно высоким содержанием пальмитиновой кислоты (6.63 %) (см. табл. 3). Минимальный уровень линолевой кислоты (11.72 %) выявлен у линии МС-5 со светло-розовой окраской лепестков и горчичной окраской семян. Содержание линоленовой кислоты в масле менялось от 4.24 (образец МС-11) до 60.74 % (линия МС-5) (см. табл. 3, рисунок, е). Соотношение триглицеридов $\omega 6/\omega 3$ значительно варьировало: от 0.19 (линия МС-5) до 16.11 (образец МС-11).

Коэффициент вариации таких признаков, как масличность, содержание пальмитиновой и олеиновой кислот у мутантов сорта Солнечный, полученных при обработке мутагенами 0.5 % концентрации, не превышал 10 %, что свидетельствует о достаточно высокой стабильности данных биохимических показателей. Однако для стеариновой, линолевой и линоленовой кислот коэффициент вариации составлял 20 % и более (см. табл. 3), что демонстрирует значительные возможности отбора по созданию новых селекционных линий с измененным уровнем данных кислот.

При обработке химическими мутагенами в более низкой концентрации (0.05 %) практически во всех вариантах

воздействия уровень масличности у отобранных мутантов повысился и колебался в пределах от 39.58 до 46.69 % (табл. 4). По нашим данным, содержание пальмитиновой кислоты в масле изменялось в диапазоне от 5.94 (МС-32) до 6.88 % (МС-52). Следует также отметить, что в большинстве случаев содержание пальмитиновой кислоты превышало или находилось на уровне контроля. Количество стеариновой кислоты в масле мутантов уменьшилось по сравнению с контролем. Под действием всех изученных мутагенов отмечалось снижение уровня стеариновой кислоты. Содержание олеиновой кислоты в масле также варьировало: минимальный уровень (15.29 %) наблюдали у линии МС-35 высокорослых растений, полученной при обработке мутагеном ДГ-6, а максимальный уровень (22.34 %) – у линии МС-42 с белой окраской лепестков и кремовыми пыльниками, полученной при обработке мутагеном ДГ-7 (см. табл. 4). Содержание линолевой кислоты у мутантных образцов изменялось в пределах от 18.77 до 70.09 %. Наименьший показатель имела линия МС-43 с белой окраской лепестков и пестрыми семенами, полученная при обработке мутагеном ДГ-7. Тем не менее встречались мутанты, у которых содержание линолевой кислоты превышало контрольные значения – МС-36 (69.95 %) и МС-45 (70.09 %), а уровень линоленовой кислоты был относительно низким (8.83 и 3.06 % соответственно), что делает их ценным исходным материалом для селекции сортов пищевого направления (см. табл. 4, рисунок, з).

Что касается соотношения $\omega 6/\omega 3$ жирных кислот, то при обработке мутагенами данной концентрации (0.05 %) оно в значительной степени варьировало. Минимальное значение этого показателя (0.35) было у линии МС-43 с белой окраской лепестков и пестрыми семенами, а максимальное (22.91) – у образца МС-45 низкорослых растений. Коэффициент вариации для признаков масличности, содержания пальмитиновой и олеиновой кислот был относительно низким, что говорит о незначительной изменчивости данных биохимических показателей. Однако для остальных жирных кислот – стеариновой, линолевой и линоленовой – коэффициент вариации превышал 30 % (см. табл. 4), что свидетельствует о значительной потенциальной вариабельности их содержания.

Изменчивость уровня линолевой и линоленовой кислот в результате воздействия химическими мутагенами в концентрациях 0.5 и 0.05 % у сорта Айсберг была незначительной, однако у сорта Солнечный уровень этих кислот сильно варьировал, что объясняется генотипическими особенностями сорта (см. рисунок). Полученные результаты позволяют отбирать образцы с разным жирнокислотным составом масла и вести селекцию в любом направлении.

Как следует из полученных нами данных, содержание изученных жирных кислот взаимосвязано (табл. 5). Так, у сорта Айсберг содержание олеиновой кислоты отрицательно коррелировало с пальмитиновой и положительно – со стеариновой кислотой. Кроме того, наблюдалась сильная отрицательная корреляция доли линолевой и линоленовой кислот в масле, что привело к появлению в популяции мутантов большого количества образцов с уменьшенным уровнем линолевой кислоты в пользу линоленовой (см. рисунок, а, б).

Table 4. Oil fatty acid compositions in the M₃ generation of mutants derived from oil-bearing cultivar Solnechnyy treated with mutagens at the concentration 0.05%

Muta- gen	Speci- men	Marker trait of the mutant line/ specimen	Oil content, %	Fatty acid percentages in seed oil					(18:2)/ (18:3)
				palmitic C 16:0	stearic C 18:0	oleic C 18:1	linoleic C 18:2	linolenic C 18:3	
–	Control (blue petals, yellow seeds)		40.69	6.05	5.81	20.03	66.53	1.59	41.84
DG-2	MS-28	High plants*	45.33	6.68	3.24	20.17	45.47	24.44	1.86
	MS-29	White petals, creamy anthers	44.43	6.10	3.43	19.10	43.58	27.80	1.57
	MS-30	Light-pink petals, variegated seeds	45.43	6.21	2.26	18.08	46.92	26.54	1.77
	MS-31	Light-pink petals, creamy anthers	43.61	6.43	2.64	17.73	44.34	28.86	1.54
	MS-32	Brown seeds	44.77	5.94	2.21	20.13	27.44	44.29	0.62
	MS-33	Variegated seeds	44.67	6.68	1.77	17.07	21.82	52.66	0.41
	MS-34	White petals, variegated seeds*	45.65	6.86	1.19	16.20	20.20	55.55	0.36
DG-6	MS-35	High plants	46.47	6.14	2.50	15.29	56.39	19.68	2.87
	MS-36	Light-pink petals, mustard-colored seeds	46.63	6.29	3.26	17.67	69.95	8.83	7.92
	MS-37	Light-pink petals, creamy anthers	45.89	6.73	3.27	17.49	55.26	17.25	3.20
	MS-38	Light-green plant	43.71	6.52	3.90	20.23	41.61	27.73	1.50
	MS-39	Light-green plant, brown seeds	46.05	6.03	2.99	18.55	23.66	48.78	0.49
DG-7	MS-42	White petals, creamy anthers	42.73	6.24	2.09	22.34	29.65	39.68	0.75
	MS-43	White petals, variegated seeds	41.18	6.64	1.95	18.86	18.77	53.78	0.35
DG-9	MS-44	High plants*	42.40	6.76	3.86	18.15	60.29	10.95	5.51
	MS-45	Low plants*	39.58	6.02	2.47	18.37	70.09	3.06	22.91
	MS-46	Brown seeds	40.34	6.62	4.48	18.02	48.80	22.08	2.21
	MS-48	Light-pink petals, creamy anthers	44.51	6.51	2.57	20.18	57.41	13.33	4.31
DMS	MS-49	White petals, late maturing plants*	43.91	6.82	2.52	18.84	42.62	29.19	1.46
	MS-50	White petals, variegated seeds*	45.10	6.87	2.31	17.64	23.06	50.14	0.46
	MS-51	Light-pink petals, creamy anthers	44.38	6.52	1.98	19.68	27.83	43.99	0.63
	MS-52	White petals, creamy anthers*	46.69	6.88	1.71	16.17	20.68	54.57	0.38
	MS-53	Light-pink petals, variegated seeds*	44.31	6.44	2.23	16.04	26.80	48.50	0.55
EMS	MS-54	High plants	44.83	6.33	3.22	17.55	49.09	23.81	2.06
	MS-55	Low plants*	43.65	6.00	3.70	17.41	50.41	22.48	2.24
	MS-56	White petals*	43.58	6.23	3.51	20.82	63.03	6.42	9.82
	MS-57	Light-green plant	43.78	6.82	4.31	21.12	55.86	13.90	4.02
	MS-58	Light-green plant, brown seeds	43.22	6.77	4.01	21.81	44.52	17.88	2.49
$X_{\text{mean}} \pm S_x$			44.17 ± 0.33	6.47 ± 0.06	2.84 ± 0.16	18.60 ± 0.34	42.34 ± 2.99	291.86 ± 3.08	
Cv			3.98 ± 0.53	4.69 ± 0.63	30.05 ± 4.02	9.58 ± 1.28	37.32 ± 4.99	54.63 ± 7.30	
LSD _{0.05}			0.72	0.20	0.10	0.58	1.43	1.03	

Table 5. Pearson's correlations between fatty acid contents in seed oil from mutants and cvs. Iceberg and Solnechnyy treated with mutagens at the concentrations 0.5 and 0.05%

Fatty acid	Palmitic C 16:0	Stearic C 18:0	Oleic C 18:1	Linoleic C 18:2	Linolenic C 18:3	Palmitic C 16:0	Stearic C 18:0	Oleic C 18:1	Linoleic C 18:2	Linolenic C 18:3
	Iceberg					Solnechnyy				
Palmitic C 16:0		-0.32	-0.36	-0.03	0.08		-0.21	-0.06	-0.22	0.21
Stearic C 18:0	-0.32		0.56	0.06	-0.31	-0.21		0.28	0.57	-0.62
Oleic C 18:1	-0.36	0.56		-0.10	-0.20	-0.06	0.28		0.10	-0.22
Linoleic C 18:2	-0.03	0.06	-0.10		-0.95	-0.22	0.57	0.10		-0.99
Linolenic C 18:3	0.08	-0.31	-0.20	-0.95		0.21	-0.62	-0.22	-0.99	
SD	0.46	0.78	1.54	5.87	6.08	0.29	0.87	1.59	16.42	16.98
Number of mutants	33					54				

Note. Boldface indicates significant correlation coefficients at $p = 0.05\%$: $r > 0.35$ for cv. Iceberg and $r > 0.27$ for Solnechnyy.

У сорта Солнечный положительную корреляцию наблюдали между уровнем стеариновой и олеиновой, а также стеариновой и линолевой кислот. Отрицательная корреляция была между уровнем линоленовой и стеариновой кислот, и в то же время – линоленовой и линолевой кислот. Увеличение уровня линоленовой кислоты, по сравнению с контролем, во всех вариантах обработки привело к уменьшению уровня линолевой кислоты (см. рисунок, ϵ , ζ), поскольку синтез этих жирных кислот взаимосвязан.

Следует отметить, что у сортов Айсберг и Солнечный спектры мутаций по содержанию линолевой и линоленовой кислот существенно различались. Подавляющее большинство мутантов сорта Солнечный имело повышенное, по сравнению с контролем, содержание линоленовой кислоты. Мутанты сорта Айсберг по содержанию линоленовой кислоты отличались от контрольного сорта в значительно меньшей степени (коэффициент вариации 10.20–11.45 %). Кроме того, были выделены мутанты как с повышенным, так и с пониженным уровнем данной кислоты.

Результаты изучения мутантов обоих сортов говорят об отсутствии мутаций в генах *FAB1*, *SAD1* и *SAD2*, так как доля пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот в масле сильно не изменилась. Мутации в генах *FAD2* тоже, скорее всего, отсутствуют, поскольку суммы линолевой и линоленовой кислот тоже сильно не варьируют. Таким образом, выявляемые мутации затронули, видимо, гены *FAD3*. У мутантов сорта Айсберг МА-11, МА-13, МА-22 и МА-24 наблюдается повышение концентрации линолевой кислоты и снижение содержания линоленовой. Вероятно, часть растений (а в M_3 может наблюдаться расщепление по мутантным признакам) были низколиноленовыми, а часть – высоколиноленовыми, и были смешаны в процессе отбора материала для анализа. То есть в этих семьях могут быть мутанты генов *FAD3*.

Сорт Солнечный, судя по составу его масла, несет мутацию в одном из генов *FAD3*. В данном случае мутации тоже не затронули гены *FAB1*, *SAD1* и *SAD2*, а также *FAD2*. Однако практически у всех полученных мутантов, скорее всего, произошли обратные мутации в генах *FAD3*, что снизило концентрацию линолевой кислоты и повысило – линоленовой. Различия в уровне восстановления синтеза линоленовой кислоты, очевидно, также связаны с неоднородностью материала исследованных образцов семян.

Таким образом, в настоящей работе показана эффективность использования новых химических мутагенов, производных диметилсульфата, для получения широкого спектра мутантных линий и образцов льна по жирнокислотному составу масла семян. Увеличение генетического разнообразия по данным признакам позволяет вести селекционную работу по созданию сортов льна любого направления использования льняного масла в зависимости от поставленных целей.

Заключение

Показано, что обработка новыми (ДГ-2, ДГ-6, ДГ-7 и ДГ-9) и классическими (ДМС, ЭМС) химическими мутагенами привела к получению мутантных линий и образцов с разным уровнем масличности и жирнокислотным составом масла семян. Перспективные мутантные линии отобраны для дальнейшей селекционной работы.

Выделены линии и образцы с максимальным и минимальным уровнями линолевой и линоленовой кислот у сорта Айсберг (МА-5, МА-13, МА-24, МА-30) и у сорта Солнечный (МС-5, МС-11, МС-34, МС-43, МС-45).

Доказана эффективность использования новых химических мутагенов для создания ценных в практическом применении линий льна масличного с маркерными признаками.

Установлено, что обе использованные концентрации мутагенов (0.5 и 0.05 %) эффективны для получения

образцов с разным уровнем масличности и жирнокислотного состава масла. Тем не менее у сорта Айсберг более высокая концентрация вызвала больший размах изменчивости по сравнению с сортом Солнечный, что свидетельствует о специфической реакции генотипа на концентрацию мутагена.

Продемонстрирована сильная отрицательная корреляционная взаимосвязь между содержанием линолевой и линоленовой кислот, а также положительная зависимость средней силы между содержанием стеариновой и олеиновой кислот у обоих изученных сортов.

Acknowledgments

DG mutagens were a generous gift of Cand. Sci. (Chem.) P.G. Dul'nev, Institute of Bioorganic Chemistry and Oil Chemistry, National Academy of Sciences, Ukraine. The authors are grateful to reviewers of the Vavilov Journal of Genetics and Breeding for valuable remarks.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Бражников В., Бражникова О., Прахова Т., Прахов В. Результаты селекции и жирнокислотный состав масла льна масличного. Междунар. с.-х. журн. 2015;6:23-27. [Brazhnikov V., Brazhnikova O., Prakhova T., Prakhov V. Results of selection and fatty acid composition of oil in oil flax. *Mezhdunarodnyy Selskokhozyaistvennyy Zhurnal* = International Agricultural Journal. 2015;6:23-27. (in Russian)]

ГОСТ 30418-96. Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава. Госстандарт Украины. Киев, 1998. [GOST 30418-96. Vegetable Oils. Method for Determination of Fatty Acid Composition. National Standard of Ukraine. Kiev, 1998. (in Russian)]

ДСТУ 7577:2014 Насіння олійне. Визначання вмісту олії методом екстракції в апараті Сокслета. К., 2015. [DSTU 7577: 2014 Oil Seeds. Determination of Oil Content by Extraction Method in a Soxhlet Apparatus. Kiev, 2015 (in Ukrainian)]

Лях В.А., Полякова И.А., Сорока А.И. Индуцированный мутагенез масличных культур. Запорожье: Запорож. нац. ун-т, 2009. [Lyakh V.A., Polyakova I.A., Soroka A.I. Induced Mutagenesis of Oilseeds. Zaporizhzhia: Zaporizhzhia National Univ., 2009. (in Russian)]

Низова Г.К., Брач Н.Б. Изучение генетической коллекции льна на качество масла. Аграр. Россия. 2010;1:32-35. [Nizova G.K., Brach N.B. Study of the genetic collection of flax for the quality of oil. *Agrarnaya Rossiya* = Agrarian Russia. 2010;1:32-35. (in Russian)]

Пелипенко Т.В., Голушанян А.П., Калиенко Е.А., Мирзоян А.А. Состав и свойство льняного масла как ингредиента косметических средств. Науч. журн. КубГАУ. 2014;103(09):1-11. [Pelipenko T.V., Gyulushanyan A.P., Kalienko E.A., Mirzoyan A.A. Composition and property of flaxseed oil as an ingredient of cosmetics. *Nauchnyy Zhurnal KubGAU* = Scientific Journal of KubSAU. 2014; 103(09):1-11. (in Russian)]

Пороховинова Е.А., Шеленга Т.В., Косых Л.А., Санин А.А., Казарина А.В., Кутузова С.Н., Павлов А.В., Брач Н.Б. Биохимическое разнообразие льна по жирнокислотному составу семян в генетической коллекции ВИР и влияние условий среды на его проявление. Экол. генетика. 2016;14(1):13-26. DOI 10.17816/ecogen14113-26. [Porokhovinova E.A., Shelenga T.V., Kosykh L.A., Sanin A.A., Kazarina A.V., Kutuzova S.N., Pavlov A.V., Brach N.B. Biochemical diversity of fatty acid composition in flax accessions from the VIR genetic collection and effect of environ-

ment on its development. *Ekologicheskaya Genetika* = Ecological Genetics. 2016;14(1):13-26. DOI 10.17816/ecogen14113-26. (in Russian)]

Сидоров Р.А., Цыдендамбаев В.Д. Биосинтез жирных масел у высших растений. Физиология растений. 2014;61(1):3-22. [Sidorov R.A., Tsyendambaev V.D. Biosynthesis of fat oils in higher plants. *Fiziologiya Rasteniy* = Plant Physiology. 2014;61(1):3-22. (in Russian)]

Тигова А.В., Сорока А.И. Влияние новых химических мутагенов на растения *Linum humile* Mill. в поколении M₁. Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2016;1:15-22. [Tigova A.V., Soroka A.I. Influence of new chemical mutagens on plants of *Linum humile* Mill. in M₁ generation. *Vestnik Zaporozhskogo Natsionalnogo Universiteta*. *Biologicheskije Nauki* = Bulletin of Zaporizhzhia National University. *Biol. Sci.* 2016;1: 15-22. (in Russian)]

Тигова А.В., Сорока А.И. Частота и спектр мутаций у растений льна (*Linum humile* Mill.) под действием новых производных диметилсульфата. Физиология растений и генетика. 2017;49(6): 521-532. [Tigova A.V., Soroka A.I. Frequency and range of mutations in flax (*Linum humile* Mill.) under the action of new dimethyl sulfate derivatives. *Fiziologiya Rasteniy i Genetika* = Plant Physiology and Genetics. 2017;49(6):521-532. (in Russian)]

Феськова Е.В., Леонтьев В.Н., Титок В.В. Семена льна масличного сорта Солнечный – источник биологически активных веществ. Химия, технология органических веществ и биотехнология. 2009;7:201-203. [Fes'kova E.V., Leont'ev V.N., Titko V.V. Seeds of oil flax of Solnechny variety as a source of biologically active substances. *Khimiya, Tekhnologiya Organicheskikh Veshchestv i Biotekhnologiya* = Chemistry, Technology of Organic Substances, and Biotechnology. 2009;7:201-203. (in Russian)]

Banik M., Duguid S., Cloutier S. Transcript profiling and gene characterization of three fatty acid desaturase genes in high, moderate, and low linolenic acid genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.) and their role in linolenic acid accumulation. *Genome*. 2011;54(6):471-483. DOI 10.1139/g11-013.

Baud S., Lepiniec L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Prog. Lipid Res.* 2010;49:235-249. DOI 10.1016/j.plipres.2010.01.001.

Brutch N.B., Kutuzova S.N. *Linum usitatissimum* as a useful plant for people. *Melhoramento*. 1999;36:176-182.

Deepthi T., Remesh K.N. Impact of EMS induction on morphological, anatomical and physiological traits of Bhindi *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. *Int. J. Recent Res. Life Sci. (IJRRLS)*. 2016;3(2): 4-11.

Dribnenki J.C.P., Green A.G., Atlin G.N. Linola™ 989 low linolenic acid flax. *Can. J. Plant Sci.* 1996;76(2):329-331. DOI 10.4141/cjps96-057.

Fofana B., Cloutier S., Duguid S., Ching J., Rampitsch C. Gene expression of stearoyl-ACP desaturase and Δ12 fatty acid desaturase 2 is modulated during seed development of flax (*Linum usitatissimum*). *Lipids*. 2006;41(7):705-712. DOI 10.1007/s11745-006-5021-x.

Green A.G. Genetic control of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in flax (*L. usitatissimum*) seed oil. *Theor. Appl. Genet.* 1986;72(5): 654-661.

Green A.G., Marshall D.R. Isolation of induced mutants of linseed (*Linum usitatissimum* L.) having reduced linolenic acid content. *Euphytic*. 1984;33:321-328.

Khadake P., Ranjekar K., Harsulkar A.M. Cloning of a novel omega-6 desaturase from flax (*Linum usitatissimum* L.) and its functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biotechnol.* 2009;42(2): 168-174. DOI 10.1007/s12033-009-9150-3.

Krasowska A., Dziakowicz D., Polinceusz A., Plonka A., Lukasiewicz M. Cloning of flax oleic fatty acid desaturase and its expression in yeast. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2007;84(9):809-816. DOI 10.1007/s11746-007-1106-9.

Luan Y.S., Zhang J., Gao X.R., An L.J. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (Ems), *in vitro* screening for salt tolerance and

- plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2007;88(1):77-81. DOI 10.1007/s11240-006-9183-2.
- Nichternein K., Marquard R., Friedt W. Breeding for modified fatty acid composition by induced mutations in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Breed.* 1988;101(3):190-199. DOI 10.1111/j.1439-0523.1988.tb00287.x.
- Prasad K. Oxidative stress as a mechanism of diabetes in diabetic BB prone rats: Effect of secoisolariciresinol diglucoside (SDG). *Mol. Cell. Biochem.* 2000;209:89-96.
- Prasad K. Secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed delays the development of type 2 diabetes in Zucker rat. *J. Lab. Clin. Med.* 2001;138:32-39.
- Rajarajan D., Saraswathi R., Sassikumar D., Ganesh S. Fixation of lethal dose and effect of Ethyl Methane Sulphonate induced mutagenesis in Rice Adt (R) 47. *Life Sciences Leaflets.* 2014;57:65-72.
- Rodriguez-Leyva D., Bassett C., McCullough R., Pierce G.N. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Can. J. Cardiol.* 2010;26(9):489-496. DOI 10.1016/S0828-282X(10)70455-4.
- Spence J.D., Thornton T., Muir A.D., Westcott N.D. The effect of flax seed cultivars with differing content of α -linolenic acid and lignans on responses to mental stress. *J. Am. Coll. Nutr.* 2003;22:494-501.
- Thambugala D., Duguid S., Loewen E., Rowland G., Booker H., You F.M., Cloutier S. Genetic variation of six desaturase genes in flax and their impact on fatty acid composition. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(10):2627-2641. DOI 10.1007/s00122-013-2161-2.
- Vrinten P., Hu Z., Munchinsky M.-A., Rowland G., Qiu X. Two *FAD3* desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. *Plant Physiol.* 2005;139(1):79-87. DOI 10.1104/pp.105.064451.
- Wasserman L. *All of Statistics: A Concise Course in Statistical Inference.* Springer, 2005.

ORCID ID

A.I. Soroka orcid.org/0000-0003-0083-0525

Allelic and epigenetic DNA variation in relation to F₁ heterosis manifestation in F₁ hybrids of *Capsicum annuum* L.

M.N. Shapturenko¹✉, S.V. Vakula¹, L.A. Tarutina¹, T.V. Nikitinskaya¹, T.V. Pechkovskaya¹, L.A. Mishin², L.V. Khotyleva¹

¹ Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

² Institute of Vegetable Growing, Samokhvalovichy, Minsk region, Belarus

Managing F₁ heterosis is one of the major objectives in hybrid crop breeding programs. The classical theory considers the heterozygosity in F₁ hybrids to be the main factor contributing to heterosis and therefore presumes a linear relationship between the value of genetic polymorphisms in parental lines and the heterotic response of their F₁ offspring. Therefore, the genetic diversity information is viewed as a tool for selection of promising cross-combinations, but results published by different researchers are inconsistent. In this work, we studied the contributions of structural and nonstructural DNA polymorphisms to F₁ heterosis manifestation. We used SSR and methyl-sensitive AFLP (MSAP with *HpaII* and *MspI* isozymers) protocols for obtaining specific patterns for heterotic and nonheterotic F₁ hybrids of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) from a Belarusian breeding program. We found out that a certain portion of heterosis for yield-related traits might be explained by the polymorphism revealed by SSR analysis. According to our data, the total number of polymorphic SSR loci and the ratio of polymorphic and nonpolymorphic loci demonstrate a significant predictive value and can serve as additional prognostic criteria for the selection of promising cross-combinations. From the MSAP assay, we found a relationship between heterosis and the numbers of methylated and nonmethylated DNA loci for yield traits. Our results indicate that cross-hybridization may favor epiallelic modifications in F₁ hybrids, presumably responsible for heterosis. Thus, epigenetic DNA variation may explain the absence of a linear relationship between the level of structural DNA divergence and F₁ heterosis, as well as the manifestation of heterosis in crosses of related (genetically similar) accessions.

Key words: *Capsicum annuum* L.; heterosis; F₁ performance; SSR allelic variation; DNA methylation.

Аллельная и эпигенетическая вариация ДНК в связи с проявлением гетерозиса в F₁ *Capsicum annuum* L.

М.Н. Шаптуренко¹✉, С.В. Вакула¹, Л.А. Тарутина¹, Т.В. Никитинская¹, Т.В. Печковская¹, Л.А. Мишин², Л.В. Хотылева¹

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

² Институт овощеводства, Самохваловичи, Минская область, Беларусь

Одна из основных задач селекции – получение гибридов с выраженным эффектом гетерозиса. При этом информация о генетическом разнообразии селекционного материала рассматривается как инструмент отбора перспективных комбинаций скрещивания, так как, согласно классической теории, гетерозиготность является основным фактором, обуславливающим превосходство гибридов F₁ над родителями. В связи с этим предполагается наличие прямой зависимости между уровнем генетического полиморфизма исходных родительских форм и гетерозисом в поколении F₁ их гибридов. Опубликованные к настоящему времени данные, направленные на поиск критериев прогнозирования гетерозиса у растений, показали разноречивые результаты. В нашем исследовании мы изучили вклад структурного и неструктурного ДНК-полиморфизма в реализацию гетерозиса F₁ у перца сладкого. Были использованы SSR- и метилчувствительный AFLP-протокол (MSAP с использованием изоизомеров *HpaII* и *MspI*) для выявления специфичных аллельных вариантов и эпигенетических паттернов у гетерозисных и негетерозисных гибридов перца сладкого, включенных в белорусскую селекционную программу. При изучении структурного полиморфизма ДНК с использованием микросателлитных маркеров обнаружено, что часть вариации в проявлении гетерозиса может быть объяснена полиморфизмом, который выявляется при SSR-анализе. Согласно нашим результатам, общее число полиморфных локусов и коэффициент соотношения полиморфных и мономорфных локусов могут служить дополнительным критерием отбора перспективных комбинаций скрещивания наряду с классическими методами селекции. При изучении эпигенетических модификаций ДНК, возникающих при гибридизации, была обнаружена тесная связь между статусом метилирования ДНК и гетерозисом для основных показателей продуктивности гибридов перца сладкого. Полученные результаты подтвердили предположение о том, что гибридизация способствует возникновению эпиаллельной вариации ДНК у гибридов первого поколе-

ния, которая может обуславливать гетерозис в F_1 . Таким образом, существование эпигенетической вариации ДНК способно объяснить отсутствие линейной связи между уровнем структурной ДНК-дивергенции и F_1 гетерозисом, так же как и проявление гетерозиса при гибридизации генетически сходного материала.

Ключевые слова: гетерозис; *Capsicum annuum* L.; аллельная SSR-вариация; ДНК-метилирование.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shapturenko M.N., Vakula S.V., Tarutina L.A., Nikitinskaya T.V., Pechkovskaya T.V., Mishin L.A., Khotyleva L.V. Allelic and epigenetic DNA variation in relation to F_1 heterosis manifestation in F_1 hybrids of *Capsicum annuum* L. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):812-819. DOI 10.18699/VJ18.425

The phenomenon of heterosis, known as superior performance of F_1 hybrids over their parents, has been exploited by agricultural practices since the beginning of the 20th century. It became a milestone event in plant breeding. The first bushels of hybrid corn seeds were sold in 1924 (Crabb, 1947), and hybrid production has been in rapid progress since that. With the large body of experimental information obtained in the study of maize hybrids and mathematical calculations, several genetic concepts were put forward to explain heterosis by various types of gene action (Shull, 1908, 1952; Bruce, 1910; East, Hayes, 1912; Jones, 1917). These concepts underwent various modifications and interpretations with new methodological approaches and knowledge about molecular mechanisms (Charlesworth, Willis, 2009; Kaeppler, 2012). According to the types of gene action, all of them refer to single-locus or multi-loci models. The first one proposes dominance and overdominance, whereas the second is focused on epistasis or nonallelic interactions. In fact, this segregation is not obvious. To date, there is evidence for single-locus heterosis (Shpak et al., 2004; Krieger et al., 2010; Singh et al., 2013), but its usefulness is limited. Most of quantitative traits are polygenic, and their phenotypic expression is influenced by multiple factors with relatively low effects. Evidently, a heterotic phenotype comes out from crosstalk of two parental strains in a context-dependent manner rather than from interaction in a single specific locus. If so, it is reasonable to assume a close relationship between heterozygosity and heterosis F_1 , i. e. the heterotic expression of phenotype should be correlated with genetic diversity (Melchinger, 1999; Springer, Stupar, 2007).

Earlier studies demonstrated that the relationships between molecular marker heterozygosity and hybrid performance were highly variable, depending on germplasm, mating design, type of used markers, and the architecture of the target trait (Perenzin et al., 1998; Gutierrez et al., 2002; Schrag et al., 2009; Usatov et al., 2014). In spite of considerable efforts, DNA markers promising for prediction of heterosis have not been well developed for hybrid breeding (Reif et al., 2012; Kawamura et al., 2016).

Some investigations suggest that the regulation of heterotic response in F_1 is mediated by epigenetic modifications of DNA, in particular, methylation, which alters differential gene expression (Groszmann et al., 2011; He et al., 2013; Ryder et al., 2014; Greaves et al., 2015). It has been found that hybrids F_1 have not only parental epialleles but hybrid-specific epialleles with altered frequencies (Shen et al., 2012). Some of these alterations in the F_1 epigenome may be the first in the set of events leading to the formation of a perfect

(heterotic) phenotype. This concept assumes the key role of regulatory genes under epigenetic modifications, so that even the expression of their small portion can cause the distribution of their effect at the level of regulatory networks involved in the formation of the mature phenotype (Becker, Weigel, 2012). Probably, the differences in gene activity caused by both differential methylation of parental forms and epigenetic modifications F_1 due to hybridization influence the formation of heterotic response.

In this work we evaluated SSR allelic variation and the DNA methylation status in sweet pepper with regard to heterosis manifestation to demonstrate thereby that a heterotic phenotype can be a product of both structural and nonstructural (epigenetic) variation.

Materials and methods

Plant materials. Eleven sweet pepper accessions from different geographic areas were taken as parents in breeding aimed at developing high-yielding long-fruited hybrids (Suppl. 1)¹. These genotypes were subjected to two full diallel crosses (5×5 , 6×6). Parental and hybrid plants were grown for phenotypic evaluation in an unheated greenhouse in randomized blocks with 35×50 cm area for each plant in five replications. Phenotypic data were randomly collected from the middle 15 genotypes of each accession. The main yield components recorded were fruit weight per plant (FWP), fruit number per plant (FNP), average weight of one fruit (AWF), and fruit length (FL).

Microsatellite DNA assay. The 11 parental lines were fingerprinted following standard protocols with twelve simple sequence repeat (SSR) markers: Hpms1-1, Hpms1-5, Hpms1-111, Hpms1-143, Hpms1-168, Hpms1-172, Hpms2-13, Hpms2-21, CAMS-864, CAMS-236, CAMS-647, CAMS-811 (Lee et al., 2004; Minamiyama et al., 2006; Mimura et al., 2012) (Suppl. 2). The resulting amplification products were resolved on an Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 automated sequencer. Fragment sizes were recorded by GeneMapper Software Version 4.1 and manually checked.

Methyl-sensitive arbitrary polymorphism assay. Methyl-sensitive amplified polymorphism (MSAP) analysis was performed to identify methylation-susceptible anonymous 5'-CCGG sequences and assess their methylation status in sweet pepper lines and their F_1 hybrids in both seedling and flowering stages. The upper thirds of young leaves were used.

MSAP is a modification of the standard AFLP technique. It employs *EcoRI* as a rare cutter and methylation-sensitive fre-

¹ Supplementary Materials 1–7 are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx13.pdf>

quently cutting restriction enzymes *HpaII* and *MspI*, which are a pair of isoschizomers recognizing the same tetranucleotide 5'-CCGG but differently sensitive to methylation at the inner or outer cytosine (Reyna-López et al., 1997). We tried several selective primers and chose a set that gave many consistently scorable bands. The primer sets used were the *EcoRI* reverse primer with one of *HpaII/MspI* forward primers (Suppl. 3).

The analysis of MSAP results was based on comparisons of binary presence-absence matrices for individuals obtained with the *EcoRI-HpaII* and *EcoRI-MspI* primer combinations. The presence of both *EcoRI-HpaII* and *EcoRI-MspI* products was denoted as the nonmethylated state. The presence of either *EcoRI-HpaII* or *EcoRI-MspI* corresponded to the methylated state. The analyses showing neither *EcoRI-HpaII* nor *EcoRI-MspI* were interpreted as uninformative, since such cases might be caused by either fragment absence or hypermethylation (Ashikawa, 2001).

The resulting MSAP products were resolved using the automated sequencer Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500. The data on fragment size were recorded by GeneMapper Software Version 4.1 and manually checked.

Data analysis. Mid-parent (MPH) and high-parent (HPH) heterosis indices were calculated from equations

$$\text{MPH} = 100 \times \frac{F_1 - \bar{P}}{\bar{P}}, \text{ where } \bar{P} = \frac{P_1 + P_2}{2},$$

$$\text{and HPH} = 100 \times \frac{F_1 - \text{BP}}{\text{BP}},$$

where BP is the best of the parents. If a hybrid was inferior to the worse of its parents, the negative heterosis was calculated against the worse parent.

The software Treecon was used to calculate genetic distances (GD) and to construct a neighbor-joining phylogenetic tree with 100 bootstraps (Nei et al., 1983).

Genetic distances were calculated from SSR data based on the Nei and Li algorithm (Nei, Li, 1979). Differential methylation (DM) was evaluated by counting the number and ratio of methylated and nonmethylated loci for each cross-combination of lines.

The relationships between genetic distances, differential SSR allelic polymorphism (DP), differential methylation, and heterosis were assessed by correlation analysis.

Results

Quantitative analysis and hybrid performance of two diallel sets

ANOVA revealed significant ($p < 0.05$) to highly significant ($p < 0.01$) differences among pepper lines for all traits under investigation. For mating design, the lines were divided into 2 sets (I, red and II, yellow) and crossed in the 5×5 and 6×6 full diallel manner. The subsequent trial of 50 hybrids F₁ and its parents with analysis of variance components showed that the general (GCA) and specific (SCA) combining abilities differed from zero significantly for all traits. The ratio of the GCA:SCA variance component exceeded zero except for AWF in the 2nd group (6×6), where $\text{SCA} > \text{GCA}$. Therefore, GCA (or the additive effect) is expected to be responsible for the greatest part of variation in hybrid performance in this factorial.

There was a significant difference among pairwise combinations in heterotic effect for yield component traits. The mean heterosis values for two sets of hybrids were positive for all traits. Frequencies of heterosis manifestation were higher for FWP and FNP. The levels of heterosis varied broadly from one cross to another within each diallel set, and differed between two sets. The distribution of the levels of mid-parent and high-parent heterosis is presented in Table 1. The widest range of variation in MPH for FWP was observed among the crosses in the 1st group, but for FNP and FL, in the 2nd group. Crosses with high hybrid superiority ($>30\%$, FWP) over the mid-parent level were found in both diallel sets, but negative implementations of heterosis were more frequent in set I.

High-parent heterosis was observed in both sets of hybrids for all traits under study. Its level for FWP varied from 0.3 to 68.8% in set I and from -14 to $+68\%$ in set II. Among 50 diallel hybrids, only 23 expressed heterosis for this trait: $\frac{1}{3}$ in set I and $\frac{1}{2}$ in set II. The HPH levels for other traits were significantly lower.

Genetic diversity by SSR analysis

A high level of genetic diversity at the 12 SSR loci was observed. Of the 60 detected alleles, 54 were polymorphic, including 9 unique alleles. The mean number of alleles per SSR locus was 5.0, ranging from 2 to 7 (see Suppl. 2). There

Table 1. Means, range of F₁ performance, mid-parent heterosis (MPH), high-parent (HPH) heterosis for fruit weight per plant (FWP, kg), fruit number per plant (FNP), average weight of one fruit (AWF, g) and fruit length (FL, cm) in two sets of diallel hybrids

Set	Trait	F ₁ performance		MPH (%)		HPH (%)	
		Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
I	FWP	0.81	0.5~1.3	20.3	-35.7~101.6	24.0	0.3~68.8
	FNP	9.01	6.7~12.0	14.8	-30.0~75.0	17.6	-4.1~42.8
	AWF	89.6	67.5~112.0	4.39	-15.4~30.5	1.57	-10.9~20.2
	FL	13.58	11.5~16.0	11.8	1.9~25.7	8.0	0.8~21.2
II	FWP	1.18	0.7~1.7	19.9	-24.0~77.0	15.1	-14.0~68.0
	FNP	7.72	6.0~13.0	16.15	-33.3~71.1	17.2	-25.1~58.5
	AWF	156.6	116.8~213.7	5.29	-19.8~35.5	5.82	-17.9~22.0
	FL	10.4	8.7~12.7	6.49	-13.0~33.7	7.96	-5.8~24.2

were seven loci in which more than 5 alleles were resolved. Among two sets of lines, there were six specific alleles in three loci, from which two were represented only in set I and four in set II (Suppl. 4).

Nei's coefficient of genetic dissimilarity for the SSRs data ranged from 0.136 to 0.434, the mean being 0.287. The two sets showed some specific features: inbred lines in set II demonstrated higher genetic diversity than set I.

UPGMA clustering based on Nei's distances was in accordance with the line diverging into two sets, i.e. it coincided with phenotypic features of the fruit (Fig. 1). Probably, some of the analyzed loci are associated with specific germplasm and particular traits.

Correlation among genetic distances, heterosis F₁, and hybrid performance

Genetic distances based on SSRs accounted for diallel set I pointed to strong positive correlations with MPH and HPH for AFW and FL (Table 2). Its coefficient of determination calculated from the regression of heterosis FL on GD was higher

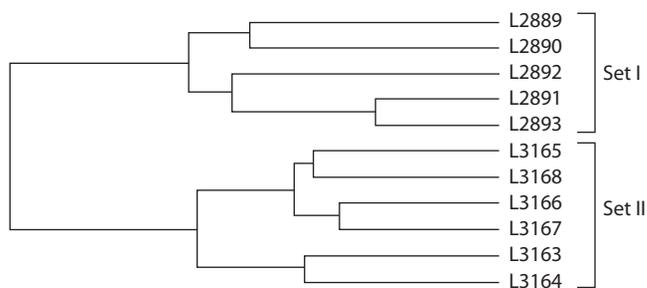


Fig. 1. Dendrogram based on the SSR-based genetic distances (GD) among 11 pepper accessions.

for half-diallel hybrids ($r^2 = 49\%$; 50.4%), but of heterosis AFW, for reciprocal hybrids ($r^2 = 38.4\%$; 49%). Significant negative correlations ($r = 0.52$) were observed for FNP with a higher impact of reciprocal hybrids ($r = -0.67$).

In set II, despite of a significant reciprocal effect, the relationships of GDs and the manifestation of heterosis in

Table 2. Correlation between differential SSR polymorphism, F₁ hybrid performance (x_j), mid-parent heterosis (MPH), and high-parent heterosis (HPH) for fruit weight per plant (FWP, kg), fruit number per plant (FNP), average fruit weight (AFW, g), and fruit length (FL, cm) in two sets of hybrids

Hybrids	Index	x_j	MPH				HPH							
			FWP	FNP	AFW	FL	FWP	FNP	AFW	FL				
Set I	Full-diallel hybrids	GD	0.05	-0.06	0.18	0.33	-0.31	-0.56**	0.42**	0.62**	-0.32	-0.48**	0.47**	0.52**
		NPL	0.12	0.10	0.09	0.36	-0.16	-0.42	0.35	0.68**	-0.15	-0.27	0.32	0.51*
		NML	-0.30	-0.11	-0.41	-0.45*	0.31	0.54*	-0.26	-0.68**	0.32	0.46*	-0.09	-0.62**
		R	0.16	0.08	0.19	0.46*	-0.23	-0.47*	0.30	0.70**	-0.21	-0.31	0.20	0.61**
	Half-diallel hybrids	GD	0.18	0.23	0.03	0.54	-0.16	-0.48	0.25	0.70**	-0.28	-0.32	0.12	0.71*
		NPL	0.23	0.35	-0.04	0.56	0.00	-0.23	0.20	0.75*	-0.02	-0.02	0.18	0.67*
		NML	-0.47	-0.46	-0.29	-0.55	0.14	0.31	-0.12	-0.61*	0.23	0.31	0.13	-0.69*
		R	0.25	0.32	0.06	0.65*	-0.11	-0.32	0.15	0.71*	-0.10	-0.13	0.06	0.75*
	Reciprocal hybrids	GD	-0.11	-0.36	0.35	0.23	-0.43	-0.67*	0.62*	0.55	-0.36	-0.61	0.70*	0.43
		NPL	0.00	-0.17	0.23	0.27	-0.35	-0.56	0.58	0.62*	-0.37	-0.47	0.66*	0.44
		NML	-0.12	0.25	-0.53	-0.42	0.55	0.71*	-0.48	-0.74*	0.51	0.59	-0.52	-0.62
		R	0.04	-0.18	0.33	0.38	-0.41	-0.58	0.54	0.69*	-0.41	-0.46	0.52	0.55
Set II	Full-diallel hybrids	GD	-0.04	0.20	-0.34	0.38*	0.04	0.08	-0.13	0.56**	0.12	0.10	0.01	0.46**
		NPL	0.00	-0.01	0.06	-0.08	0.00	-0.09	0.07	0.07	-0.07	-0.12	0.06	-0.01
		NML	0.03	0.10	-0.05	-0.15	0.10	0.02	0.11	-0.06	0.18	0.14	0.13	0.04
		R	-0.01	-0.03	0.05	-0.03	-0.01	-0.07	0.03	0.07	-0.08	-0.13	0.02	-0.03
	Half-diallel hybrids	GD	-0.26	-0.19	-0.17	0.14	-0.24	-0.25	0.04	0.42	-0.20	-0.23	0.04	0.22
		NPL	-0.04	-0.16	0.20	-0.12	-0.11	-0.23	0.15	0.09	-0.15	-0.21	0.22	-0.21
		NML	-0.26	-0.21	-0.12	-0.23	0.04	-0.16	0.28	0.04	0.27	-0.07	0.20	0.30
		R	0.04	-0.06	0.18	0.00	-0.08	-0.11	0.01	0.10	-0.15	-0.12	0.11	-0.26
	Reciprocal hybrids	GD	0.18	0.42	-0.48	0.60	0.26	0.38	-0.27	0.73**	0.33	0.40	0.01	0.55*
		NPL	0.03	0.07	-0.03	-0.05	0.09	0.05	0.01	0.06	-0.04	-0.04	-0.11	0.10
		NML	0.32	0.28	-0.01	-0.11	0.15	0.19	-0.04	-0.14	0.16	0.34	0.06	-0.10
		R	-0.06	-0.01	-0.03	-0.05	0.05	-0.03	0.06	0.07	-0.06	-0.14	-0.07	0.10

Note: GD, genetic distances; NPL, number of polymorphic loci; NML, number of monomorphic loci; R, NPL/NML ratio; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

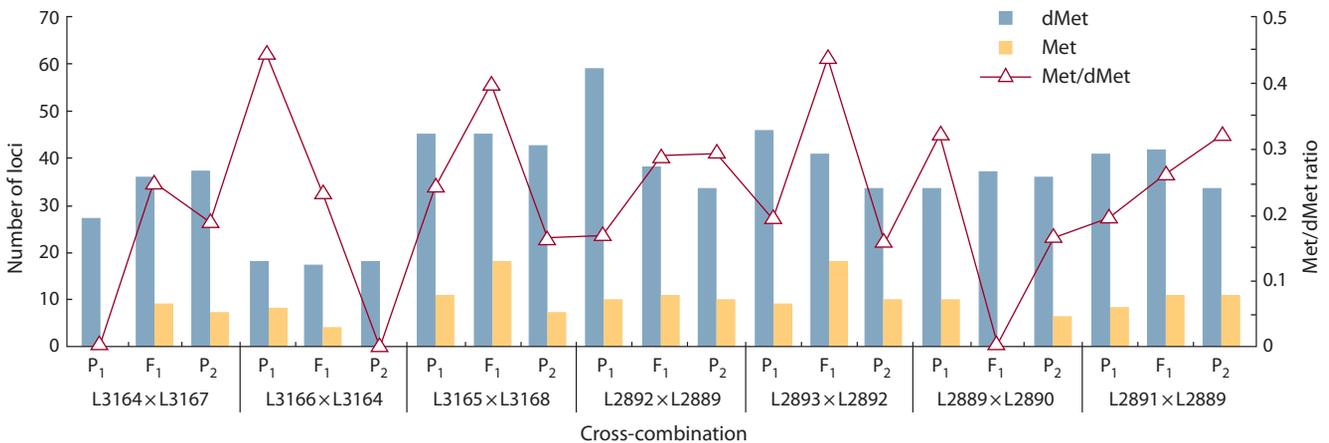


Fig. 2. Methylation status of sweet pepper hybrids and their parental lines at the flowering stage.

all 30 F_1 for FL assumed the values 0.56 and 0.46 for MPH and HPH, respectively, whereas measurement correlations in reciprocal hybrids exceeded ($r = 0.73$; 0.55) both the overall and half-diallel levels.

There were no significant correlations between GDs and hybrid performance for all measured quantitative traits; only a poor correlation between GDs and FL was observed in set II.

Correlation between differential SSR polymorphism, heterosis F_1 , and hybrid performance

Simple correlation coefficients – the differential polymorphism (DP) of the parents, F_1 performance, mid- and high-parent heterosis – were strong for FL, as GDs in set I (see Table 2). The impact of polymorphic locus number into MPH manifestation reached 46 % (r^2); into HPH, 26 %. The ratio of poly- and monomorphic loci ($R_{NPL/NML}$) was responsible for 49 % and 37 % of the F_1 heterotic response for MPH and HPH, respectively. The tightest links between NPL and $R_{NPL/NML}$, corresponding to (r) 0.71, were identified in half-diallel F_1 hybrids.

The number of monomorphic loci was directly associated with FNP and inversely, with heterosis for FL. The correlations increased in the reciprocal F_1 ($r = 0.7$) and decreased in the half-diallel F_1 . A similar tendency was found for AFW, where a significant positive link ($r = 0.66$) was detected for the number of polymorphic loci and HPH of this trait.

The analysis of relationships among indexes under study in set II revealed no significant associations.

Methyl-sensitive amplified polymorphism

Hybrids of 7 cross-combinations (L3164 × L3167, L3166 × L3164, L3165 × L3168, L2892 × L2889, L2893 × L2892, L2889 × L2890, L2891 × L2889) with different manifestation of heterosis, from negative to positive effects, were analyzed by MSAP with four AFLP markers. A total of 203 loci were detected in plant seedlings P_1 , P_2 , F_1 , of which 24 showed variability in DNA methylation (Suppls. 5–7). We found differences between parental and maternal lines in both the polymorphism of amplified loci and its epiallelic variability. The following cross combinations of allelic variants were detected (P_1/P_2): Met/dMet; dMet/dMet; Met/Met; Met/0; dMet/0. It is worth noting that in all analyzed hybrids at the

seedling stage status *dMet* (demethylated) was predominant regardless of the statuses of parental lines, except for five alleles, where both parents were methylated (ver. Met/Met) and the hybrid inherited the methylation status. It may be presumed that the early superiority of F_1 seedlings could be caused by demethylation and the resultant rise in gene expression, which, in turn, contributed to heterosis.

At the flowering stage, we evaluated 95 AFLP loci, which were differentially methylated in two parents and their hybrids. The most informative primers were *HpaII/MspI-tctt* and *HpaII/MspI-tctc*, which allowed us to consider 46 and 32 loci, respectively, including 30 and 28 differentially methylated among parental lines (Fig. 2). With *HpaII/MspI-tcaa*, we analyzed 17 loci, of which 14 were differentially methylated, including 13 *de novo* in hybrids. The highest number of *de novo* F_1 methylation patterns were detected with *HpaII/MspI-tctt*. Three (L3164 × L3167, L2893 × L2892, L3165 × L3168) of the seven analyzed hybrids had elevated methylation levels as compared to parents. Hybrid L2889 × L2890 had a reduced level of methylation, whereas L3166 × L3164 and L2892 × L2889 were methylated additively, i.e. within the parental range (Fig. 2, Table 3). The total number of nonmethylated loci in F_1 hybrids was comparable to parents.

The Met/dMet ratio varied among cross-combinations from zero to 0.44. Its highest rate was found in L2893 × L2892 and L3165 × L3168, and the lowest, in L2889 × L2890. In the last case, there were found no Met loci and this hybrid (L2889 × L2890) displayed the highest HPH levels for most traits analyzed.

Impact of methylation to heterosis

Analysis of F_1 methylation status in relation of heterosis found out that the total number of non-methylated loci in F_1 positively link ($r = 0.647$) with mid-parent heterosis (MPH) for FWP, whereas both the number of methylated loci and the Met/dMet ratio have lower impacts (Table 4).

For high-parent heterosis (HPH), we found a positive effect of the prevalence of *dMet* loci and negative effects of both the number Met loci and the Met/dMet ratio on FWP and FNP. In contrast, the heterosis for AFW was negatively predetermined by the numbers of both Met and *dMet* loci.

parameters were identified in set II. Possible explanations are: (i) different selection forces acted between initial germplasms in set I and set II; (ii) some SSR loci are likely to be linked with QTL fruit length. These suggestions are supported by correlations of SSR GD, DP with F_1 hybrid performance and heterosis for this trait. The contribution of SSR GD and DP had a greater effect on set I, whose selection was aimed at increasing fruit length. The presence of inverse relationships of GDs with FWP and FNP looks logical when we assumed links between SSR markers and FL, which could not affect the plant yield, not being associated with FWP or FNP. Our result argues for the suggestion that measures of heterozygosity are useful for predicting the heterotic response only when a significant portion of the selected markers are linked with heterotic QTLs or HTL of the trait at issue.

The predicting value of molecular markers for trait heterosis is expected to be low. SSR diversity characterizes the genome-wide diversity, while the heterozygous loci of target traits are expected to be localized (Xu et al., 2002). Quantitative traits of interest are complex. Consequently, they involve many genes with small effects, and it is difficult to find markers associated with such genes. One more issue is the expression of heterozygous or potentially heterotic loci in F_1 . The molecular basis of heterosis may be attributed to the altered regulation of gene expression in the hybrid (Shen et al., 2012). Two different parental alleles brought together in F_1 may create a combined pattern and cause deviations from a simple additive model, acting in favor of heterosis manifestation (Swanson-Wagner et al., 2006; Li et al., 2015). One of the mechanisms of transcriptional regulation is DNA methylation. Correlation studies suggest that epigenetic effects, including cytosine methylation of DNA, carry important phenotyping consequences and that they may be involved in pathways contributing to heterosis (Tsafaris et al., 1997; Chodavarapu et al., 2012; Ryder et al., 2014; Ong-Abdullah et al., 2015). It was observed in various plant taxa that a great majority of the cytosine methylation sites manifested stable inheritance from inbred parents to hybrids, but some sites showed deviation from expected parental additivity (Zhang et al., 2010; Becker et al., 2011; Lauria et al., 2014). Vergeer et al. (2012) suggested that inbreeding depression was linked with increased DNA methylation, reduced in outbreeds. However, other works (Sanghera et al., 2011; Shen et al., 2012) argue in favor of the importance of methylation for hybrid vigor. According to Sanghera et al. (2011), inbreeding depression is caused by lower genes expression due to homozygosity of methylated DNA in regulating factors, whereas heterosis, on the contrary, stems from higher levels of gene expression due to heterozygosity for methylated and nonmethylated alleles. To date, the relative impacts of hypermethylation and hypomethylation on heterosis are not clear (Kawanabe et al., 2016).

In this study, we analyzed differential methylation among P_1 , P_2 , and their F_1 hybrids and found some contrasting patterns in both the seedling and flowering stages. Our data suggest that the early superiority in some F_1 seedlings can be caused by demethylation and the resulting rise in gene expression, which should contribute to heterosis. Further heterosis manifestation, though, should be associated with the methylation/nonmethylation status. Correlations between heterosis and the numbers of methylated and nonmethylated loci at the

flowering stage suggest that cross-hybridization promotes the rise of epigenetic modifications in the hybrid genome. These modifications are likely to be associated with methylation, as their effects are eliminated at different developmental stages. Probably, these modifications influence the functional status of various genes, causing a cascade response in gene networks, which in turn modulates metabolism and contributes to the heterotic response.

Our results support the relative importance of epigenetic changes in F_1 , in addition to the structural DNA-polymorphism, for heterotic expression. Epigenetic modifications bring some nuances into the explanation of heterosis, and their genetic effects need to be tested. Their actions explain (i) the lack of linear relationships between genetic diversity and heterosis and (ii) the high heterotic effects in F_1 from closely related lines.

Acknowledgements

This study was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (BRFFR).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ashikawa I. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars. *Plant Mol. Biol.* 2001;45:31-39. DOI 10.1023/A:1006457321781.
- Becker C., Hagmann J., Müller J., Koenig D., Stegle O., Borgwardt K., Weigel D. Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature.* 2011;480(7376):245-249. DOI 10.1038/nature10555.
- Becker C., Weigel D. Epigenetic variation: origin and transgenerational inheritance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012;15(5):562-567. DOI 10.1016/j.pbi.2012.08.004.
- Bruce A.B. The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. *Science.* 1910;32:627-628. DOI 10.1126/science.32.827.627-a.
- Charlesworth D., Willis J. The genetics of inbreeding depression. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10:783-796. DOI 10.1038/nrg2664.
- Chodavarapu R.K., Feng S., Ding B., Simon S.A., Lopez D., Jia Y., Wang G.L., Meyers B.C., Jacobsen S.E., Pellegrini M. Transcriptome and methylome interactions in rice hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109(30):12040-12045. DOI 10.1073/pnas.1209297109.
- Crabb A.R. *The Hybrid-Corn Makers: Prophets of Plenty.* New Brunswick, NJ: Rutgers Univ. Press, 1947.
- East E.M., Hayes H.K. Heterozygosis in evolution and in plant breeding. *U.S. Dept. Agric. Plant Industr. Bull.* 1912;243:1879-1938. DOI 10.5962/bhl.title.119161.
- Greaves I.K., Gonzalez-Bayon R., Wang L., Zhu A., Liu P.-Ch., Groszmann M., Peacock W.J., Dennis E.S. Epigenetic changes in hybrids. *Plant Physiol.* 2015;168(4):1197-1205. DOI 10.1104/pp.15.00231.
- Groszmann M., Greaves I., Albertyn Z., Scofield G., Peacock W., Dennis E. Changes in 24-nt siRNA levels in *Arabidopsis* hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:2617-2622. DOI 10.1073/pnas.1019217108.
- Gutierrez O.A., Basu S., Saha S., Jenkins J.N., Shoemaker D.B., Cheatham C.L., McCarty J.C. Genetic distance among selected cotton genotypes and its relationship with F_2 performance. *Crop Sci.* 2002;42:1841-1847. DOI 10.2135/cropsci2002.1841.
- He G., He H., Deng X.W. Epigenetic variations in plant hybrids and their potential roles in heterosis. *J. Genet. Genomics.* 2013;40:205-210. DOI 10.1016/j.jgg.2013.03.011.
- Jones D. Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1917;3(4):310-312. DOI 10.1073/pnas.3.4.310.

- Kaeppler Sh. Heterosis: Many genes, many mechanisms – end the search for an undiscovered unifying theory. *ISRN Botany*. 2012; Article ID:682824. DOI 10.5402/2012/682824.
- Kawamura K., Kawanabe T., Shimizua M., Naganoc A.J., Saeki N., Okazaki K., Kaji M., Dennis E.S., Osabe K., Fujimoto R. Genetic distance of inbred lines of Chinese cabbage and its relationship to heterosis. *Plant Gene*. 2016;5:1-7. DOI 10.1016/j.plgene.2015.10.003.
- Kawanabe T., Ishikura S., Miyaji N., Sasaki T., Wu L.M., Itabashi E., Takada S., Shimizu M., Takasaki-Yasuda T., Osabe K., Peacock W.J., Dennis E.S., Fujimoto R. Role of DNA methylation in hybrid vigor in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;E6704-E6711. DOI 10.1073/pnas.1613372113.
- Krieger U., Lippman Z.B., Zamir D. The flowering gene *SINGLE FLOWER TRUSS* drives heterosis for yield in tomato. *Nat. Genet*. 2010;42:459-463. DOI 10.1038/ng.550.
- Lauria M., Piccinini S., Pirona R., Lund G., Viotti A., Motto M. Epigenetic variation, inheritance, and parent-of-origin effects of cytosine methylation in maize (*Zea mays*). *Genetics*. 2014;96(3):653-666. DOI 10.1534/genetics.113.160515.
- Lee S., Nahm H., Kim Y.M., Kim D.D. Characterisation and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Appl. Genet*. 2004;108:619-627. DOI 10.1007/s00122-003-1467-x.
- Li Q., Li Y., Moose S.P., Hudson M.E. Transposable elements, mRNA expression level and strand-specificity of small RNAs are associated with non-additive inheritance of gene expression in hybrid plants. *BMC Plant Biol*. 2015;15:168. DOI 10.1186/s12870-015-0549-7.
- Melchinger A.E. Genetic diversity and heterosis. In: Coors J.G., Stuab J.E. (Eds.). *The Genetics and Exploitation of Heterosis and Crop Plants*. Crop Sci. Soc. of America, Madison, 1999:99-118.
- Mimura Y., Inoue T., Minamiyama Y., Kubo N. An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breed. Sci*. 2012;62(1):93-98. DOI 10.1270/jsbbs.62.93.
- Minamiyama Y., Tsuru M., Hirai M. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol. Breed*. 2006;18(2):157. DOI 10.1007/s11032-006-9024-3.
- Nei M., Li M.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76(10):5269-5273. DOI 10.1073/pnas.76.10.5269.
- Nei M., Tajima F., Tatenyo Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol*. 1983; 19:153-170. DOI 10.1007/BF01840887.
- Ong-Abdullah M., Ordway J.M., Jiang N., ... Alwee S.S., Sambanthamurthi R., Martienssen R.A. Loss of *Karma* transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. *Nature*. 2015;525(7570):533-537. DOI 10.1038/nature15365.
- Perenzin M., Corbellini M., Accerbi M., Vaccino P., Borghi B. Bread wheat: F₁ hybrid performance and parental diversity estimates using molecular markers. *Euphytica*. 1998;100:273-279. DOI 10.1023/A:1018324811038.
- Reif J.C., Hahn V., Melchinger A.E. Genetic bases of heterosis and prediction of hybrid performance. *Helia*. 2012;35(57):1-8. DOI 10.2298/hel1257001r.
- Reyna-López G.E., Simpson J., Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Mol. Gen. Genet*. 1997;253(6):703-710. DOI 10.1007/s004380050374.
- Ryder P., McKewon C., Fort A., Spillane Ch. Epigenetics and heterosis in crop plants. In: *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamental and Applications*. Springer, Cham, 2014;13-31. DOI 10.1007/978-3-319-07971-4_2.
- Sanghera G.S., Wani S.H., Hussain W., Shafi W., Haribhushan A., Singh N.B. The magic of heterosis: New tools and complexities. *Nat. Sci*. 2011;9(11):42-53.
- Schrag T.A., Möhring J.M., Maurer H.P., Dhillon B.S., Melchinger A.E., Piepho H.-P., Sørensen A.P., Frisch M. Molecular marker-based prediction of hybrid performance in maize using unbalanced data from multiple experiments with factorial crosses. *Theor. Appl. Genet*. 2009;118:741-751. DOI 10.1007/s00122-008-0934-9.
- Shen H., He H., Li J., Chen W., Wang X., Guo L., Peng Z., He G., Zhong S., Qi Y., Terzaghi W., Deng X.W. Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two *Arabidopsis* ecotypes and their reciprocal hybrids. *Plant Cell*. 2012;24(3):875-892. DOI 10.1105/tpc.111.094870.
- Shpak E.D., Berthiaume C.T., Hill E.J., Torii K.U. Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development*. 2004;131(7):1491-1501. DOI 10.1242/dev.01028.
- Shull G.H. The composition of a field of maize. *J. Hered*. 1908;4:296-301. DOI 10.1093/jhered/os-4.1.296.
- Shull G.H. Beginnings of the heterosis concept. In: Gowen J.W. (Ed.). *Heterosis*. Ames, IA, Iowa State College Press, 1952;14-48.
- Singh R., Low E.-T., Ooi L., ... Ordway J.M., Sambanthamurthi R., Martienssen R.A. The oil palm *SHELL* gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. *Nature*. 2013;500:340-344. DOI 10.1038/nature12356.
- Springer N., Stupar R. Allelic variation and heterosis in maize: How do two halves make more than whole? *Genome Res*. 2007;17:264-275. DOI 10.1101/gr.5347007.
- Swanson-Wagner R.A., Jia Y., DeCook R., Borsuk L.A., Nettleton D., Schnable P.S. All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F₁ hybrid and its inbred parents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(18):6805-6810. DOI 10.1073/pnas.0510430103.
- Tsaftaris A.S., Kafka M., Polidoros A., Tani E. Epigenetic changes in maize DNA and heterosis. In: Abstracts of the Int. Symp. on "The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops". Mexico City, 1997;112-113.
- Usatov A.V., Klimenko A.I., Azarin K.V., Gorbachenko O.F., Markin N.V., Tikhobaeva V.E., Kolosov Yu.A., Usatova O.A., Bakoev S., Makarenko M., Getmantseva L. The relationships between heterosis and genetic distances based on SSR markers in *Heliantus annuus*. *Am. J. Agric. Biol. Sci*. 2014;9(3):270-276. DOI 10.3844/ajabssp.2014.270.276.
- Vergeer P., Wagemaker N., Ouborg N.J. Evidence for an epigenetic role in inbreeding depression. *Biol. Lett*. 2012;8(5):798-801. DOI 10.1098/rsbl.2012.0494.
- Xu W., Virmani S.S., Hernandez J.E., Sebastian L.S., Redona E.D., Li Zh. Genetic diversity in the parental lines and heterosis of the tropical rice hybrids. *Euphytica*. 2002;127:139-148. DOI 10.1023/A:1019960625003.
- Zhang M., Kimatu J.N., Xu K., Liu B. DNA cytosine methylation in plant development. *J. Genet. Genomics*. 2010;37:1-12. DOI 10.1016/S1673-8527(09)60020-5.

ORCID ID

M.N. Shapturnenko orcid.org/0000-0003-4694-3197
S.V. Vakula orcid.org/0000-0002-2242-7107
T.V. Nikitinskaya orcid.org/0000-0002-3263-4732
L.V. Khotyleva orcid.org/0000-0003-0295-5022

Методические указания по оценке содержания амилозы и амилопектина в картофельном крахмале

Ю.А. Хорошавин^{1, 2}, В.К. Хлесткин¹ ✉

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Статья посвящена разработке эффективной методики определения содержания амилозы и амилопектина в картофельном крахмале. Поскольку картофельный крахмал – важное возобновляемое сырье для целого ряда отраслей промышленности, для селекции картофеля по составу и физико-химическим свойствам крахмала и его промышленного применения важно иметь способ, позволяющий быстро тестировать образцы картофельного крахмала на содержание полисахаридов. Разработанная методика включает в себя элементы ранее разрозненных методов растворения и спектрофотометрического определения амилозы в крахмале и имеет следующие преимущества: 1) образцы крахмала растворяются в органическом растворителе (в 0.5 % растворе бромид лития в диметилсульфоксиде ДМСО); 2) измерение абсорбции света производится на двух длинах волн – 550 и 510 нм; 3) методика адаптирована для применения на планшетном спектрофотометре. Это позволяет избежать гидролиза полисахаридов крахмала в процессе растворения, делает более точным спектрофотометрическое определение концентрации комплекса амилозы с йодом в растворе и открывает возможность использования этой методики для поточного тестирования образцов крахмала. Применяя предложенную процедуру растворения, удается также избежать образования сгустков желированного крахмала и получать растворы, содержащие амилозу и амилопектин в тех же пропорциях, что и в исходном крахмале. Разработанная методика опробована на образцах крахмала, выделенных из клубней картофеля сортов Лина, Великан, Голубизна, Фаворит отечественной селекции, и может быть использована как для прикладных работ по определению содержания и состава амилозы в образцах картофельного крахмала, так и в научных исследованиях для выявления ассоциаций «генотип–признак».

Ключевые слова: крахмал; амилоза; амилопектин; спектрофотометрия; фенотипирование.

A modified procedure for the evaluation of the amylose and amylopectin content in potato starch

Yu.A. Khoroshavin^{1, 2}, V.K. Khlestkin¹ ✉

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The article is devoted to the development of a technique for determining the content of amylose and amylopectin, effective for potato starch. Since potato starch is an important renewable raw material for a number of industries, it is important to have a throughput approach that allows potato starch samples to be tested quickly for the content of its constituent polysaccharides for potato breeding for starch properties and for starch industrial application. The developed technique includes elements of previously disjointed procedures for dissolution and spectrophotometric determination of amylose in starch, and combines the following advantages: 1) starch samples dissolve in an organic solvent (0.5 % solution of lithium bromide in dimethyl sulfoxide (DMS)); 2) measurement of light absorption is performed at two wavelengths, 550 and 510 nm, and 3) the technique is adapted for use with a plate spectrophotometer. This procedure allows starch polysaccharides to avoid to avoid hydrolysis during dissolution, allows the precise spectrophotometric determination of the concentration of amylose complex with iodine in solution, and opens the possibility of using this technique for throughput phenotyping. Applying a certain dissolution procedure, it is also possible to avoid the formation of gelled starch clots in solutions for spectrophotometry, which is important for the preparation of solutions containing amylose and amylopectin in the same proportions as in the original starch. The technique was tested on starch isolated from potato tubers varieties Lina, Velikan, Golubizna, Favorit of domestic selection. The technique developed can be used for phenotyping starch of an extended set of potato varieties (determining the content and composition of amylose in potato starch samples) to identify “trait–genotype” associations.

Key words: starch; amylose; amylopectin; spectrophotometry; phenotyping.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хорошавин Ю.А., Хлесткин В.К. Методические указания по оценке содержания амилозы и амилопектина в картофельном крахмале. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):820-824. DOI 10.18699/VJ18.432

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khoroshavin Yu.A., Khlestkin V.K. A modified procedure for the evaluation of the amylose and amylopectin content in potato starch. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):820-824. DOI 10.18699/VJ18.432 (in Russian)

Цель настоящей работы – разработка методики, удобной для практического тестирования картофельного крахмала на содержание амилозы, для дальнейшей классификации по этому признаку селекционных сортов картофеля и создания генетических маркеров, связанных с этим признаком.

Как известно, крахмал представляет собой гранулы, формирующиеся в пластидах клеток растений и служащие в основном для запасаания и получения энергии. Согласно принятой в наше время кластерной модели (Wang et al., 1998), гранулы крахмала организованы в виде чередующихся кристаллических и аморфных слоев, образованных двумя типами полимерных молекул – амилозы и амилопектина. И амилоза, и амилопектин представляют собой полисахариды, мономерами которых являются фрагменты α -глюкозы. При этом амилоза – преимущественно линейный полимер с небольшим количеством коротких ответвлений, в котором фрагменты α -глюкозы соединены между собой (1→4) гликозидными связями, он имеет молекулярную массу 10^5 – 10^6 а. е. м. Амилопектин – разветвленная молекула, в которой фрагменты α -глюкозы соединены как (1→4), так и (1→6) гликозидными связями, имеет молекулярную массу 10^7 – 10^9 а. е. м.

Содержание амилозы в природном картофельном крахмале составляет, как правило, 20–30 %. Ранее работы по получению линий картофеля с измененным содержанием амилозы проводились традиционной селекцией и спонтанным мутагенезом (Schwall et al., 2000), но значимых результатов, по-видимому, добиться не удалось. Однако существуют генетически измененные линии картофеля, продуцирующие крахмал, содержащий преимущественно или амилозу, или амилопектин (Хлесткин и др., 2017).

Известно (van der Leij et al., 1991), что содержание амилозы в крахмале – моногенный признак, который контролируется геном *GBSSI*, кодирующим соответствующий белок закрепленной на грануле крахмалосинтазы (granule-bound starch synthase). Действительно, антисенс-нокаут по этому гену приводит к так называемым восковым (waxy) линиям картофеля, содержащим практически исключительно амилопектин (98–100 %) (Visser et al., 1991). Крахмал из такого картофеля обладает улучшенными гелеобразующими свойствами (скорость образования, прозрачность и вязкость геля) и может быть востребован в пищевой, бумажной и клеевой промышленности. Логично, что в Европе впервые был официально зарегистрирован генно-модифицированный картофель именно с модификацией по гену *GBSS* (Ryffel, 2010; Wandelt, 2014). Недавно такой картофель, дающий безамилозный крахмал, был получен методом CRISPR (Andersson et al., 2017).

Значительно сложнее получить линии с низким содержанием амилопектина. Содержание амилопектина определяется генами ветвления полисахаридов крахмала, кодирующих соответствующие белки (starch branching enzyme, SBE), и их как минимум два – *SBEI* и *SBEII*. Причем нокаут по одному из них не приводит к значительному сокращению содержания амилопектина из-за компенсаторного эффекта, когда другой ген берет на себя функцию нокаутированного гена. И только нокаут по обоим генам позволил получить линии картофеля с

крахмалом, содержащим в среднем менее 40 % амилопектина (Andersson et al., 2006). Такой высокоамилозный крахмал может обладать значительной резистентностью и низким гликемическим индексом, что дает возможность использовать его в диетическом питании (повышенная резистентность высокоамилозного крахмала на примере рисового крахмала показана в исследовании (Srikaeo, Sangkhiaw, 2014)). Представляет также определенный интерес использование такого крахмала в технических целях (Jobling, 2004).

Методические подходы, применяемые для измерения содержания амилозы и амилопектина в крахмале

Из-за значительного различия молекулярных свойств амилозы и амилопектина физико-химические свойства крахмала в зависимости от содержания этих полисахаридов сильно варьируют (Jobling, 2004). Существует несколько подходов к определению этого признака, сравнение которых приведено в работе (Zhu et al., 2008). На практике чаще используются два из них. Первый базируется на высокоэффективной жидкостной хроматографии, методе, требующем специальной подготовки и оборудования (Kobayashi et al., 1985). Поскольку амилопектин – разветвленный полимер с большим молекулярным весом, нужны также специальные колонки, дорогостоящие полисахаридные стандарты, детектор, подходящий для идентификации полисахаридов. Количественное растворение образцов крахмала в растворителях, подходящих для хроматографии, не всегда возможно без разрушения полисахаридов. Все это делает метод неточным, дорогостоящим и недоступным для многих лабораторий.

Второй подход основан на спектрофотометрическом определении концентрации комплекса амилозы с йодом в растворе. Известно, что и амилоза, и амилопектин способны к образованию комплексов с йодом (Davis et al., 1994). Для амилозы этот комплекс представляет собой супрамолекулярное соединение включения с йодом, имеющее широкую полосу поглощения с максимумом при $\lambda_{\max} = 620$ нм. В случае амилопектина комплекс имеет другую природу (не соединение включения) со значительно менее интенсивной красно-коричневой окраской. Было показано, что точность определения амилозы значительно повышалась при использовании разницы в поглощении света при $\lambda_{\max} = 620$ нм и при $\lambda_{\min} = 510$ нм – длине волны, соответствующей локальному минимуму поглощения (Zhu et al., 2008). Таким образом, большинство спектрофотометрических методик определения амилозы основано на измерении поглощения света ее комплексом с йодом на одной или двух длинах волн, поскольку этот метод наиболее экономичен и прост в исполнении.

Основные сложности пробоподготовки при спектрофотометрическом методе определения содержания амилозы в крахмале

Главным различием между спектрофотометрическими методиками, а также ключевой сложностью при использовании этого метода анализа является пробоподготовка, в частности приготовление раствора картофельного крахмала. Картофельный крахмал, в отличие от зернового,

имеет лишь следовые примеси жиров и белков. Однако высокий молекулярный вес и плотная сложная компоновка гранул крахмала значительно усложняют процесс его количественного растворения для получения истинного раствора без нарушения структуры входящих в него полисахаридов.

Исторически методики измерения соотношения амилозы и амилопектина были основаны на растворении крахмала в водных, щелочных (McCready, Hassid, 1943) или кислотных (Hovenkamp-Hermelink et al., 1988) средах. Нами были предприняты попытки использовать методику растворения крахмала в горячей щелочи (Zhu et al., 2008), согласно которой крахмал растворяют в 1 М NaOH при 80 °С. После разбавления водой, нейтрализации и окрашивания йодом измеряли оптическую плотность образца. При этом не удалось получить удовлетворительной воспроизводимости результатов, что связано, по-видимому, с частичным разрушением полисахаридов. На аналогичные проблемы с гидролизом крахмала в щелочных условиях указывают и другие работы (Wu et al., 2014). Растворение крахмала в чистой воде при высокой температуре (выше 90 °С) привело к существенно завышенным данным по концентрации амилозы в растворе и крахмале (более 60 % амилозы в пересчете на состав крахмала). Это могло произойти либо из-за неполного растворения крахмала, набухшие прозрачные сгустки которого во многих случаях хорошо были видны на стенках, либо из-за деградации крахмала с образованием из амилопектина линейных олигосахаридов, которые также способны давать окрашенные соединения с йодом, как и амилозные цепи.

В органических малополярных и не образующих сильных водородных связей растворителях (углеводороды, сложные и простые эфиры, ацетон, спирты) крахмал практически не растворяется. Рассматривая органические растворители в качестве среды для спектрофотометрического определения комплекса амилозы с йодом, необходимо принимать во внимание как растворение крахмала и неорганических йодидов, так и саму возможность образования супрамолекулярного комплекса. В литературе имеются данные о растворении крахмала с использованием таких растворителей, как имидазол (Zdanowicz et al., 2016), диметилсульфоксид (ДМСО) (Kurtzman et al., 1973) и диметилацетамид (Striegel, Timpa, 1995).

Нам удалось на основе различных процедур разработать и адаптировать методику, позволяющую растворить картофельный крахмал без разрушения полисахаридных цепей, произвести его окрашивание и измерения в водной среде, а также вычислить содержание амилозы, определяя оптическую плотность образца на двух длинах волн. Методика может применяться как со стандартными спектрофотометрическими кюветами с длиной оптического пути 10 мм, так и в поточном варианте с помощью планшетного спектрофотометра.

Построение калибровочной прямой

Для получения калибровочной прямой использовали амилозу, выделенную нами из картофельного крахмала по методике (Mua, Jackson, 1998).

Амилозу растворили в 0.5 % растворе LiBr в ДМСО, разбавили полученные растворы водой для получения

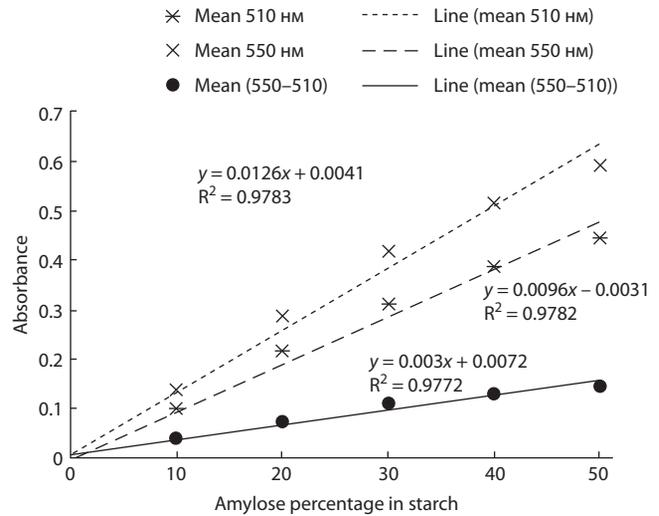


Fig. 1. Calibration curve (solid) based on the difference between light absorption at 550 and 510 nm. Approximation curves for light absorption values at 550 and 510 nm are shown separately.

The dispersion according to separate data on light absorption for 550 and 510 nm is higher than on the data on the difference between these values, in agreement with Zhu et al. (2008).

раствора с концентрацией около 0.15 мг/мл. Далее в лунках планшеты помещали аликвоты приготовленного раствора объемом от 0 до 100 мкл и доводили водой объем раствора в каждой лунке до 100 мкл. После этого смесь цитратного буфера (0.1 н, pH 6) с раствором йода (2 г KI и 0.2 г I₂ на 100 мл воды) доводили объем раствора в лунках до 300 мкл. При этом происходит интенсивное окрашивание раствора, цвет которого в дневном свете визуальное определяется как голубой. Измерение поглощения света в планшетном спектрофотометре проводили на двух длинах волн – при 510 и 550 нм, согласно (Zhu et al., 2008) вычисляли разницу и полученные данные использовали для построения калибровочной прямой и получения уравнения зависимости разницы поглощения на двух длинах волн от содержания амилозы в образце (рис. 1). Всего получили две повторности по числу навесок амилозы и три повторности по числу измерений.

Методика измерения содержания амилозы и амилопектина

Для проведения измерения содержания амилозы в картофельном крахмале приготовили раствор навески картофельного крахмала (примерно 5 мг) в 0.5 % растворе бромида лития в ДМСО путем длительного встряхивания при нагревании до 80 °С на термошейкере для достижения полного растворения крахмала. Как оказалось, критически важно обеспечить равномерное распределение набухшего в нагретом растворителе крахмала по всему объему раствора с самого начала процесса растворения. Визуальное отсутствие осадка в пробирке не обязательно означает его полное растворение, крахмал может находиться в растворе в виде крупных прозрачных агломератов. Поэтому в течение первых 30 мин нагревания раствор интенсивно встряхивали вручную примерно один раз в 10 мин. Далее

раствор крахмала в ДМСО разбавляли водой в 25 раз до получения раствора, содержащего примерно 0.15 мг/мл крахмала. Определение разности оптических плотностей полученного образца при 550 и 510 нм дало возможность вычислить содержание амилозы в образце с помощью калибровочной прямой. Эксперименты проводились в трех технических повторностях с расчетом стандартного отклонения (рис. 2).

Протокол измерения и расчета содержания амилозы в крахмале

1. Поместить в полипропиленовые пробирки типа Eppendorf на 1.7 мл 5 мг крахмала (по три повторности для каждого образца крахмала).
2. Добавить 1.3 мл 0.5 % раствора LiBr в ДМСО.
3. Поставить пробирки в термошейкер (400 об./мин, 80 °С, 20 ч). Первые 30 мин один раз в 10 мин дополнительно встряхивать пробирки вручную с переворачиванием для предотвращения образования комков набухшего крахмала на дне.
4. Приготовить раствор йода (2 г KI и 0.2 г I₂ на 100 мл раствора). Этот раствор стабилен и может храниться в темном месте в течение нескольких недель.
5. 200 мкл раствора йода разбавить до 10 мл цитратным буфером (0.1 М, pH = 6). Этот раствор менее стабилен (годен один-два часа), его нужно использовать свежеприготовленным непосредственно перед анализом.
6. По 200 мкл каждого из полученных на шаге 3 растворов крахмала разбавить при перемешивании и нагревании до 50 °С дистиллированной водой до суммарного объема 5 мл. Нагревание и перемешивание предотвращают выпадение амилозы в твердом виде при смешивании водного и неводного растворов.
7. По 100 мкл полученных на шаге 6 растворов поместить в лунки 96-луночного планшета для проведения спектрофотометрических измерений.
8. По 200 мкл полученных на шаге 5 растворов йода в буфере добавить в лунки планшета, доведя таким образом суммарный объем жидкости в каждой лунке до 300 мкл. При этом происходит окрашивание растворов в голубой цвет (при дневном освещении).
9. В три свободные лунки добавить по 300 мкл цитратного буфера (0.1 М, pH = 6) в качестве растворов сравнения.
10. Планшет установить в спектрофотометр и инкубировать при встряхивании в течение 30 мин.
11. Измерить значение абсорбции света при 510 и 550 нм в каждой заполненной лунке, автоматически учитывая растворы сравнения (см. шаг 9). Каждое измерение выполнить в трех технических повторностях.
12. Данные экспортировать в программу для обработки (в нашем случае Excel). Провести усреднение по повторностям, найти разницу значений абсорбции света $Abs_{550} - Abs_{510}$.
13. Полученные данные подставить в уравнение калибровочной кривой и найти содержание амилозы в образце.
14. Содержание амилопектина в крахмале определяется как 100 % минус содержание амилозы (в %).

Калибровочная прямая получена по этому же протоколу с использованием навески амилозы вместо навески крах-

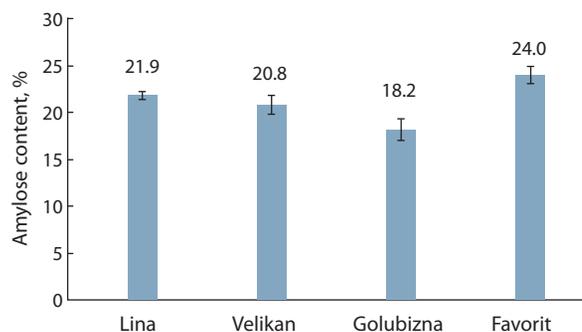


Fig. 2. Amylose contents in samples from four potato varieties bred in Russia.

мала. На шаге 7 использовать аликвоты по 0, 20, 40, 60, 80, 100 мкл раствора амилозы, доведенные водой до 100 мкл.

Необходимые материалы и оборудование

1. Вода дистиллированная и набор аналитической посуды для биохимического анализа крахмала.
2. УФ-спектрофотометр любой модели, способный измерять оптическую плотность образца при 550 и 510 нм. В исследовании использовали планшетный спектрофотометр Epoch2 с 96-луночными планшетами Costar с плоским дном. Методика опробована также на кюветном спектрофотометре BioRad с кварцевыми кюветами с длиной оптического пути 10 мм.
3. Образец амилозы был получен в секторе химической биологии растений ИЦиГ СО РАН, согласно методике из (Mua, Jackson, 1998). Методика получения крахмала из картофеля – по (Chung et al., 2014).

Заключение

Содержание амилозы в крахмале разных сортов и гибридов картофеля различно и может быть исследовано методом УФ-спектроскопии на двух длинах волн. На достоверность результатов значительное влияние оказывают пробоподготовка и учет поглощения света на двух длинах волн, в связи с чем была разработана методика, комбинирующая: 1) определенную процедуру растворения в органическом растворителе, 2) измерение абсорбции света на двух длинах волн и 3) возможность использования для поточного скрининга на планшетном спектрофотометре. Показано, что содержание амилозы в крахмале картофеля сортов Лина, Великан, Голубизна, Фаворит варьирует от 18.2 до 24 %.

Применение такой методики для большого числа образцов даст возможность оценивать содержание амилозы как признак для поиска ассоциированных с ним локусов и ДНК-маркеров и использования последних в современных наукоемких методах селекции (Khlestkin et al., 2018).

Acknowledgement

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-29-08006. The authors are grateful to the Shared Access Center «Collection of Crop Genotypes for Basic Research in Plant Genetics and the Development

of Genetic Technologies for Marker-Assisted and Genomic Selection» (GenAgro).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Хлесткин В.К., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А. Гены-мишени для получения сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с заданными свойствами крахмала. С.-х. биология. 2017;52(1):25-36. [Khlestkin V.K., Peltek S.E., Kolchanov N.A. Target genes for development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars with desired starch properties. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017;52(1):25-36. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.25rus. (in Russian)]
- Andersson M., Melander M., Pojmark P., Larsson H., Bulow L., Hofvander P. Targeted gene suppression by RNA interference: An efficient method for production of high-amylose potato lines. J. Biotechnol. 2006;123:137-148. DOI 10.1016/j.jbiotec.2005.11.001.
- Andersson M., Turesson H., Nicolai A., Falt A.-S., Samuelsson M., Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Rep. 2017;36:117-128. DOI 10.1007/s00299-016-2062-3.
- Chung H.-J., Li X.-Q., Kalinga D., Lim S.-T., Yada R., Liu Q. Physicochemical properties of dry matter and isolated starch from potatoes grown in different locations in Canada. Food Res. Int. 2014;57:89-94. DOI 10.1016/j.foodres.2014.01.034.
- Davis H., Skrzypek W., Khan A. Iodine binding by amylopectin and stability of the amylopectin-iodine complex. J. Polymer. Sci. Polymer. Chem. 1994;32(12):2267-2274. DOI 10.1002/pola.1994.080321208.
- Hovenkamp-Hermelink J., de Vries J., Adamse P., Jacobsen E., Witholt B., Feenstra W. Rapid estimation of the amylose/amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. Potato Res. 1988;31:241-246.
- Jobling S. Improving starch for food and industrial applications. Curr. Opin. Plant Biol. 2004;7:210-218. DOI 10.1016/j.pbi.2003.12.001.
- Khlestkin V., Peltek S., Kolchanov N. Review of direct chemical and biochemical transformations of starch. Carbohydr. Polym. 2018; 181:460-476. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.10.035.
- Kobayashi S., Schwartz S.J., Lineback D.R. Rapid analysis of starch, amylose and amylopectin by high-performance size-exclusion chromatography. J. Chromatogr. 1985;319(2):205-214. DOI 10.1016/S0021-9673(01)90555-2.
- Kurtzman R., Jones F., Bailey G. Dissolution of starches in dimethyl-sulfoxide and variations in starches of several species, varieties, and maturities. Cereal Chem. 1973;50:312-321.
- McCready R., Hassid W. The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch. J. Am. Chem. Soc. 1943; 65(6):1154-1157. DOI 10.1021/ja01246a038.
- Mua J., Jackson D. Retrogradation and gel textural attributes of corn starch amylose and amylopectin fractions. J. Cereal Sci. 1998;27: 157-166. DOI 10.1006/jcrs.1997.0161.
- Ryffel G.U. Making the most of GM potatoes. Nat. Biotechnol. 2010; 28(4):318. DOI 10.1038/nbt0410-318.
- Schwall G.P., Safford R., Westcott R.J., Jeffcoat R., Tayal A., Shi Y.C., Gidley M.J., Jobling S.A. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. Nat. Biotechnol. 2000;18(5): 551-554. DOI 10.1038/75427.
- Srikeno K., Sangkhaw J. Effects of amylose and resistant starch on glycaemic index of rice noodles. LWT – Food Sci. Technol. 2014; 59(2):1129-1135. DOI 10.1016/j.lwt.2014.06.012.
- Striegel A., Timpa J. Molecular characterization of polysaccharides dissolved in Me2Nac-lcl by gel-permeation chromatography. Carbohydr. Res. 1995;267(2):271-290.
- van der Leij F., Visser R., Ponstein A., Jacobsen E., Feenstra W. Sequence of the structural gene for granule-bound starch synthase of potato (*Solanum tuberosum* L.) and evidence for a single point deletion in the *amf* allele. Mol. Gen. Genet. 1991;228(1-2):240-248.
- Visser R., Somhorst I., Kuipers G., Ruys N., Feenstra W., Jacobsen E. Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. Mol. Gen. Genet. 1991; 225:289-296.
- Wandelt C. Quality traits: Altered starch composition in potato (BASF Plant Science Company GmbH, Meeting on “Genetic basis of unintended effects in modified plants”, 14–15 January 2014, Canada). Ottawa, 2014. Available <http://hesiglobal.org/hesi/wp-content/uploads/sites/11/2015/12/Quality-traits-altered-starch-composition-in-potato.pdf>.
- Wang T.L., Bogracheva T.Ya., Hedley C.L. Starch: as simple as A, B, C? J. Exp. Bot. 1998;49(320):481-502. DOI 10.1093/jxb/49.320.481.
- Wu A., Li E., Gilbert R. Exploring extraction/dissolution procedures for analysis of starch chain-length distributions. Carbohydr. Polym. 2014;114:36-42.
- Zdanowicz M., Spychaj T., Maka H. Imidazole-based deep eutectic solvents for starch dissolution and plasticization. Carbohydr. Polym. 2016;140:416-423. DOI 10.1016/j.carbpol.2015.12.036.
- Zhu T., Jackson D., Wehling R., Geera B. Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique. Cereal Chem. 2008;85(1):51-58. DOI 10.1094/CCHEM-85-1-0051.

Оценка эффективности эрадикации стволовых иницирующих раковых клеток на примере первичных культур глиобластомы человека

Е.В. Долгова¹✉, А.С. Проскурина¹, Е.А. Поттер¹, Т.В. Тыринова², О.С. Таранов³, Я.Р. Ефремов^{1,4}, К.Е. Орищенко¹,
С.В. Мишинов⁵, В.В. Ступак⁵, А.А. Останин², Е.Р. Черных², С.С. Богачев¹

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

² Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

³ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁵ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

Из фрагмента ткани опухоли, взятого во время хирургической операции у больных К. (жен., 61 г., диагноз: рецидив глиобластомы) и Ж. (жен., 60 лет, диагноз: рецидив глиобластомы), были получены первичные культуры клеток глиобластомы человека. На основе новой стратегии синхронизации стволовых иницирующих раковых клеток и при использовании разработанного режима их эрадикации «3+1» была оценена эффективность нового терапевтического подхода, направленного на разрушение ракового клеточного сообщества, на первичных клеточных линиях глиобластомы человека. Ключевыми элементами стратегии служили следующие индикаторные результаты:

1) оценка присутствия в анализируемых культурах стволовых иницирующих раковых клеток по их способности поглощать двуцепочечную ДНК, меченную красителем (TAMRA+ клетки); 2) определение реперных временных точек цикла репарации межцепочечных шивков ДНК, индуцированных кросс-линкирующим цитостатиком митомицином С; 3) оценка синхронизации клеток в фазах клеточного цикла; 4) определение дня после начала терапии, на который TAMRA+ клетки синхронно присутствуют в G1/S-фазе клеточного цикла, чувствительной для обработок; 5) определение режима эрадикации TAMRA+ клеток (стволовых иницирующих раковых клеток). Обработка культур проводилась кросслинкирующим цитостатиком митомицином С и сложнокombозиционным препаратом ДНК. Показано, что после проведенных обработок клетки перестают делиться и культуры деградируют. Клеточная линия К. к 30-м суткам наблюдения полностью деградировала. Количество клеток культуры Ж. к 15-м суткам наблюдения упало от исходного практически в три раза. Этот показатель по отношению к контролю на 15-й день измерения составил 1/7.45 для митомицина С и 1/10.28 для митомицина С и ДНК. Основное действие комбинация препаратов митомицин С и ДНК оказывает на TAMRA+ стволовые иницирующие раковые клетки клеточных популяций глиобластом. Использование митомицина С как в изолированном виде, так и в комбинации с ДНК демонстрирует эффективное элиминирующее действие как на TAMRA+ стволовые иницирующие клетки, так и на первичные культуры глиобластом человека в целом.

Ключевые слова: глиобластома; первичная культура; митомицин С; стволовые иницирующие раковые клетки; TAMRA-флуорохром.

Evaluation of a strategy for tumor-initiating stem cell eradication in primary human glioblastoma cultures as a model

E.V. Dolgova¹✉, A.S. Proskurina¹, E.A. Potter¹,
T.V. Tyrinova², O.S. Taranov³, Ya.R. Efremov^{1,4},
K.E. Orishchenko¹, S.V. Mishinov⁵, V.V. Stupak⁵,
A.A. Ostanin², E.R. Chernykh², S.S. Bogachev¹

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

² Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

³ The State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁵ First Department of Neurosurgery, Y.L. Tsivian Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics, Novosibirsk, Russia

Primary cultures of human glioblastoma were obtained from the surgical material of patients K. (female, 61 years, Ds: relapse of glioblastoma) and Zh. (female, 60 years, Ds: relapse of glioblastoma). The effectiveness of a new therapeutic approach aimed at destroying the cancer cell community was evaluated on the primary cell lines of human glioblastoma culture by employing a new strategy of tumor-initiating stem cell synchronization and a domestic strategy of their eradication "3+1". The key elements of the strategy were the following indicator results: (1) evaluation of the presence of tumor-initiating stem cells in a population of cells from analyzed cultures by their ability to internalize double-stranded labeled DNA (TAMRA+ cells); (2) determination of the reference time points of the repair cycle of DNA interstrand cross-links induced by cross-linking cytostatic mitomycin C; (3) evaluation of cell cycle synchronization; (4) determination of the time (day after therapy initiation) when TAMRA+ cells were synchronously present in phase G1/S of the cell cycle, sensitive to the therapy; and (5) establishment of the TAMRA+ (tumor-initiating stem cells) eradication schedule. The cultures were treated with cross-linking cytostatic mitomycin C and a compositional DNA preparation. After the treatments, cell division slows down, and the cultures degrade. The K cell line completely degraded within 30 days of observation. The cell number of the Zh culture fell to nearly one-third of

the starting value by day 15 of observation. On day 15, this indicator constituted 1/7.45 for mitomycin C and 1/10.28 for mitomycin C + DNA with reference to the control.

The main target of the mitomycin C + DNA regimen was TAMRA+ tumor-initiating stem cells of the glioblastoma cell populations. The action of mitomycin C alone or in the combination with DNA demonstrated effective elimination of TAMRA+ tumor-initiating stem cells and the whole primary cultures of human glioblastomas.

Key words: glioblastoma; primary cell line; mitomycin C; tumor-initiating stem cells; TAMRA-fluorochrom.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Долгова Е.В., Проскурина А.С., Поттер Е.А., Тыринова Т.В., Таранов О.С., Ефремов Я.Р., Орищенко К.Е., Мишинов С.В., Ступак В.В., Останин А.А., Черных Е.Р., Богачев С.С. Оценка эффективности эрадикации стволовых иницирующих раковых клеток на примере первичных культур глиобластомы человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):825-836. DOI 10.18699/VJ18.31-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Dolgova E.V., Proskurina A.S., Potter E.A., Tyrinova T.V., Taranov O.S., Efremov Ya.R., Orishchenko K.E., Mishinov S.V., Stupak V.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Evaluation of a strategy for tumor-initiating stem cell eradication in primary human glioblastoma cultures as a model. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):825-836. DOI 10.18699/VJ18.31-o (in Russian)

Глиобластома – наиболее распространенный и злокачественный тип первичной опухоли мозга. Эта разновидность опухоли имеет инвазивный характер и располагается в жизненно важных областях головного мозга, что делает ее удаление чрезвычайно сложным для хирургического вмешательства (Omuro, DeAngelis, 2013). Глиомы составляют в среднем 24 % всех опухолей головного мозга и являются вторыми по частоте встречаемости у взрослого населения (McNeill, 2016). Средняя продолжительность жизни пациентов с анапластической астроцитомой и глиобластомой составляет 15.2 и 6.9 мес. соответственно (Gilbert, Ross, 2011).

Высокая степень злокачественности глиобластомы обуславливается наличием самообновляющихся стволовых (иницирующих) раковых клеток (СИРК), которые способствуют инициации опухоли и терапевтической устойчивости (O'Brien et al., 2010). Так, СИРК глиом способны самовозобновляться в ряду поколений, формировать нейросферы, имеют способность к дифференцировке, высокую подвижность и определенное микроокружение (Gilbert, Ross, 2011; Brescia et al., 2012). Считается, что именно СИРК глиом устойчивы к действию цитостатиков и гамма-облучения (Carruthers et al., 2015). Указанные клетки обладают повышенной экспрессией эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF). Установлено, что СИРК глиом обладают высокой пролиферативной активностью и лекарственной резистентностью благодаря активной работе таких сигнальных путей, как Notch, Hedgehog-Gli, Wnt/ β -катенин, TGF- β /SMAD, PI3K/Akt/mTOR (Beier et al., 2007; Qiang et al., 2009; Schreck et al., 2010; Takezaki et al., 2011; Никифорова и др., 2016). Этот тип клеток отличается также иммунорезистентностью (Bao et al., 2006; Kase et al., 2013).

К сожалению, до настоящего времени нет унифицированной информации относительно маркеров СИРК глиом, что служит причиной отсутствия таргетных способов лечения рака головного мозга (Zhang et al., 2008; Chen et al., 2010; Brescia et al., 2012; Kase et al., 2013; Dahlrot et al., 2014). Таким образом, обнаружение универсального специфического маркера СИРК глиом – приоритетная задача.

В Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН, лаборатория индуцированных клеточных процессов) обнаружено ранее неизвестное свойство низкодифференцированных клеток различного генеза, включая стволовые клетки и стволовые иницирующие раковые клетки, захватывать экстраклеточные фрагменты двуцепочечной ДНК имманентным (свойственным только этим клеткам) механизмом.

С использованием найденного свойства этого типа клеток, а также другого, впервые описанного их свойства – несанкционированного участия захваченных экстраклеточных фрагментов ДНК в репаративном процессе, искусственно индуцированном в стволовых клетках, удалось решить две задачи: эрадикация СИРК, лишив опухоль туморогенного начала, и вылечить экспериментальных мышей от в высшей степени злокачественной асцитной формы карциномы Кребс-2 и ее солидного варианта. Суть подхода базируется на применении двух найденных свойств и впервые разработанном режиме синхронизации СИРК в чувствительной для терапии фазе клеточного цикла, что необходимо для эрадикации СИРК. При указанном подходе разрушается хроматиновый остов («хребет») клетки, что приводит к ее гибели. Необходимым условием применения разработанной стратегии является использование сложноконпозиционного препарата, составные части которого дифференцированно интерферируют стадию эксцизионной репарации нуклеотидов (NER – nucleotide excision repair) и стадию гомологичной рекомбинации в СИРК. Такой принцип полностью лишает возможности СИРК преодолеть терапевтическую обработку, что сопровождается их разрушением и вылечиванием животных от рака (Dolgova et al., 2014; Potter et al., 2016).

Принцип синхронизации СИРК в чувствительной G1/S-фазе клеточного цикла описан в работе (Поттер и др., 2016). После ориентированного на фазы репаративного цикла трехкратного введения циклофосфана происходит масштабное апоптотическое разрушение раковых клеток в определенный, зависящий от типа рака, день после начала обработок (для опухоли Кребс-2 это были 8–12-е сутки от первой инъекции циклофосфана). При этом все со-

хранившие морфологическую целостность асцитные раковые клетки, проанализированные в указанный день (выделенные на фиколл-верографиневом градиенте), находятся в G1/S-фазе клеточного цикла, а количество TAMRA+ клеток достигает ~13 % (1–3 % в исходном асците), что подразумевает концентрацию выживших после терапии СИРК.

В клеточном сообществе асцитных раковых клеток существует две дискриминируемые по признаку интернализации TAMRA-меченной ДНК популяции клеток, которые захватывают ДНК-зонд (TAMRA+ клетки) и не захватывают его (TAMRA– клетки). Известно, что TAMRA+ клетки обладают свойствами СИРК (Dolgova et al., 2014; Potter et al., 2016, 2017). Было сделано предположение, что эти две популяции клеток по-разному завершают остановку клеточного цикла в поздней S/G2/M-фазе клеточного цикла. Коммитированные (TAMRA–) раковые клетки разрушаются апоптозом с последующим вторичным некрозом (Alyamkina et al., 2015). Часть эпигенетически экстремально пластичных TAMRA+ СИРК выдерживает терапию. После завершения ареста в поздней S/G2/M клетки выходят из репаративного процесса и стремятся завершить деление. Происходит полная синхронизация всех выживших после проведенной терапии СИРК, и они одновременно входят в первую после ареста G1/S-фазу (как это следует из анализа состояния клеточного цикла и процентного содержания TAMRA+ клеток на 8–9-е сутки от начала обработки).

Было сделано важнейшее заключение, что именно эта точка может позволить нанести завершающий удар по всем оставшимся причинным СИРК Кребс-2. Без финальной обработки через несколько суток происходит естественное расхождение оставшихся раковых клеток, в том числе и СИРК, по фазам клеточного цикла, и СИРК становятся недостижимыми для дополнительной однократной обработки по схеме разрабатываемого терапевтического режима.

В настоящем исследовании предпринята попытка применить найденную стратегию на двух модельных культурах клеток глиобластомы человека. Основная задача состояла в поиске режима обработок, когда совместное действие двух препаратов – кросслинкующего цитостатика и сложнокпозиционного препарата ДНК – приводило бы к полной элиминации СИРК из популяции клеток первичных культур и, как следствие, к разрушению туморогенного потенциала указанных культур клеток.

Материалы и методы

Приготовление суспензии клеток глиобластомы, а также первичных культур из операционного материала. Забор операционного материала и все последующие исследования проводили после получения письменного информированного согласия пациентов. Суспензию клеток глиобластомы получали из фрагмента ткани опухоли, взятого во время хирургической операции у больных К. (жен., 61 г., диагноз: рецидив глиобластомы, теменная и затылочная доли левого полушария) и Ж. (жен., 60 лет, диагноз: рецидив глиобластомы, лобная и теменная доли левого полушария). Ткань опухоли механически измельчали с помощью скальпеля, затем дважды отмывали в

фосфатном буфере (PBS). Далее опухолевый материал инкубировали в течение 30 мин в 0.1 % растворе коллагеназы (тип IA, Sigma-Aldrich) при 37 °С. Через 30 мин добавляли среду DMEM (Gibco) с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой (HyClone) и затем промывали этой же средой один раз. Клетки помещали в культуральный флакон. Через 5–7 сут неприкрепленные к пластику клетки переносили в свежий флакон и культивировали еще 3–5 дней в DMEM, дополненной 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. Затем окончательно неприкрепленные к пластику клетки удаляли. Фракцию адгезивных клеток во всех флаконах продолжали вести до покрытия клетками 70–80 % площади флакона с полной заменой культуральной среды один-два раза в неделю.

Получение меченого TAMRA-dUTP-5'-ДНК зонда. Мечение *Alu*-повтора человека флуорофором проводили при помощи ПЦР, как описано в работе (Dolgova et al., 2014). В качестве матрицы использовали клонированную в плазмиде pUC19 последовательность *Alu*-повтора человека (AC002400.1, 53494-53767), которая состоит из конечной и начальной частей двух tandemно расположенных повторов: *AluJ* и *AluY*. В качестве праймеров использовали стандартные M13-праймеры. От невключившихся нуклеотидов избавлялись переосаждением ДНК.

Сложнокпозиционный препарат двуцепочечной ДНК. Подробная информация о составе и способе приготовления композиционного препарата ДНК представлена в разделе «Материалы и методы» в работе (Alyamkina et al., 2015).

Анализ TAMRA+ клеток в первичных культурах клеток глиобластомы. Клетки рассаживали в чашки Петри (диаметр 3.5 см). Прикрепленные клетки промывали PBS, в чашку Петри добавляли среду без сыворотки, *Alu*-ДНК, в количестве 0.5 мкг/мл, инкубировали 20 мин, затем – ядерный краситель Hoechst (Termo Fisher Scientific) и инкубировали еще 15 мин. Клетки анализировали при помощи инвентированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (Zeiss) и программы ZEN. В каждой точке проанализировано 2000–4000 клеток.

Анализ репарации двуцепочечных разрывов. Культуру клеток глиобластомы человека в 24-луночном планшете инкубировали с 10–20 мкг/мл митомицина С (ММС) (Sigma-Aldrich) в среде DMEM без сыворотки при 37 °С в течение одного часа. После инкубирования с цитостатиком клетки промывали средой с сывороткой, добавляли свежую среду DMEM, дополненную 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, и инкубировали в CO₂-инкубаторе. Каждые 6 ч клетки отбирали и заливали в блоки с легкоплавкой агарозой. Блоки застывали при 4 °С, затем их переносили в 0.5 М ЭДТА. Перед нанесением на электрофорез блоки отмывали в TE-буфере, переносили в лизирующий буфер (1 % лаурилсаркозил, 50 мМ ЭДТА, протеиназа К 1 мг/мл), лизировали блоки при 50 °С в течение 15 мин. Электрофорез блоков проводили в течение 30 мин, 0.75 В/см в трис-ацетатном буфере с добавлением бромистого этидия. Затем блоки высушивали и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager (Zeiss) и программы ISIS. Анализ содержания двуцепочечных разрывов (ДЦР) проводили с использованием параметра «хвостовой момент» (tail moment, TM) (TM = дли-

на хвоста кометы × процентное содержание ДНК в кометном хвосте) в программе CASP (Wang et al., 2013).

Анализ синхронизации клеток после обработки цитостатиком. Культуры клеток человеческой глиобластомы обрабатывали цитостатиком MMC 20 мкг/мл трехкратно через каждые 36 ч. Для этого культуру клеток глиобластомы человека инкубировали с 20 мкг/мл MMC в среде DMEM без сыворотки при 37 °C в течение одного часа. После инкубирования с цитостатиком клетки промывали средой с сывороткой, добавляли свежую среду DMEM, дополненную 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, и инкубировали в CO₂-инкубаторе. До обработки цитостатиком и на 4–7-е сутки с момента первой обработки клетки отбирали на анализ TAMRA+ клеток.

Обработка культур клеток человеческой глиобластомы К. и Ж. цитостатиком и препаратом ДНК, подсчет абсолютного количества TAMRA+ клеток. Клетки рассадили в чашки Петри (3.5 см) по 185 тыс. для культуры К. и 200 тыс. для Ж. В прикрепленном виде клетки обрабатывали MMC и препаратом ДНК. Клетки промывали PBS, помещали в среду без сыворотки с добавлением либо цитостатика MMC (20 или 10 мкг/мл), либо препарата ДНК (0.5 мкг/мл). Обработку проводили в течение одного часа. Затем клетки промывали PBS и помещали в среду DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. В контрольные точки из каждой группы забирали по чашке Петри и считали в ней процентное содержание TAMRA+ клеток, как это описано выше. Затем клетки снимали трипсином/ЭДТА и считали их количество (*N*) в камере Горяева. Абсолютное количество TAMRA+ клеток (*X*) считали по формуле $X = N \times (\% \text{ TAMRA+ клеток}) / 100$.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили при помощи программы Statistica 10. На графиках приведены стандартные отклонения, а также доверительные интервалы ($p < 0.01$). Достоверность полученных результатов в случае сравнения доли TAMRA+ клеток оценивали при помощи критерия χ^2 с учетом поправки Йетса. При сравнении значений хвостового момента (ТМ) достоверность оценивали при помощи критерия Манна–Уитни.

Результаты

Базовые индикаторы разрабатываемой стратегии и экспериментальный дизайн для их оценки на модели первичных культур глиобластомы человека. Исходя из основных положений новой стратегии синхронизации и эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток «3+1», был разработан экспериментальный дизайн, состоящий из следующих стадий:

- 1) обнаружение и демонстрация TAMRA+ клеток в анализируемых культурах;
- 2) анализ цикла репарации межцепочечных сшивков (МЦС) при однократном введении цитостатика MMC. Поскольку работающий в экспериментах *in vivo* кросслинкирующий цитостатик циклофосфан в случае культур клеток был не пригоден (циклофосфан индуцирует МЦС за счет действия метаболита, фосфорамид мустарда, образующегося в печени), в экспериментах на культурах клеток мы предложили использовать MMC, который непосредственно индуцирует МЦС в ДНК клеток;

- 3) разработка схемы терапии цитостатиком и препаратом двуцепочечной ДНК на основании анализа фаз репаративного цикла;
- 4) анализ клеточного цикла в культурах, прошедших терапию цитостатиком по разработанной схеме. Оценка количества TAMRA+ клеток на протяжении 12 сут после трехкратной обработки цитостатиком, что необходимо для выявления точки финального применения терапии MMC+ДНК;
- 5) терапевтическая обработка на основании режима «3+1». Анализ на протяжении последующих 30 сут общего количества раковых клеток и количества TAMRA+ клеток, переживших обработку.

Характеристика клеточных культур глиобластом человека и оценка наличия в них TAMRA+ СИРК. Первичные культуры глиобластомы человека пациентов Ж. и К. представлены хорошо прикрепленными к поверхности культуральной посуды клетками, которые никогда в экспериментальных условиях не образуют нейросферы (рис. 1, а). Нам не удалось получить опухоли при трансплантации клеток обеих культур в желудочки мозга иммунодефицитным мышам NOD/SCID (данные не представлены), поэтому все эксперименты с этими культурами проводились *ex vivo*.

Первоначально было необходимо продемонстрировать наличие СИРК в культурах глиобластом человека. Процентное содержание СИРК в культурах оценивали как долю клеток, способных поглощать двуцепочечную ДНК, меченную красителем (см. рис. 1, а). Для культуры Ж. процентное содержание TAMRA+ клеток составило $0.64 \pm 0.22 \%$, для культуры К. – $2.46 \pm 0.61 \%$ (см. рис. 1, б). Таким образом, мы подтвердили наличие в культурах глиобластомы человека СИРК, способных к поглощению двуцепочечной ДНК, которые, по нашему мнению, должны являться основной мишенью противораковой терапии (Dolgova et al., 2018).

Анализ временных параметров репарации двуцепочечных разрывов ДНК в культурах клеток человеческой глиобластомы К. и Ж. после воздействия цитостатика. Ранее в экспериментах *in vivo* использовался кросслинкирующий цитостатик циклофосфан. В результате метаболизма циклофосфана в клетках паренхимы печени образуется метаболит фосфорамид мустард, молекулы которого интеркалируют между цепей ДНК хромосом и формируют МЦС. Клетка немедленно приступает к репарации индуцированного повреждения. Репарация МЦС протекает в две стадии. В первой фазе репарации происходит остановка репликации и удаление кросслинка (фаза NER), во второй фазе – восстановление репликативной вилки в результате гомологичной рекомбинации. Первая фаза характеризуется накоплением ДЦР, вторая – их удалением (Niedernhofer et al., 2004). По этому признаку, хорошо детектируемому или методом комет, или антителами к гистону $\gamma\text{H}_2\text{AX}$, определяется граница двух фаз репаративного процесса. Поскольку работа проводилась на культурах клеток, в качестве кросслинкирующего агента был выбран MMC, который часто используется в стандартных циторедуктивных терапиях и так же, как циклофосфан, индуцирует формирование МЦС, но, однако, не требует активации метаболитами

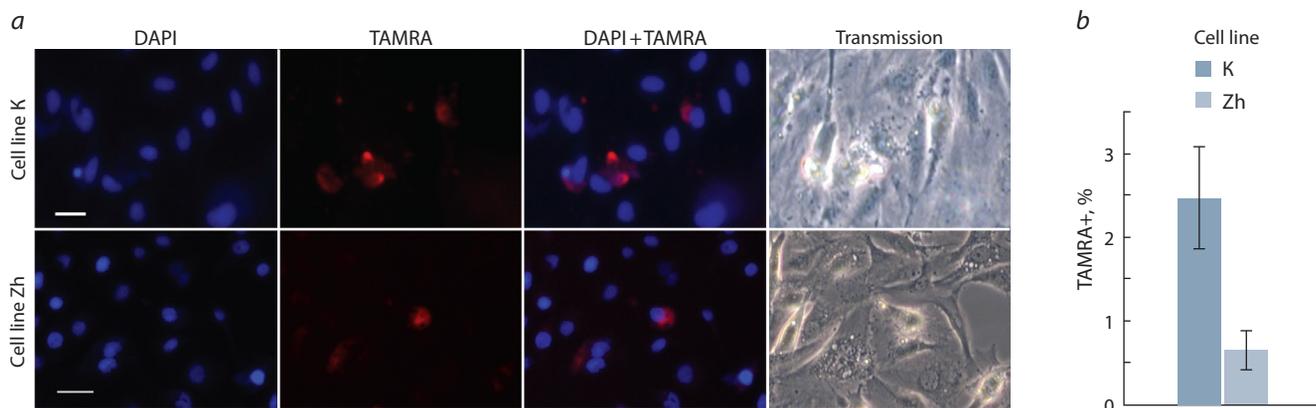


Fig. 1. TAMRA+ cell detection in primary human glioblastoma cell lines K and Zh obtained from surgical material. (a) Cytological images, DAPI chromatin staining, TAMRA exogenous DNA probe. Scale bar 20 μ m. (b) Percentages of TAMRA+ cells in cultures. Standard deviation is shown.

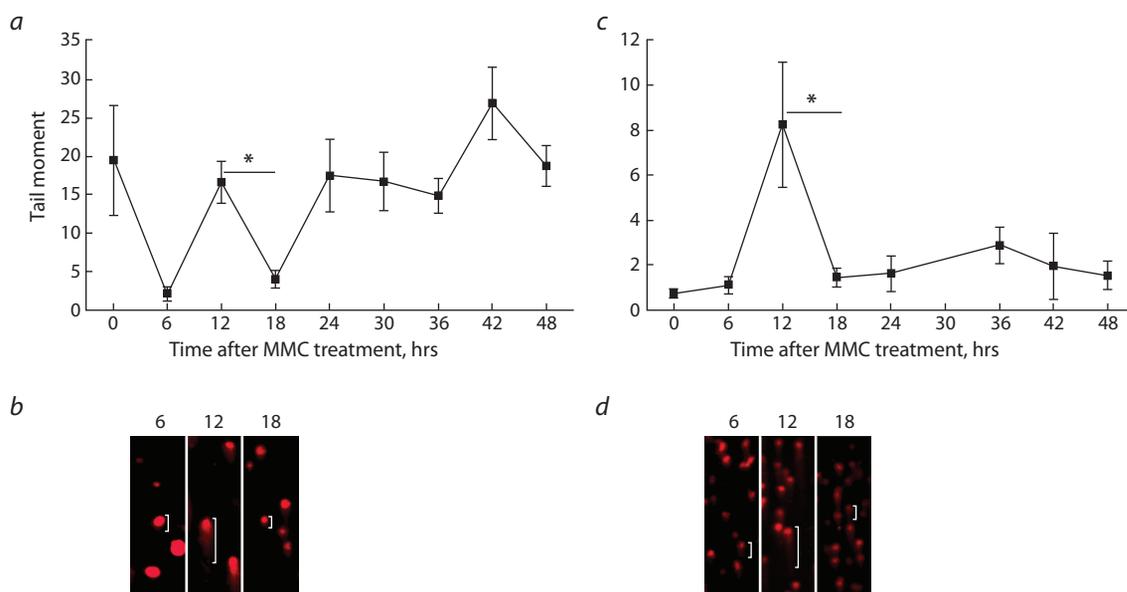


Fig. 2. Analysis of double-stranded break formation induced by mitomycin C and their repair in primary human glioblastoma cells. (a) Double-stranded break repair in cell line Zh. (b) Comet tails 6, 12, 18 h after mitomycin C treatment of cell line Zh. (c) Double-stranded break repair in cell line K. (d) Comet tails 6, 12, and 18 h after mitomycin C treatment of cell line K. Differences between points are significant at $p < 0.001$ (Mann-Whitney test). Confidence intervals ($p < 0.01$) are shown. White brackets in (b) and (d) indicate the mean size of cells with comet tails estimated with CASP software.

системами организма. Поскольку МЦС, индуцированные любым агентом, удаляются одной и той же репаративной системой, считалось, что результаты по временным параметрам репарации МЦС, вызванных циклофосфаном, будут аналогичными для любого другого цитостатика (например, ММС) в применении к данной клеточной модели в условиях, адекватных специфическому действию цитостатика. Таким образом, проведен анализ временных параметров репаративного цикла первичных культур клеток человеческой глиобластомы К. и Ж. после воздействия цитостатика ММС (рис. 2). Оказалось, что максимум

образования ДЦР у обеих клеточных линий приходится на 12 ч с момента обработки ММС ($p < 0.001$). Для культуры К. были проанализированы дополнительные точки и отмечен второй пик, приходящийся на 36 ч ($p < 0.001$ относительно нулевой точки).

Анализ распределения клеток первичной линии глиобластомы К. по клеточному циклу после воздействия цитостатика митомидина С. Анализ синхронизации клеток в определенной фазе клеточного цикла оказался малоинформативным и сложно интерпретируемым (данные не приводятся). Сложность оценки полученных

результатов состояла в следующем. Клетки обеих культур после обработки цитостатиком ММС плохо делились, что затрудняло наработку достаточного количества клеток, необходимого для полномасштабной оценки. В результате апоптотической деструкции в G2/M-фазе остатки деградированных клеток по уровню интенсивности флуоресценции пропидия йодида распределяются по всем фазам клеточного цикла, искажая реальную картину событий. Кроме этого, при масштабном апоптозе, индуцированном обработками, возникают технические проблемы в оценке клеточного цикла в связи с минимальным остаточным количеством клеток.

Поскольку главным событием, необходимым для успешной терапии, является определение момента синхронизации TAMRA+ клеток в чувствительной фазе клеточного цикла (G1/S), было решено для определения точки финальной обработки использовать именно этот признак.

Анализ синхронизации TAMRA+ клеток в культурах К. и Ж. при обработке цитостатиком митомицином С. Для успешной элиминации всех СИРК из опухолевой массы недостаточно обработок цитостатиком или цитостатиком совместно с экзогенной ДНК, перекрывающих цикл репарации СИРК. Оставшиеся после базовой терапии цитостатиком и препаратом двуцепочечной ДНК СИРК, которые в силу нахождения в нечувствительной к действию препаратов G2/M-фазе клеточного цикла не попали под воздействие препаратов, впоследствии станут причиной развития рецидива (Potter et al., 2016). Для того чтобы удалить эти клетки, необходимо найти момент, когда СИРК будут синхронизованы в G1/S-фазе клеточного цикла, чтобы в эту терапевтическую временную точку провести дополнительную обработку препаратами.

Анализ распределения всей массы клеток по фазам клеточного цикла не в полной мере подходит для определения степени синхронизации СИРК, поскольку, как показали ранние исследования (Potter et al., 2016), пик количества (аккумуляция) СИРК после базовой терапии определяется на один-два дня раньше, чем полная синхронизация всех оставшихся после базовой терапии клеток в G1/S-чувствительной фазе клеточного цикла. Определение в одном эксперименте для перевиваемых культур глиобластом К. и Ж. динамики клеточного цикла и аккумуляции TAMRA+ клеток оказалось технически невозможным. В связи с этим было решено принять за финальную точку терапии день максимальной аккумуляции TAMRA+ клеток.

С использованием стандартизованного во многих наших публикациях меченого ДНК-зонда (*Alu*-фрагмент человека) (Dolgova et al., 2014; Potter et al., 2016) было оценено время аккумуляции TAMRA-позитивных клеток, или TAMRA+ клеток (очевидно, СИРК), в образцах культур человеческой глиобластомы К. и Ж. на фоне обработки цитостатиком. Для этого клетки были обработаны ММС и в определенных точках проведен анализ содержания TAMRA+ клеток.

Исходя из двух пиков образования и репарации ДЦР (см. рис. 2), был подобран следующий режим обработки ММС: обработка цитостатиком в 0 и 18 ч (20 мкг/мл) и 27, 36, 54 и 63 ч (10 мкг/мл) с момента первой обработки (рис. 3, а). При таком режиме, во-первых, в точках 0, 18, 36, 54 перекрываются фазы репаративного процесса для

всех основных популяций клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла; во-вторых, в точках 27 и 63 блокируются клетки, формирующие неожиданный второй пик (результаты дополнительных экспериментов, данные не приводятся). Так как, по нашему мнению, для успешной терапии было необходимо добавить две дополнительные обработки цитостатиком (в 27 и 63 ч), то в близлежащих точках обработки цитостатиком (36 и 54 ч соответственно) концентрация митомицина С была снижена вдвое (10 мкг/мл), в сумме набиралась исходно используемая доза 20 мкг/мл. Анализ содержания TAMRA+ клеток проводился на 3–8-е сут с момента обработки цитостатиком.

Был найден момент синхронизации TAMRA+ клеток, когда их количество значительно возрастает (см. рис. 3, б). Для культуры К. синхронизация приходится на 5-е сут, когда количество TAMRA+ клеток увеличивается в два раза (с 1.41 до 2.89 %). Для культуры клеток Ж. была обнаружена следующая картина изменения количества позитивных клеток: на 5-е сут количество TAMRA+ клеток возрастает в четыре раза (с 1.47 до 5.88 %); На 7-е сут количество TAMRA+ клеток повышается до 9.55 % (в 6.5 раз от исходного). Такой результат мог быть объяснен двумя предположениями. Во-первых, изменение числа позитивных клеток соответствует реальной картине синхронизации этого типа клеток на 7-е сут наблюдения. Второе объяснение эффекта следующее: TAMRA+ клетки достигли максимальной синхронизации на 5-е сут эксперимента. На 6-е сут их количество сохранилось, поскольку они были арестованы в одной фазе клеточного цикла. На 7-е сут произошла массовая апоптотическая деградация этих клеток (СИРК). Образованные апоптотические везикулы первой волны апоптотического распада еще сохранили на своей поверхности факторы интернализации, а внутреннего свободного объема везикулы еще достаточно для интернализации экстраклеточного ДНК-зонда. Это явление и вызвало возрастание детектируемого позитивного материала. По нашим многочисленным наблюдениям, апоптотические частицы первой волны разрушения клетки по размеру нечетко отличаются от целых раковых клеток и при условии захвата ДНК-зонда могут определяться как целые клетки, содержащие маркер. Этот механизм будет приводить к искажению результатов подсчета.

Таким образом, были проведены все подготовительные эксперименты для разработки режима терапии клеток глиобластомы человека цитостатиком ММС и препаратом экстраклеточной двуцепочечной ДНК. Проанализирован цикл репарации ДЦР в клетках. Показано, что клетки синхронизируются в определенной фазе клеточного цикла при обработке цитостатиком. Определено время, когда происходит аккумуляция TAMRA+ клеток. Полученные данные позволили провести оценку эффективности найденного терапевтического режима на клетках глиобластомы человека.

Обработка культур клеток человеческой глиобластомы К. и Ж. цитостатиком митомицином С и препаратом ДНК в режиме, направленном на эрадикацию СИРК (TAMRA+ клеток). Для оценки эффективности воздействия терапевтического режима на клетки культуры глиобластомы К. и Ж. были выбраны два параметра: количество прикрепленных клеток (влияние на жизнеспособность)

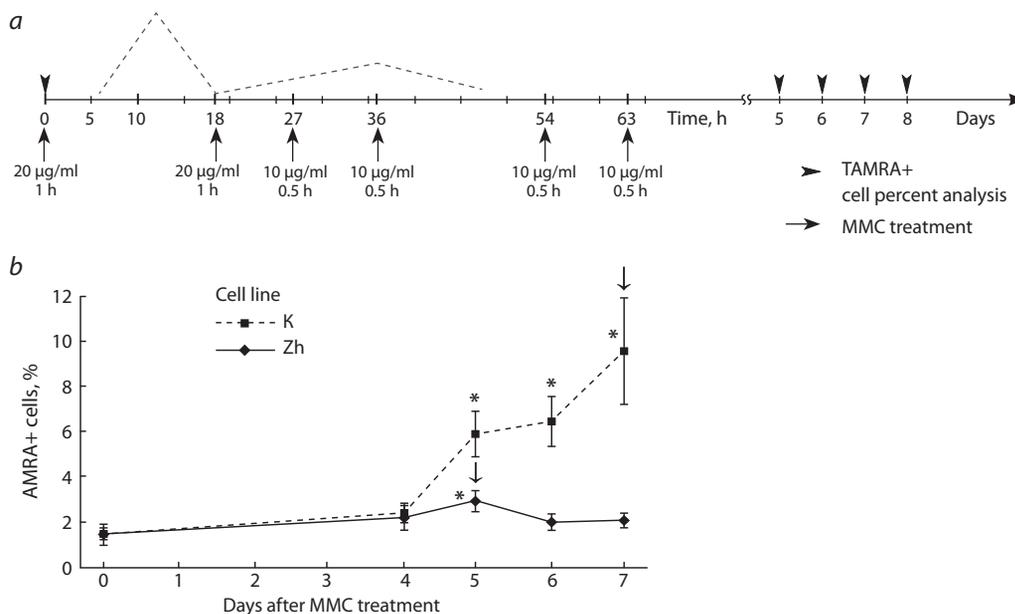


Fig. 3. Analysis of TAMRA+ tumor-initiating stem cell presence in human glioblastoma cell lines K and Zh upon cytostatic mitomycin C treatment.

(a) Points of MMC treatment and TAMRA+ analysis. The dashed curve shows the course of DSB formation and repair after MMC treatment. (b) TAMRA+ cell quantities in cell lines K (solid curve) and Zh (dashed curve) after MMC treatment. Standard deviations are shown. * $p < 0.001$ in comparison with the zero point (Chi-square test).

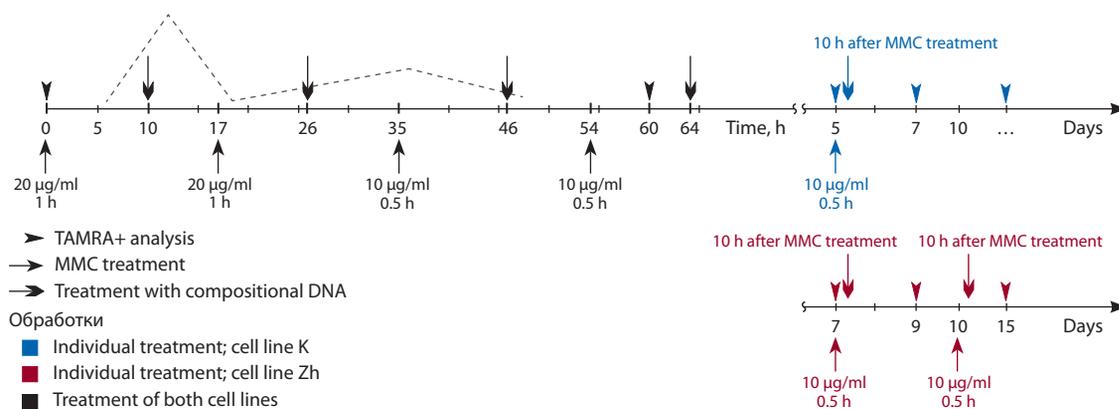


Fig. 4. In vitro mitomycin C and compositional DNA preparation treatment of human glioblastoma cell lines K and Zh Individual treatments of cultures: blue arrows, cell line K; red arrows, cell line Zh.

способность) и количество TAMRA+ клеток (оценка воздействия на СИРК).

На основании результатов анализа репаративного и клеточного цикла для культуры клеток K. был разработан следующий график обработок цитостатиком MMC и композиционным препаратом двуцепочечной ДНК (рис. 4).

Обработку цитостатиком проводили в 0 и 17 ч (20 мкг/мл в течение одного часа) и в 35, 54 ч и на 5-е сут с момента

начала терапии (10 мкг/мл в течение 30 мин). Препаратом двуцепочечной ДНК обрабатывали в количестве 0.5 мкг в течение 40 мин в 10, 26, 46 и 64 ч с момента первой обработки цитостатиком и на 5-е сут через 10 ч после обработки MMC. Как видно из схемы обработки препаратами на рис. 4, точкой для последней обработки MMC+ДНК являлась обработка на 5-е сут в момент аккумуляции TAMRA+ СИРК, необходимая для полной элиминации указанных клеток.

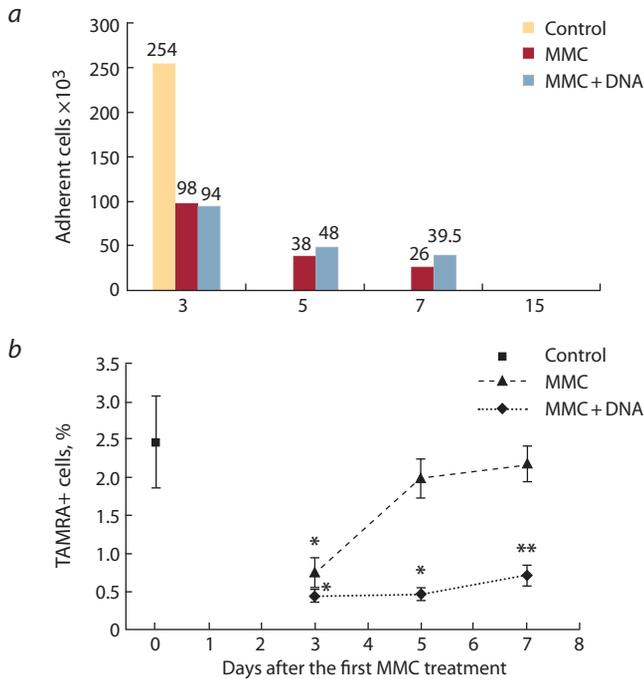


Fig. 5. Quantitative analysis of adherent cells and TAMRA+ cells of human glioblastoma cell line K following mitomycin C and compositional DNA preparation treatments.

(a) Numbers of adherent cells on days 3, 5, 7, and 15 after the first mitomycin C treatment. (b) Percentage of TAMRA+ cells. Standard deviations are indicated. The confidence of the results in comparison with the reference value is estimated by the Chi-square test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$

В процессе проведения эксперимента проанализировано три группы: контроль – интактные клетки, которые не подвергались обработке; MMC – группа, которую обрабатывали только цитостатиком по схеме, указанной на рис. 4; MMC + ДНК – группа, которую обрабатывали цитостатиком MMC совместно с композиционным препаратом ДНК. Клетки были рассажены в чашки Петри (3.5 см в диаметре) в количестве 185 тыс./чашку; все чашки в группах обрабатывали параллельно. На 3, 5, 7-е сут с момента первой обработки MMC по одной чашке Петри из каждой группы брали для анализа TAMRA+ и общего количества жизнеспособных клеток.

Уже к 3-м сут эксперимента количество клеток в контрольной группе возросло до 254 тыс. (в 1.4 раза). В группах MMC и MMC+ДНК количество клеток постепенно снижалось. Так, к 7-м сут в образцах детектировалось 26 тыс. (MMC) и 39.5 тыс. (MMC+ДНК) клеток, что соответствует падению количества клеток от исходного в 7.1 и 5 раз соответственно. К 31-м сут клетки практически не детектируются. В чашках Петри можно «уловить» только единичные клетки, многие из которых находились в открепленном состоянии. Определить значимое детектируемое количество прикрепленных жизнеспособных клеток оказалось невозможным (рис. 5, а).

Проведена сравнительная количественная оценка TAMRA+ клеток (см. рис. 5, б). Изначально в культуре клеток процентное содержание TAMRA+ клеток состав-

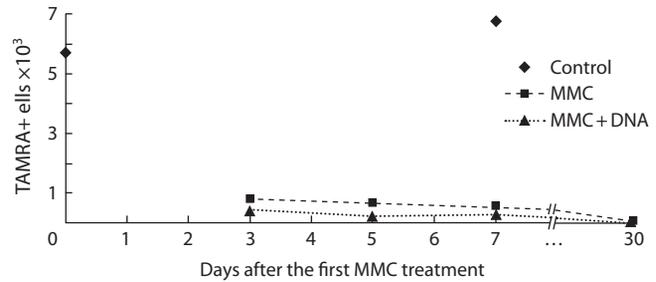


Fig. 6. Absolute numbers of TAMRA+ cells found in human glioblastoma cell line K upon mitomycin C or combined treatment with mitomycin C and compositional DNA.

No cells are detectable by day 30; apparently, the number of TAMRA+ cell has reduced to zero.

ляло 2.46 ± 0.61 %, и это количество с течением времени оставалось в пределах ошибки. После начала обработок (на 3-и сут) процентное содержание TAMRA+ клеток достоверно ($p < 0.001$) снижается в обеих группах: до 0.75 ± 0.19 % в группе MMC и до 0.44 ± 0.08 % в группе MMC + ДНК. Затем количество TAMRA+ клеток начинает возрастать. На 5-е сут процентное содержание TAMRA+ клеток в группе MMC составляет 1.98 ± 0.25 % и на 7-е сут 2.17 ± 0.23 %, что достоверно не отличается от контроля. В группе MMC + ДНК количество TAMRA+ клеток составляет 0.47 ± 0.08 % на 5-е сут и 0.71 ± 0.14 % на 7-е сут, такие значения достоверно ($p < 0.001$ и $p < 0.01$ соответственно) ниже, чем в контроле.

Мы проанализировали динамику абсолютного количества позитивных клеток и выяснили следующую закономерность. По ходу проведенной терапии абсолютное количество СИРК (TAMRA+) неуклонно падает. К 7-м сут наблюдается их минимальное количество, хотя в процентном отношении произошло увеличение относительного количества TAMRA+ клеток. Такая картина может свидетельствовать об их аккумуляции. Динамика абсолютного количества TAMRA+ клеток приведена на рис. 6. Полученные данные свидетельствуют, что используемая терапия снижает абсолютное количество TAMRA+ клеток как в случае обработки одним MMC, так и при синергичном действии MMC и ДНК. Следует отметить, что эффективность синергичного действия в два раза выше, чем обработка цитостатиком в режиме монотерапии. При начальном количестве СИРК, равном ~5000 клеток, на 7-е сут наблюдения абсолютное количество + СИРК при обработке MMC падает до ~500 (в 10 раз), а при синергичной обработке MMC и ДНК до 250 (в 20 раз). Сравнивая снижение количества СИРК с уменьшением общего количества клеток в образце, можно заключить, что добавление в терапию сложнокосмопозиционного препарата ДНК существенно увеличивает эффективность элиминации СИРК ($K_{\text{выж}} = 0.71$ для MMC, $K_{\text{выж}} = 0.25$ для MMC+ДНК). Учитывая тот факт, что к 30-м сут наблюдения популяция глиобластомных клеток К. полностью элиминируется, можно заключить, что примененный режим полностью соответствует всем ранее определенным

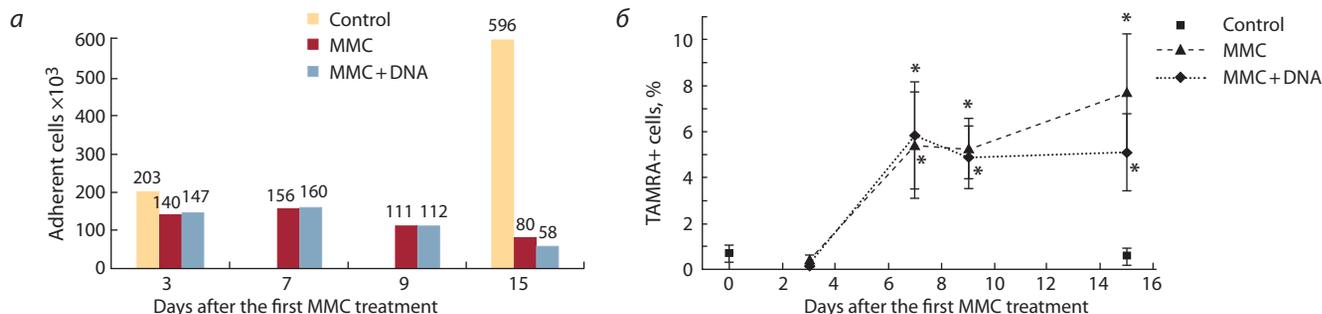


Fig. 7. Quantitative analysis of adherent cells and TAMRA+ cells of human glioblastoma cell line Zh after treatments with mitomycin C and compositional DNA.

(a) Numbers of adherent cells on days 3, 5, 7, and 15 after the first mitomycin C treatment. (b) Percentage of TAMRA+ cells. Standard deviations are indicated. The confidence of the results in comparison with the reference value is estimated by the Chi-square test, * $p < 0.001$.

реперным параметрам и демонстрирует высокий уровень эффективности.

Непрямолинейные изменения процентного отношения TAMRA+ клеток связаны с тем, что при проведенном анализе накладываются два взаимоисключающих друг друга процесса, определяющих относительное количество TAMRA+ СИРК, а именно элиминация указанных клеток и процесс увеличения их процентного отношения к уменьшающемуся числу клеток.

В связи с тем, что графики репарации ДЦР культур клеток глиобластомы К. и Ж. были аналогичны, для культуры клеток Ж. была использована такая же схема обработок цитостатиком MMC и композиционным препаратом экзогенной двуцепочечной ДНК, за исключением последних обработок, которые производились в момент аккумуляции TAMRA+ клеток на 7-е и 10-е сут (см. рис. 4). Дополнительная обработка на 10-е сут была добавлена на случай, если при оценке синхронизации TAMRA+ клеток (см. рис. 3), мы не захватили максимум TAMRA+ клеток на 7-е сут.

В процессе проведения эксперимента, как и в случае культуры К., было проанализировано три группы (контроль; MMC и MMC+ДНК) по схеме, показанной на рис. 4). Клетки рассадили по чашкам Петри (3.5 см в диаметре) в количестве 200 тыс./чашку, все чашки в группах обрабатывали параллельно. На 3, 5, 7 и 15-е сут с момента первой обработки MMC по одной чашке Петри из каждой группы брали для анализа TAMRA+ клеток и общего количества жизнеспособных клеток (рис. 7, а, б).

К 3-м сут количество клеток в контрольной группе практически не изменялось и составило 203 тыс., что может говорить о низкой скорости пролиферации данной культуры. В группах MMC и MMC+ДНК количество клеток постепенно снижалось. Так, к 7-м сут остается 156 тыс. (MMC) и 160 тыс. (MMC+ДНК) клеток, т.е. от исходного уровня их количество падает в 1.3 и 1.25 раза. На 9-е сут количество клеток составляло 111 тыс. и 112 тыс. (ниже начального уровня в 1.8 раз в обеих группах). На 15-е сут в контроле количество клеток достигает 596 тыс., в группе MMC – 80 тыс., в группе MMC+ДНК – 58 тыс. Происходит явная терапевтическая деградация культуры,

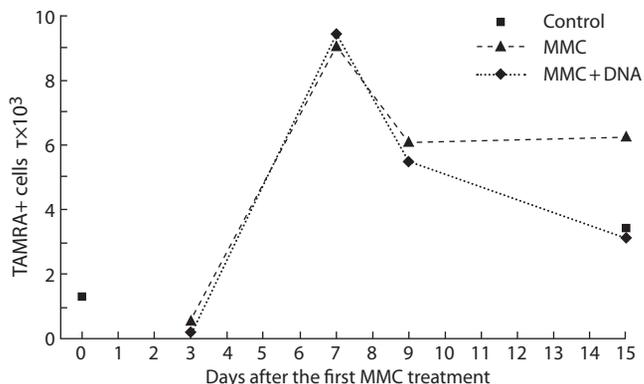


Fig. 8. Absolute numbers of TAMRA+ cells found in human glioblastoma cell line Zh upon mitomycin C or combined treatment with mitomycin C and compositional DNA.

свидетельствующая об эффективности проведенных обработок (см. рис. 7, а).

Неожиданным оказался анализ количественной оценки TAMRA+ клеток (см. рис. 7, б). Изначально в культуре клеток процентное содержание TAMRA+ клеток составляло $0.67 \pm 0.37 \%$, это количество с течением времени достоверно не изменялось. На 15-е сут насчитывалось $0.55 \pm 0.36 \%$ указанных клеток. После начала обработок (на 3-и сут) количество TAMRA+ клеток в образцах MMC достоверно не упало и составило $0.40 \pm 0.21 \%$. В группе MMC+ДНК показатель снизился до $0.17 \pm 0.03 \%$. Во всех последующих точках количество TAMRA+ клеток резко возрастает и держится на уровне достоверно выше контроля ($p < 0.001$). Так, на 5-е сут количество TAMRA+ клеток составляет $5.41 \pm 2.34 \%$ (MMC) и $5.82 \pm 2.33 \%$ (MMC+ДНК). Впоследствии уровень TAMRA+ клеток продолжает незначительно повышаться в группе MMC (до $7.68 \pm 2.55 \%$) и незначительно понижаться в группе MMC+ДНК (до $5.09 \pm 1.67 \%$).

Оценка абсолютного количества TAMRA+ клеток на 15-е сут эксперимента показала следующие значения (рис. 8): в группе MMC количество TAMRA+ клеток составило ~6000; для группы MMC+ДНК ~3000 клеток. При

этом в контрольной группе абсолютное количество клеток составило ~3500, хотя исходно абсолютное количество составляло ~1300 клеток. Повышение абсолютного количества TAMRA+ СИРК при увеличении всей популяции раковых клеток и сохранении процентного содержания этих клеток по отношению к увеличившейся массе раковых клеток согласуется с нашими ранними экспериментами (Поттер и др., 2016; Potter et al., 2016). В указанных работах приводится концепция, что TAMRA+ клетки являются «клетками-операторами», формирующими регуляторный цитокиновый профиль, и их физиологическое количество постоянно и находится в пределах 0.5–3 % от общей массы клеток. Таким образом, в контроле произошло естественное увеличение СИРК-операторов до количества, необходимого для организации клеточного сообщества. В исходной популяции процентное содержание TAMRA+ клеток составляло ~0.65 %, в конечной точке измерения ~0.6 %.

Обнаруженное увеличение как процентного содержания, так и абсолютного количества TAMRA+ СИРК можно объяснить несколькими предположениями. Во-первых, мы неправильно определили базовые параметры терапии, что обусловило воздействие, но не эрадикацию этого типа клеток. Восстановившись после не вполне эффективной терапии, клетки начали симметрично делиться, чтобы восстановить потерянную клеточную массу, это сопровождалось увеличением их количества. Второе объяснение заключается в том, что мы детектируем и считаем апоптотические клеточные деграданты, которые ассоциируют с ДНК. На этот факт может указывать как сопоставление цитологической картины клеток (мелкие хроматинсодержащие везикулярные структуры) и локализации TAMRA-меченного материала, так и то, что общее количество клеток как для режима ММС, так и для режима ММС+ДНК значительно падает до 80 и 58 тыс. соответственно, что свидетельствует об элиминирующем воздействии терапии. Третье объяснение феномена заключается в том, что все оставшиеся способные захватывать ДНК-зонд СИРК культуры клеток Ж. продолжают попадать под условия ареста клеточного цикла и накапливаться в деградирующей популяции клеток глиобластомы. При этом четко наблюдается таргетное воздействие на TAMRA+ СИРК двух препаратов, работающих одновременно. В процессе анализа на 3-и сут оказалось, что процентное содержание этих клеток в образцах ММС не упало и составило 0.40 ± 0.21 %, тогда как в группе ММС+ДНК показатель упал до значения 0.16 ± 0.03 %. В количественном выражении это составило 550 для ММС (в 2.4 раза меньше, чем TAMRA+ СИРК в контроле) и 235 клеток для ММС+ДНК (в 5.5 раза меньше исходного). Полученный результат показывает, что преимущественное и первоочередное воздействие терапия оказала на TAMRA+ СИРК. Оценка TAMRA+ материала на 15-е сут эксперимента, несмотря на сложность интерпретации, продемонстрировала, что в образцах ММС+ДНК количество детектируемого TAMRA+ материала в два раза меньше, чем для варианта ММС. Это также свидетельствует о большей эффективности синергичной терапии для культуры Ж. Коэффициенты выживаемости СИРК для используемой терапии составляют: ММС $K_{\text{выж}} = 35.5$, что интерпретируется как

накопление этих клеток; для ММС+ДНК $K_{\text{выж}} = 23.95$, это также свидетельствует об увеличении числа TAMRA+ клеток, но с эффективностью на 30 % меньше.

Обсуждение

В настоящем исследовании проведена оценка эффективности применения терапевтического режима «3+1» (Potter et al., 2016) в адаптированной форме для первичных культур глиобластомы человека К. и Ж., полученных в Новосибирском научно-исследовательском институте травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна и культивируемых в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН. Дополнительно была оценена эффективность действия кросслинкирующего цитостатика в форме монопрепарата в адаптированном для первичных культур режиме «3+1» или «5+1». Ранее было показано, что обработка кросслинкирующим цитостатиком в режиме «накладывающихся арестов» клеточного цикла приводит к увеличению средней продолжительности жизни экспериментальных животных в шесть-семь раз (Potter et al., 2016). Если такой эффект имеет общебиологическую основу, то парадигма режимов введения циторедуцирующих препаратов может быть скорректирована. Такая коррекция предполагает привязку режимов введения цитостатиков к циклу репарации МЦС популяции клеток-мишеней.

Показано, что адаптированный к культурам режим «3+1» приводит к эффективной терапевтической деградации обеих клеточных популяций. К 30-м сут для культуры К. жизнеспособных клеток, как коммитированных, так и TAMRA+ СИРК, в культуральной среде практически не обнаруживается. Для культуры Ж. анализ был проведен до 15-х сут от начала эксперимента. Для этой культуры также показано существенное снижение общего количества клеток в экспериментальных точках. При этом в контроле клетки успешно размножались. Важно отметить, что, несмотря на общее истощение популяции культур клеток, количество СИРК в обеих культурах меняется непрямолинейно как в образцах, обработанных одним ММС, так и ММС+ДНК. Результаты свидетельствуют о синергичном таргетном действии ММС+ДНК на СИРК (TAMRA+). Тем не менее один ММС в режиме «накладывающихся арестов» клеточного цикла также эффективно действует на раковые клетки в целом, без акцента на СИРК (TAMRA+).

Проведенная оценка свидетельствует о том, что найденный режим и стратегический поход в определении индикаторных точек режима в целом были определены правильно и терапевтически эффективны. Вместе с тем в ходе экспериментов появились неожиданные факты относительно поведения TAMRA+ СИРК, которые требуют дальнейшего анализа и определения истинных причин возникших отклонений от ожидаемого результата.

Неудачные попытки интрацеребральной трансплантации предполагают изменение экспериментального дизайна в случае культур клеток глиобластомы человека и, по-видимому, других культивируемых *ex vivo* клеточных сообществ. Предполагается в случае планирования экспериментов по оценке эффективности проведенных процедур по графтингу обработанных *ex vivo* клеток предварительно анализировать способность этой культуры да-

вать уверенные трансплантаты. Это необходимо для положительного контроля в последующих экспериментах.

Acknowledgments

The authors are grateful to the staffs of the Shared Access Center for Microscopy of Biologic Objects, SB RAS; Shared Access Center for Flow Cytometry, SB RAS; and the Sector of Cell Technologies, Institute of Cytology and Genetics, for access to the equipment.

The authors thank V.A. Rogachev for preparation of cross-linked salmon sperm DNA, a component of the compositional DNA. This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0019 and the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-03386.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Никифорова З.Н., Кудрявцев И.А., Арнощкая Н.Е., Брюховецкий И.С., Шевченко В.Е. Опухолевые стволовые клетки мультиформной глиобластомы. Усп. молекуляр. онкологии. 2016;3:26-33. DOI 10.17650/2313-805X-2016-3-2-26-33. [Nikiforova Z.N., Kudryavtsev I.A., Arnotskaya N.E., Bryukhovetskiy I.S., Shevchenko V.E. Tumor stem cells from glioblastoma multiforme. *Uspekhi Molekulyarnoy Onkologii = Advances in Molecular Oncology*. 2016; 3:26-33. DOI 10.17650/2313-805X-2016-3-2-26-33. (in Russian)]
- Поттер Е.А., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Николин В.П., Попова Н.А., Дубатолова Т.Д., Петрова Д.Д., Верещагин Е.И., Минкевич А.М., Андрушкевич О.М., Байборodin С.И., Рогачев В.А., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Разработка регламента терапевтического режима, основанного на синергичном действии циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК, приводящего к полному вылечиванию экспериментальных животных от асцитной формы опухоли мыши Кребс-2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):723-735. [Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Taranov O.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Dubatolova T.D., Petrova D.D., Vereschagin E.I., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Development of the therapeutic regimen based on the synergistic activity of cyclophosphamide and double-stranded DNA preparation which results in complete cure of mice engrafted with Krebs-2 ascites. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(5):723-735. DOI 10.18699/VJ16.162. (in Russian)]
- Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Minkevich A.M., Kozel A.V., Dolgova E.V., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Andrushkevich O.M., Taranov O.S., Omigov V.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kiseleva E.V., Zhukova M.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts. *Cancer Cell Int*. 2015;15:32. DOI 10.1186/s12935-015-0180-6.
- Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-760. DOI 10.1038/nature05236.
- Beier D., Hau P., Proescholdt M., Lohmeier A., Wischhusen J., Oefner P.J., Aigner L., Brawanski A., Bogdahn U., Beier C.P. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 2007;67(9):4010-4015. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-06-4180.
- Brescia P., Richichi C., Pelicci G. Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory? *J. Oncol*. 2012;2012:376894. DOI 10.1155/2012/376894.
- Carruthers R., Ahmed S.U., Strathdee K., Gomez-Roman N., Amoah-Buahin E., Watts C., Chalmers A.J. Abrogation of radioresistance in glioblastoma stem-like cells by inhibition of ATM kinase. *Mol. Oncol*. 2015;9(1):192-203. DOI 10.1016/j.molonc.2014.08.003.
- Chen R., Nishimura M.C., Bumbaca S.M., Kharbanda S., Forrest W.F., Kasman I.M., Greve J.M., Soriano R.H., Gilmour L.L., Rivers C.S., Modrusan Z., Nacu S., Guerrero S., Edgar K.A., Wallin J.J., Lam-szus K., Westphal M., Heim S., James C.D., VandenBerg S.R., Costello J.F., Moorefield S., Cowdrey C.J., Prados M., Phillips H.S. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2010;17(4):362-375. DOI 10.1016/j.ccr.2009.12.049.
- Dahlrot R.H., Hansen S., Jensen S.S., Schröder H.D., Hjelmberg J., Kristensen B.W. Clinical value of CD133 and nestin in patients with glioma: a population-based study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2014; 7(7):3739-3751.
- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther*. 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854.
- Dolgova E.V., Mishinov S.V., Proskurina A.S., Potter E.A., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Tyrinova T.V., Stupak V.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Novel cancer stem marker and its applicability for grading primary human gliomas. *Technol. Cancer Res. Treat*. 2018;17:1533034617753812. DOI 10.1177/1533034617753812.
- Gilbert C.A., Ross A.H. Glioma stem cells: cell culture, markers and targets for new combination therapies. *Cancer Stem Cells Theories Practice*. 2011. DOI 10.5772/13626.
- Kase M., Minajeva A., Niinepuu K., Kase S., Vardja M., Asser T., Jaal J. Impact of CD133 positive stem cell proportion on survival in patients with glioblastoma multiforme. *Radiol. Oncol*. 2013;47(4):405-410. DOI 10.2478/raon-2013-0055.
- McNeill K.A. Epidemiology of brain tumors. *Neurol. Clin*. 2016; 34(4):981-998. DOI 10.1016/j.ncl.2016.06.014.
- Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M., Drunen E., Maas A., Theil A.F., Wit J., Jaspers N.G.J., Beverloo H.B., Hoeijmakers J.H.J., Kanaar R. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol. Cell Biol*. 2004;24(13):5776-5787.
- O'Brien C.A., Kreso A., Jamieson C.H.M. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin. Cancer Res*. 2010;16(12):3113-3120. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-2824.
- Omuro A., DeAngelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*. 2013;310(17):1842-1850. DOI 10.1001/jama.2013.280319.
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Minkevich A.M., Rozanov A.S., Peltek S.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Seledtsov I.A., Molodtsov V.V., Zavyalov E.L., Taranov O.S., Baiborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Gene expression profiling of tumor-initiating stem cells from mouse Krebs-2 carcinoma using a novel marker of poorly differentiated cells. *Oncotarget*. 2017;8(6):9425-9441. DOI 10.18632/oncotarget.14116.
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Efremov Y.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Bayborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Shurdov M.A., Bogachev S.S. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice. *Oncotarget*. 2016;7(10):11580-11594. DOI 10.18632/oncotarget.7311.

Qiang L., Yang Y., Ma Y., Chen F., Zhang L., Liu W., Qi Q., Lu N., Tao L., Wang X., You Q., Guo Q. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 2009;279:13-21. DOI 10.1016/j.canlet.2009.01.016.

Schreck K.C., Taylor P., Marchionni L., Gopalakrishnan V., Bar E.E., Gaiano N., Eberhart C.G. The notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance. *Clin. Cancer Res.* 2010;16(24):6060-6070. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-10-1624.

Takezaki T., Hide T., Takanaga H., Nakamura H., Kuratsu J., Kondo T. Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human

glioma-initiating cells. *Cancer Sci.* 2011;102(7):1306-1312. DOI 10.1111/j.1349-7006.2011.01943.x.

Wang Y., Xu C., Du L.Q., Cao J., Liu J.X., Su X., Zhao H., Fan F., Wang B., Katsube T., Fan S.J., Liu Q. Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(11):22449-22461. DOI 10.3390/ijms141122449.

Zhang M., Song T., Yang L., Chen R., Wu L., Yang Z., Fang J. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2008; 27:85. DOI 10.1186/1756-9966-27-85.

ORCID ID

E.V. Dolgova orcid.org/0000-0002-5543-248X
A.S. Proskurina orcid.org/0000-0002-7650-4331
T.V. Tyrinova orcid.org/0000-0002-7987-2017
Ya.R. Efremov orcid.org/0000-0002-0649-7543

K.E. Orishchenko orcid.org/0000-0001-9718-9038
A.A. Ostanin orcid.org/0000-0001-6895-938X
E.R. Chernykh orcid.org/0000-0003-2346-6279
S.S. Bogachev orcid.org/0000-0002-2019-9382

Паттерн эпидермиса листа пшеницы как модель для изучения влияния стрессовых условий на морфогенез

У.С. Зубаирова¹, А.В. Дорошков^{1, 2}

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Эпидермис листа однодольного растения – широко используемая модельная система для изучения дифференцировки клеток растений. Он содержит специализированные клетки, которые легко наблюдать. В настоящей работе предлагается концепция использования растущего листа злаков для изучения стресс-индуцированных изменений морфогенеза в динамике. Линейный лист пшеницы во время своего формирования длительное время сохраняет фазу стационарного роста. Это позволяет наблюдать серию последовательных событий морфогенеза, зафиксированных в клеточной структуре взрослого листа. Для изучения клеточной архитектуры эпидермиса листа пшеницы применен подход, основанный на получении и обработке конфокальных 3D изображений листьев пшеницы, окрашенных флуоресцентными красителями. Он дает возможность проводить точное морфометрическое описание и определять количественные характеристики паттерна эпидермиса листа. Низкие температуры являются одним из факторов, лимитирующих возделывание культурных растений в умеренной зоне. Показаны значимые нарушения морфогенеза устьичного аппарата в эпидермисе предфлаговых листьев сортов Саратовская 29 и Янецкис Пробат в ответ на холодовой стресс. Установлено, что в зоне максимального проявления стрессового воздействия преобладают функционально нарушенные устьица, тогда как в зонах сформированных до и после него, аномалии развития сводятся только к нарушению морфогенеза обкладочных клеток. Для сорта Саратовская 29 было выявлено формирование значимого количества эктопических трихом в рядах, детерминированных к образованию устьиц. С применением предлагаемого подхода можно получать стандартизованные качественные и количественные оценки стресс-индуцированных нарушений морфогенеза эпидермиса листа пшеницы. Впоследствии эти данные могут быть использованы для верификации компьютерных моделей морфогенеза листа. Дальнейшее изучение механизмов действия холодового стресса на морфогенез позволит найти дополнительные возможности повышения урожайности пшеницы в зонах рискованного земледелия.

Ключевые слова: холодовой стресс; морфогенез; мягкая пшеница; эпидермис листа; устьица; клеточная структура ткани; конфокальная микроскопия; анализ изображений.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Зубаирова У.С., Дорошков А.В. Паттерн эпидермиса листа пшеницы как модель для изучения влияния стрессовых условий на морфогенез. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):837-844. DOI 10.18699/VJ18.32-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zubairova U.S., Doroshkov A.V. Wheat leaf epidermal pattern as a model for studying the influence of stress conditions on morphogenesis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):837-844. DOI 10.18699/VJ18.32-o (in Russian)

Receive 14.02.2018

Accepted for publication 27.05.2018

© AUTHORS, 2018

Authors equal contribution to manuscript preparation.

e-mail: ulyanochka@bionet.nsc.ru; ad@bionet.nsc.ru

Wheat leaf epidermal pattern as a model for studying the influence of stress conditions on morphogenesis

U.S. Zubairova¹, A.V. Doroshkov^{1, 2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The leaf epidermis of a monocotyledonous plant is a widely used model system for studying the differentiation of plant cells, as it contains readily observable specialized cells. The approach proposed in this paper uses a growing cereal leaf to study stress-induced dynamic changes in morphogenesis. In the process of formation, the linear leaf of wheat remains in the stationary growth phase for long. This fact permits us to observe a series of successive morphogenetic events recorded in the cellular structure of the mature leaf. In studying the cellular architecture of the wheat leaf epidermis, we obtained and processed confocal 3D images of wheat leaves stained with fluorescent dyes. This procedure allows an accurate morphometric description and determination of quantitative characteristics of the leaf epidermal pattern. Low temperatures are among the factors limiting the growing of crop plants in the temperate zone. In the present work, we show significant aberrations of stomatal morphogenesis in the epidermis of boot leaves of wheat varieties Saratovskaya 29 and Yanetskis Probat in response to cold stress. We found that nonfunctional stomata predominated in the zone of maximum manifestation of stress, whereas in the zones formed before and after the stress impact, the developmental anomalies come to the disturbance in the morphogenesis of subsidiary cells. In Saratovskaya 29, a significant amount of ectopic trichomes formed in rows predetermined to stoma formation. The proposed approach can provide standardized qualitative and quantitative data on stress-induced morphogenesis aberrations in wheat leaf epidermis. Subsequently, these data can be used for verification of computer models of leaf morphogenesis. Further study of the mechanisms of the effect of cold stress on morphogenesis will add to the search for additional opportunities to increase wheat yields in areas of risky agriculture.

Key words: cold stress; morphogenesis; wheat; leaf epidermis; stomata; cellular pattern; confocal microscopy; image analysis.

Низкие температуры – один из абиотических стрессовых факторов среды, лимитирующих продуктивность и ареал сельскохозяйственных растений в умеренных зонах Земли. В настоящее время в мире интенсивно ведутся работы по исследованию механизмов формирования растительных тканей и органов в норме и в ответ на различные стрессовые факторы (Xiong et al., 2002), гормоны (Matías-Hernández et al., 2015) и др. В качестве модельной системы для исследования морфогенеза растительных тканей рассматривается развитие эпидермиса листа и формирование в нем специализированных клеток (Yang, Ye, 2013).

В процессе адаптации к низким температурам происходит перестройка ростовых процессов (Yadav, 2010), что, в свою очередь, приводит к снижению негативного воздействия низких температур на клеточные структуры. Известно, что растениям свойственно динамическое изменение размеров клеток. Это служит важной адаптивной функцией в реакции растений на абиотические стрессы (Limin, Fowler, 2001). Воздействие холода при закладке органов растений может вызывать изменение морфогенеза и сказаться впоследствии на размере, форме и функции зрелых органов.

Клетки растений объединены общей клеточной стенкой в механический ансамбль и не имеют возможности сдвигаться друг относительно друга в процессе роста. Для злаков характерен линейный тип роста листа за счет деления и удлинения клеток в базальной части листовой пластинки (рис. 1, а). По скорости роста листа злаков можно выделить три стадии (Skinner, Nelson, 1995). На первой стадии наблюдается увеличение скорости, на второй она постоянна, а на третьей снижается. Во время роста листа в базальной части наблюдаются характерные участки: зона роста делением и зона роста растяжением (см. рис. 1, а). На второй стадии, продолжающейся несколько дней, размер этих зон остается относительно постоянным. Одновременно с ростом листа в его базальной части происходит специализация отдельных клеток и формирование клеточной архитектуры тканей. В частности, в эпидермисе наблюдается морфогенез специализированных структур – трихом (см. рис. 1, б) и устьичных комплексов (см. рис. 1, в).

Отличительная черта эпидермального паттерна злаков – организация клеток в виде продольных клеточных рядов. При этом специализированные клетки, в частности трихомы и устьица, образуются в отдельных рядах клеток (Gallagher, Smith, 2000; Rudall et al., 2017; Herworth et al., 2018). Трихомы образуются в результате асимметричного деления. На дистальном конце материнской клетки отделяется меньшая по размеру инициаль, которая в дальнейшем формирует внешний эпидермальный вырост. Устьичные комплексы у злаков, в частности у ячменя, кукурузы и пшеницы, также наблюдаются в обособленных продольных рядах клеток (см. рис. 1, в) (Gallagher, Smith, 2000; Liu et al., 2009; Peterson et al., 2010; Chateret et al., 2017; Rudall et al., 2017; Herworth et al., 2018). На первом этапе в результате асимметричного деления клеток этого ряда на дистальном конце образуется материнская клетка (см. рис. 1, в2). Перед следующим митозом она индуцирует асимметричные деления в соседних клетках смежных клеточных рядов (см. рис. 1, в3). Они производят обкла-

дочные клетки, важные для функционирования устьища. Далее материнская клетка симметрично делится и образует две замыкающие клетки (см. рис. 1, в4). Таким образом, правильно сформированный устьичный комплекс состоит из четырех клеток (см. рис. 1, в5).

Описанные этапы морфогенеза протекают последовательно вдоль оси роста листа и позволяют наблюдать несколько стадий одновременно. Это делает эпидермис листа злаков удобным объектом для изучения морфогенеза. Понижение температуры влияет на биомеханические свойства и скорость деления клеток, происходят изменения структуры растительной клетки (Yadav, 2010), в частности значительные изменения претерпевает фотосинтетический аппарат (Венжик и др., 2012). Воздействие низкой температуры может привести к биомеханическим ограничениям, изменениям активности макромолекул и уменьшению осмотического потенциала в клеточной среде (Xiong et al., 2002). Так, рост листьев может сильно замедлиться в течение двух минут охлаждения корней (Dale et al., 1990). Однако механизм действия холодового стресса на морфогенез клеточной архитектуры растительных тканей до конца не ясен.

В настоящей работе предлагается методика использования паттерна эпидермиса листа пшеницы в качестве модели для изучения влияния стрессовых условий на морфогенез. Предложена и апробирована методика создания стрессовых условий и извлечения качественных и количественных оценок о динамике нарушений морфогенеза специализированных клеток во время стационарного роста листа. В контролируемых условиях холодового стресса были проведены основные этапы анализа – от подбора длительности воздействия до получения данных о типах и частотах нарушений морфогенеза трихом и устьиц. Для изучения клеточной архитектуры эпидермиса листа пшеницы применен подход, основанный на получении и обработке конфокальных 3D изображений эпидермиса листьев пшеницы, окрашенных флуоресцентными красителями.

Материалы и методы

Генетический материал и условия выращивания. Для экспериментальной работы использовали растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сортов Саратовская 29 (С29) и Янецкис Пробат (ЯП). Сорт С29 имеет разнообразный клеточный состав эпидермиса, содержащий как основные клетки эпидермиса и устьица, так и трихомы различного размера (Дорошков и др., 2011; Doroshkov et al., 2016), поэтому он приемлем для апробации метода изучения стресс-индуцированного нарушения морфогенеза клеточной архитектуры эпидермиса. Сорт ЯП имеет слабо выраженное опушение листа (Doroshkov et al., 2016). Для создания стандартных условий использовали гидропонную теплицу и вазоны с керамзитным грунтом. Длина светового дня поддерживалась 16 ч. Всего было выращено по 20 растений каждого сорта.

Создание стрессовых условий. Схема эксперимента приведена на рис. 2. На стадии четырех зрелых листьев положение свободной части растущего пятого листа отмечалось маркером. В это время в нормальных условиях пятый (предфлаговый) лист находится в фазе стационар-

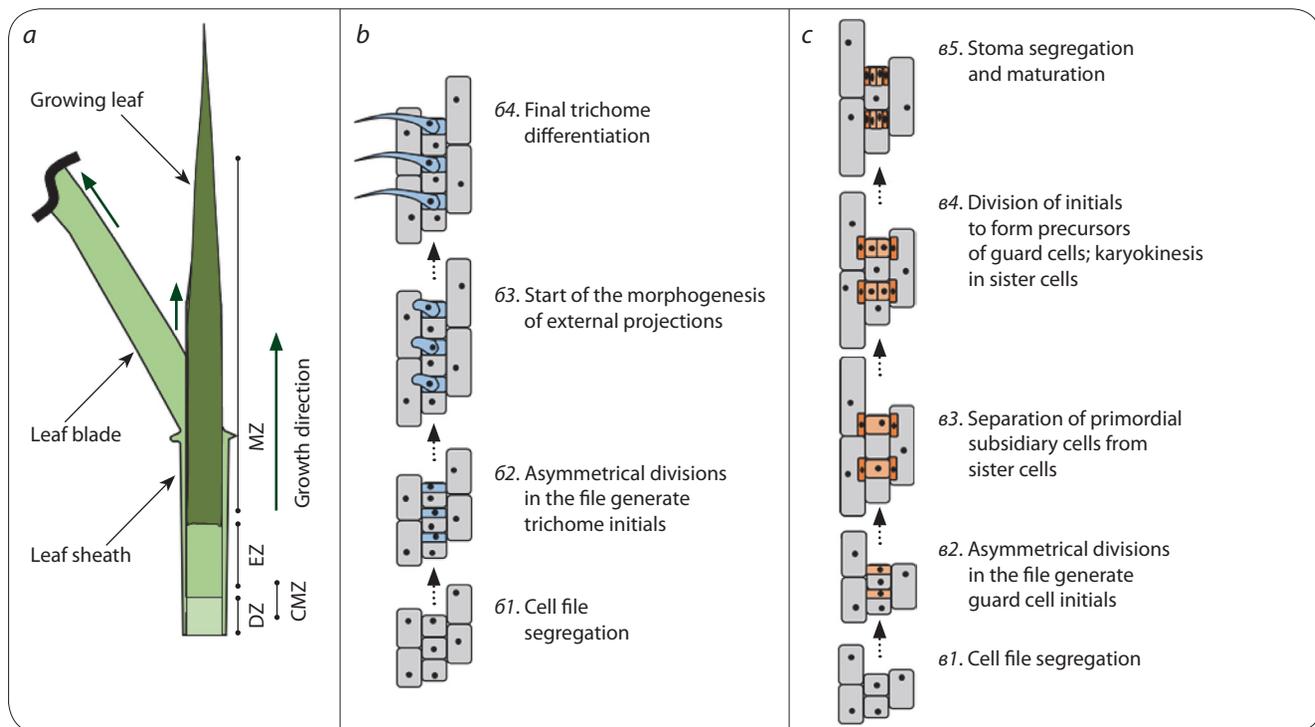


Fig. 1. Schematic representation of the morphogenesis of common wheat leaf epidermis according to (Rudall et al., 2017; Hepworth et al., 2018). (a) Leaf formation in the stationary growth phase. (b) Trichome morphogenesis. (c) Stoma morphogenesis. DZ, division zone; EZ, extension zone; MZ, mature cell zone; CMZ, zone of trichome and stoma morphogenesis. Common epidermis cells are shown in gray; trichomes, in blue; and stomata, in orange.

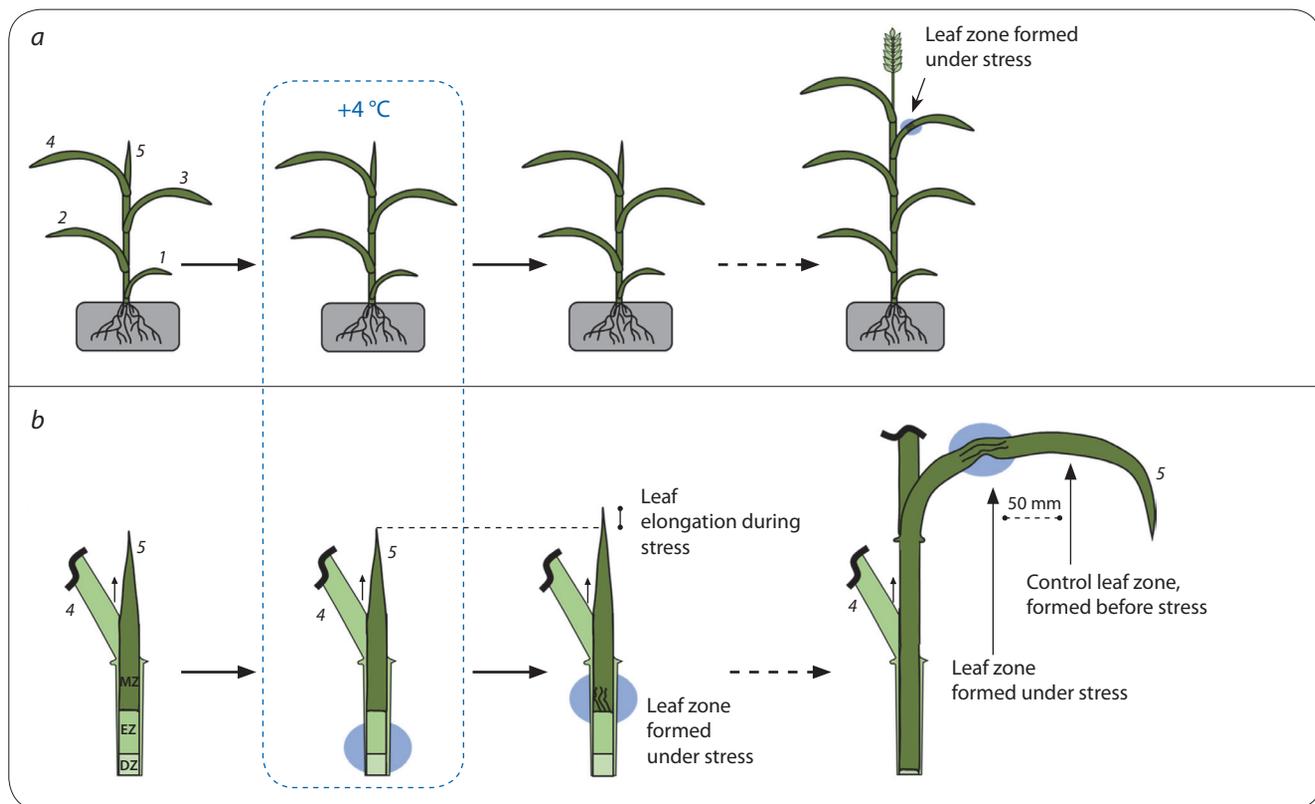


Fig. 2. Stress experiment: (a) the general outline; (b) change of the location of stress-induced anomalies in the morphogenesis of specialized leaf epidermis cells with leaf growth.

DZ, division zone; EZ, extension zone; MZ, mature cell zone. Numerals indicate leaf whorls.

ного роста и эпидермис последовательно проходит все этапы формирования с постоянной скоростью. Растения на этой стадии помещали в климатическую камеру при +4 °С с сохранением светового дня (см. рис. 2). Для яровых сортов мягкой пшеницы в период вегетации оптимальная температура – в интервале от +10 до +24 °С, а температура +4 °С служит стрессовым воздействием и вызывает значительное замедление роста. Были сформированы группы растений, подвергавшиеся разной длительности холодового воздействия (2, 4, 6 и 8 сут), а также контрольная группа растений. В каждой группе было по восемь растений двух изучаемых сортов. После холодового воздействия все группы растений возвращали в благоприятные условия и выращивали до стадии колошения. Растения каждой группы затем были подвергнуты визуальной инспекции. Для анализа отбирали пятые (предфлаговые) листья с метками (см. рис. 2, б).

Окраска препаратов и извлечение данных о динамике нарушений морфогенеза специализированных клеток. Области листа с нарушениями морфогенеза инкубировали в фиксаторе 3 : 1 (этанол : уксусная кислота) в течение трех или более часов. Для окрашивания использовали красители 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, Sigma-Aldrich) и Propidium Jodide (PJ, Sigma-Aldrich). Этот набор красителей на фиксированном материале обеспечивает достаточно устойчивую к выгоранию окраску ядер и клеточных стенок, а также позволяет различать глубоко залегающие сосуды. Окраску проводили в два этапа с промежуточной промывкой нейтральным фосфатным буфером. Отмытые двукратно фрагменты листа помещали в раствор PJ 10 мкг/мл на 30 мин, затем снова отмывали два раза по 15 мин. Далее фрагменты листа разделяли на зоны (см. рис. 2, б), окрашивали раствором DAPI 10 мкг/мл в течение 30 мин и заключали под покровное стекло. В качестве реагента, препятствующего выгоранию (антифейда), использовали реагент DABCO (Sigma-Aldrich). Это позволило в дальнейшем проводить многократный микроскопический анализ. DABCO был разведен согласно стандартной методике (25 мг/мл DABCO в смеси 90 % глицерин, 10 % 1 × PBS pH = 8.6). Такая смесь для заключения обладает достаточной вязкостью для удержания покровного стекла на фрагменте листа пшеницы.

Полученные препараты оценивали при помощи флуоресцентного микроскопа ZEISS Axioskop 2 с целью нахождения оптимальной длительности холодового воздействия, которая обеспечивает длину зоны нарушения морфогенеза на взрослом листе в пределах 20 мм. Зона такого размера, по нашим оценкам, содержит около 200 элементов клеточного паттерна в каждом изучаемом продольном ряду, что позволяет определить статистическую достоверность изменения частот появления нарушений морфогенеза устьиц по сравнению с контрольной зоной. Затем препараты с отобранной группы растений были изучены при помощи микроскопа ZEISS LSM 780 NLO в режиме «tile scan» при следующих настройках: увеличение объектива 20×, кратность увеличения при сканировании 0.6, расстояние между соседними оптическими срезами по вертикальной оси 2.5 мкм. Усиление сигнала подбиралось динамически. Размер пикселя на оптических срезах итогового изображения составлял 1.38×1.38 мкм.

Такие настройки позволяют получать изображения, на которых видимая толщина клеточной стенки составляет 2–4 пикселя. Протяженные (40–50 мм длиной) области вдоль листа, равноудаленные от центральной жилки и края, были использованы в анализе.

Анализ изображений производили в программе ImageJ (Collins, 2007) при помощи плагина CellCounter (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>), который позволяет отмечать на изображении точки с заданным типом, а затем извлекать их координаты. В рядах, в норме содержащих устьица (см. рис. 1, в), были отмечены элементы клеточного паттерна: устьичные комплексы и обычные клетки эпидермиса. Зона стрессового воздействия была разбита на отрезки длиной по 2 мм, включающие около 20 элементов клеточного паттерна в каждом изучаемом продольном ряду. Для отрезков оценивались частоты нормальных и нарушенных элементов клеточной архитектуры. В качестве контрольной зоны использовали отрезок листа длиной 4 мм, который сформировался до воздействия холодового стресса. На каждом отрезке вычисляли медиану, 0.25 и 0.75 квантили, минимальное и максимальное наблюдаемые значения. Отдельно были оценены соотношения долей нарушений формирования замыкающих и обкладочных клеток устьиц. Всего для двух генотипов в работе изучено около 15000 элементов паттерна. Оценка параметров распределений, построение графиков и 3D реконструкций фрагментов листа производились с помощью стандартных функций в пакете Mathematica 10.

Результаты и обсуждение

После холодового воздействия разной длительности на стадии колошения растения сформировали предфлаговые листья нормального размера (длина 150–250 мм, ширина 8–12 мм). В процессе визуальной инспекции было установлено, что после двухдневного действия холодовых условий нет видимых изменений морфологии листа. После четырехдневного действия в предсказанной зоне (см. рис. 2) на расстоянии одной трети длины от базальной части листовой пластинки наблюдается фрагмент с видимыми нарушениями геометрии жилкования. После шести- и восьмидневного воздействия холодового стресса изучаемая зона становится более протяженной и составляет 10–25 мм. Это подтверждает, что морфогенез этой части листа проходил в стрессовых условиях. Для детального изучения частотной динамики появления нарушений морфогенеза была выбрана длительность в шесть суток. Были отобраны фрагменты листа сорта С29 и ЯП длиной 80 мм, содержащие в центре предполагаемую зону стресс-индуцированного изменения морфогенеза. Паттерн листа, наблюдаемый в эксперименте, соответствовал данным о клеточной архитектуре эпидермиса листа мягкой пшеницы. Клетки ранжированы в продольные ряды, и отдельные ряды детерминированы на образование определенных элементов паттерна – трихом и устьиц (рис. 3). Детерминированность рядов сохранялась по длине фрагмента листа, что позволило в большинстве случаев проследить динамику частот нарушений внутри каждого ряда. Несмотря на то, что наблюдаемый паттерн в условиях стресса сохраняет клеточные ряды, он искривлен

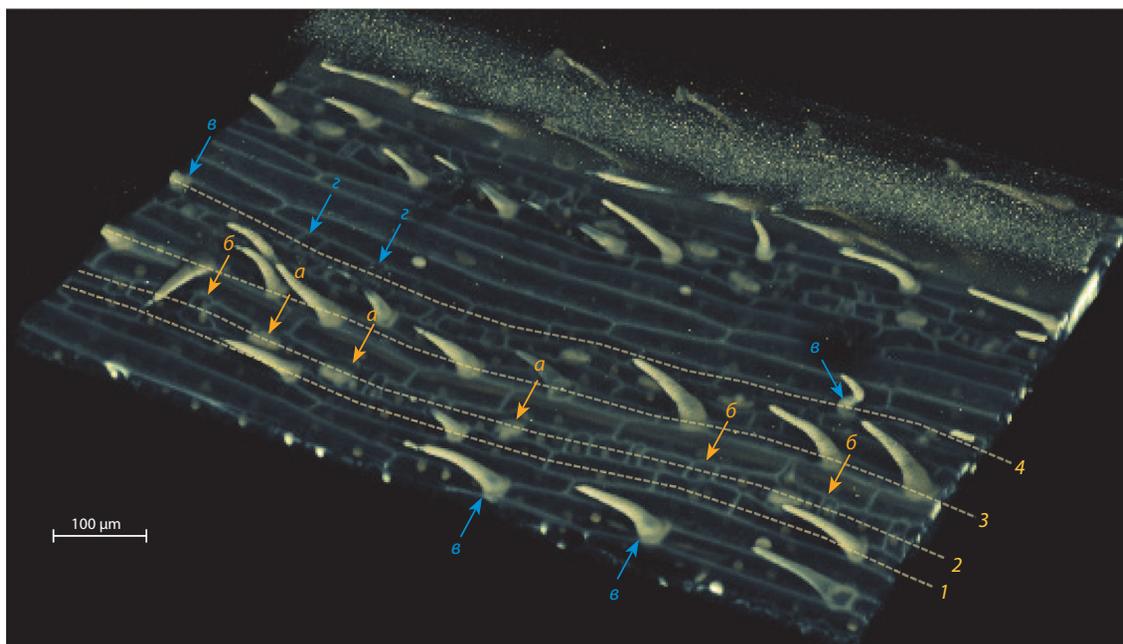


Fig. 3. Fragment of the 3D structure of common wheat leaf epidermis, cv. Saratovskaya 29. The reconstruction is performed with common modules for visualizing 3D images in Mathematica 10 package on the base of our data obtained by laser scanning microscopy.

Files normally containing (1, 3, 4) trichomes and (2) stomata are indicated. Stomatal complexes: (a) normal, (b) abnormal. Trichomes: (c) normal, (d) underdeveloped.

и имеет множество визуально различимых нарушений, таких как недоразвитие трихом (см. рис. 3, *z*) и аномалии развития устьиц (см. рис. 3, *б*). Жилки при этом проходят зону нарушений насквозь, изменения их числа не наблюдалось.

Были отобраны наиболее типичные фрагменты листа обоих генотипов и просканированы с нижней (адаксиальной стороны) вдоль листа ± 25 мм от центра зоны нарушения морфологии. На расстоянии 50 мм от края зоны локализации нарушений морфогенеза в сторону кончика листа была выделена контрольная область длиной 10 мм.

Характерный паттерн эпидермиса листа пшеницы изучаемых сортов в норме представлен чередованием рядов, содержащих основные клетки, трихомы и устьица. Над жилками расположены клеточные ряды, как правило, несущие крупные трихомы. Между ними наблюдается чередование рядов, содержащих устьичные комплексы, рядов в которых наблюдаются более мелкие трихомы, а также рядов без специализированных клеток (см. рис. 3). Отметим, что эпидермис листа сорта ЯП содержит меньшее количество трихом, уступающих по размеру трихомам С29. В рядах, в норме включающих трихомы (см. рис. 3), в зоне стрессового воздействия встречаются как сформированные (остановились на стадии *б4*, см. рис. 1), так и несформированные трихомы (остановились на стадии *б2*, см. рис. 1), которые отличаются от обычных клеток эпидермиса формой и уступают им в размере (примерно в три-пять раз меньше, чем сестринские клетки трихом). При этом чередование основных клеток и трихом в соотношении 1:1 сохраняется. Однако в соседних рядах, детерминированных на формирование трихом, но об-

разовавшихся над проводящими пучками, на этом же расстоянии от основания листа таких нарушений не наблюдается. Это доказывает, что морфогенез трихом в непосредственной близости от проводящего пучка менее чувствителен к действию холодового стресса.

На рис. 4 приведены классификация нарушений морфогенеза устьиц и наблюдаемые примеры. Показана структура нормальных устьичных комплексов (см. рис. 4, *а*), отличающихся округлой формой и состоящих из пары замыкающих клеток, окруженных двумя обкладочными клетками (см. рис. 1, *в4–в5*). Они наблюдались как в контрольной области, так и в зоне, сформированной после действия стрессового фактора. В условиях стресса были зафиксированы нарушения отделения одной (см. рис. 4, *б*) и двух (см. рис. 4, *в*) обкладочных клеток, а также нарушения образования замыкающих клеток: комплексы без обкладочных клеток (см. рис. 4, *з*), с одной (см. рис. 4, *д*) и двумя обкладочными клетками (см. рис. 4, *е*). Следует отметить, что при нормальном морфогенезе отделение обкладочных клеток происходит раньше, чем формирование замыкающих клеток. Это говорит о том, что при нарушении самых ранних стадий развития устьиц формируется обособленный зачаток (см. рис. 4, *з*). При остановке на более поздних этапах наблюдается отделение обкладочных клеток (см. рис. 4, *д*, *е*). Однако для наблюдения зачатков устьиц (см. рис. 4, *б*, *в*), содержащих замыкающие клетки и неполный набор обкладочных, должно произойти разделение материнской клетки без отделения одной или обеих обкладочных клеток. Такие нарушения свидетельствуют в пользу частичной независимости генетического контроля прохождения этих этапов морфогенеза.

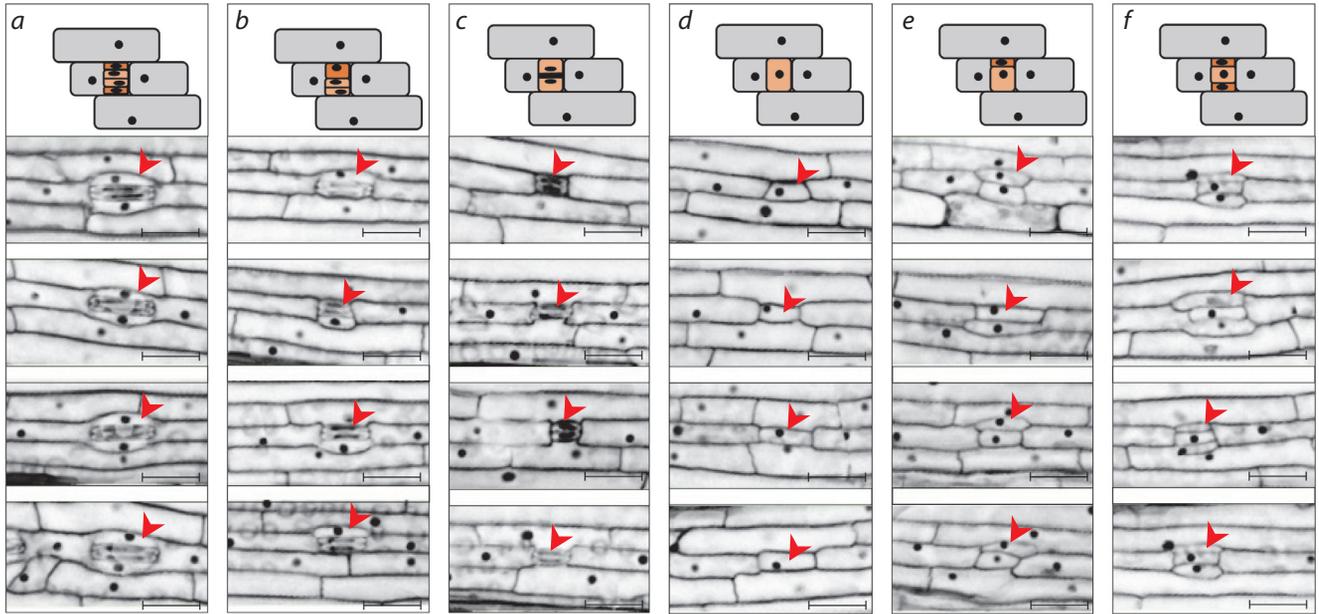


Fig. 4. Stomatal complexes: (a) normal, (b)–(f) abnormal.

Anomaly schemes and corresponding microimages are shown. Anomalies: (b) in the segregation of one subsidiary cell; (c) ditto, two cells; (d) formation of a guard cell without subsidiary cells; (e, f) with one and two subsidiary cells, respectively. Scale bar 50 μ m.

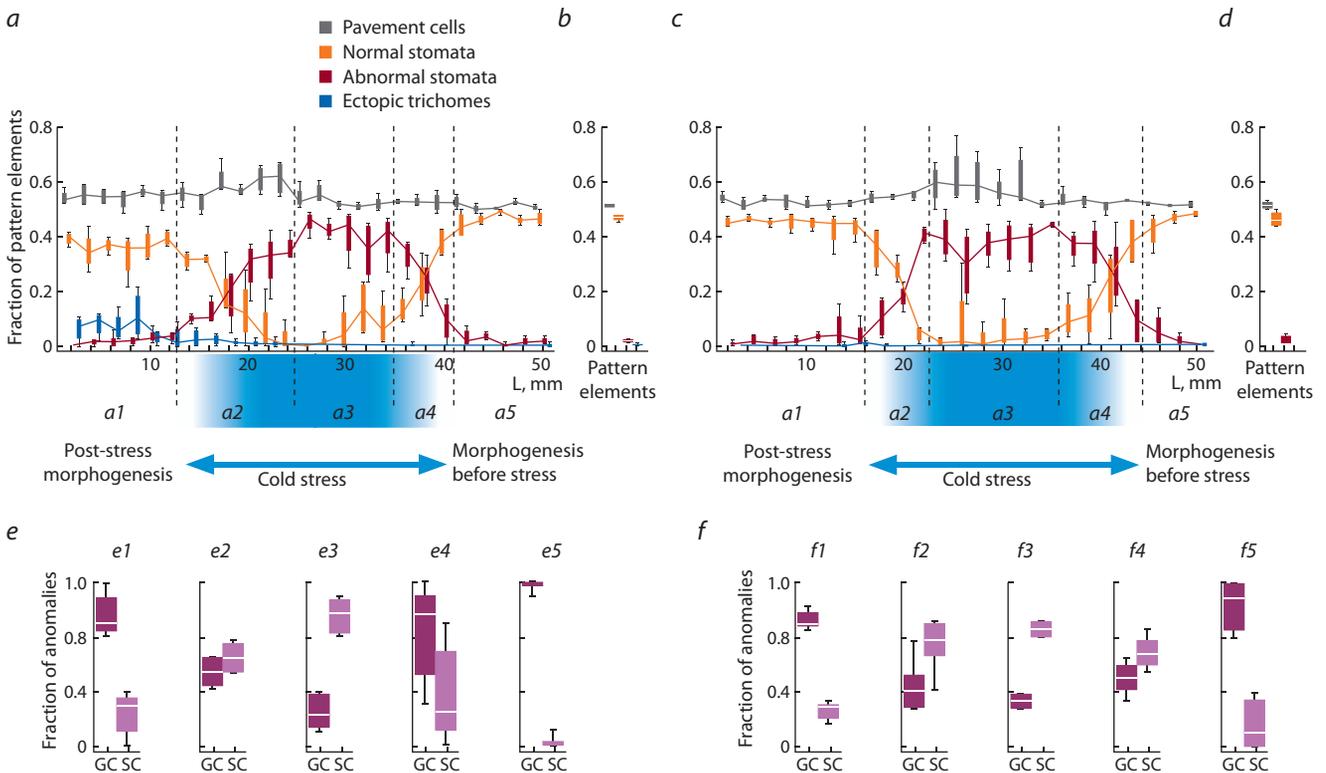


Fig. 5. Variation in the frequency of elements of common wheat leaf epidermis along cell files normally containing stomata: (a, b, e) cv. Saratovskaya 29, (c, d, f) cv. Janetskis Probat.

The variation is shown along fragments of (a, c) leaves exposed to stress and (b, d) control areas. At the bottom, ratios between the anomalies in the formation of (e) guard cells (GC) and (f) subsidiary cells (SC) are shown. The ratios of anomalies in leaf fragments (a1–a5) are shown in graphs (e1–e5); the ratios for fragments (c1–c5), in graphs (f1–f5), respectively. For all dots, box plots are shown, in which the horizontal line indicates the median, box sides, quantiles 0.25 and 0.75; range boundaries, the least and the greatest values in the sample. In graphs (a) and (c), dots corresponding to distribution medians for identical pattern elements on neighboring segments are connected.

Для количественного анализа была оценена динамика распределения нарушений в рядах, детерминированных на образование устьиц, вдоль оси роста листа для образцов сортов С29 (рис. 5, а) и ЯП (см. рис. 5, в). В рядах, в норме содержащих устьица (см. рис. 1, в), были отмечены следующие элементы паттерна:

- основные клетки (вытянутые клетки без отличительных морфологических особенностей, расположенные между устьицами);
- трихомы;
- нормальные устьичные комплексы;
- устьичные комплексы с нарушением морфогенеза обкладочных клеток:
 - нарушения отделения одной обкладочной клетки;
 - нарушения отделения обеих обкладочных клеток;
 - деформированные устьичные комплексы, содержащие дополнительные обкладочные клетки;
- устьичные комплексы с нарушением морфогенеза замыкающих клеток:
 - без обкладочных клеток (наблюдается как неразделенная материнская клетка);
 - с одной из обкладочных клеток (наблюдается как неразделенная материнская клетка);
 - с двумя обкладочными клетками (наблюдается как неразделенная материнская клетка).

На рис. 5, а–г показаны распределения относительных долей основных клеток эпидермиса, нормальных и аномальных устьичных комплексов, а также эктопических трихом. Данные приведены как вдоль изучаемых фрагментов, содержащих зону действия холодного стресса (см. рис. 5, а, в), так и для контрольных областей (см. рис. 5, б, г).

На контрольных графиках (см. рис. 5, б, г) наблюдается чередование основных клеток и нормальных устьиц в соотношении 1 : 1 (отдельные частоты около 0.5). Для обоих генотипов аномальные устьичные комплексы и эктопические трихомы в норме не выявляются. При рассмотрении динамики изменения этих частот вдоль оси роста листа (см. рис. 5, а, в) было показано, что существует зона листа, в которой доля нормальных устьичных аппаратов ниже доли нарушенных устьичных аппаратов (см. рис. 5, а2–а4). Здесь расположены устьичные комплексы с нарушениями на разных этапах развития (см. рис. 4). Протяженность этой зоны для образцов разных генотипов была схожа – для сорта С29 она была 22 мм (см. рис. 5, а от точки 18 мм до точки 38 мм включительно), а для ЯП – 24 мм (см. рис. 5, в от точки 20 мм до точки 42 мм включительно). Эта зона отражает реакцию на холодный стресс. В качестве маркера стрессового ответа выступает доля аномалий в развитии устьичных аппаратов относительно общего количества элементов паттерна клеточного ряда. При этом начало воздействия стресса характеризуется уменьшением доли нормально сформированных устьичных аппаратов за счет роста количества нарушений. На отрезке, сформировавшемся в условиях холода, практически все образовавшиеся устьица имели аномалии, а после возвращения к нормальной температуре их доля постепенно снизилась к уровню до воздействия стресса.

В правой части графика (в направлении кончика листа) в обоих случаях находится зона, сформировавшаяся до

наступления стрессовых условий (см. рис. 5, а5). Здесь наблюдается уровень частот элементов паттерна эпидермиса, соответствующий контролю. Левее (в сторону базальной части листовой пластинки) расположена зона, которая, предположительно, формировалась после действия стресса (см. рис. 5, а1). Частота элементов паттерна эпидермиса в этой зоне у обоих исследованных генотипов также стремится к контрольному уровню. Однако у сорта С29 отмечены существенные отличия. Так, доля устьиц в этой зоне составляет 0.36 (см. рис. 5, а1), что ниже контрольного уровня (0.47) (см. рис. 5, б). В изучаемых клеточных рядах наблюдаются эктопические трихомы со средней частотой около 0.1. В зонах, сформированных до и во время стресса, их частота близка к нулю (см. рис. 5, а). Таким образом, для сорта С29 после действия холодного стресса в изученных клеточных рядах снизилась доля устьиц, частично за счет эктопических трихом. Следует отметить, что появление эктопических трихом обнаружено нами для сорта С29, но не наблюдается для сорта ЯП. Возможно, это связано с особенностями регуляции формирования трихом у этих двух сортов. ЯП формирует меньшее число трихом и практически исключительно вдоль подлежащих проводящих пучков, а сорт С29 образует трихомы в некоторых рядах между проводящими пучками в норме. Для обоих листьев чередование элементов паттерна внутри продольных рядов устьице/основная клетка сохраняется на протяжении всего фрагмента, поэтому доля основных клеток остается стабильной на уровне 0.5.

Отдельно были проанализированы нарушения формирования замыкающих и обкладочных клеток устьиц по выделенным зонам (см. рис. 5, д, е). Важно отметить, что нарушение морфогенеза обкладочных клеток способно приводить к формированию частично функционального устьица, тогда как при нарушении морфогенеза замыкающих клеток функция полностью утрачивается. Показано, что в зоне максимального проявления стрессового воздействия (см. рис. 5, д, е; средние графики) в обоих случаях достоверно ($p < 0.005$) преобладают нарушения замыкающих клеток, тогда как в зонах, сформированных до и после стрессового воздействия, достоверно преобладают нарушения морфогенеза обкладочных клеток (см. рис. 5, д, е, боковые графики). Таким образом, в паттерне, сформированном в стрессовых условиях, преобладают аномальные устьица, функция большей части из которых утрачена.

Заключение

Клеточный паттерн эпидермиса листа злаков, содержащий специализированные клетки, которые легко наблюдать, широко используется в качестве модельной системы для изучения морфогенетических процессов (Peterson et al., 2010; Yang, Ye, 2013). В настоящей работе показано, что при создании стрессовых условий во время стационарного роста листа мягкой пшеницы наблюдается значительное изменение параметров клеточной архитектуры: нарушаются морфогенез трихом, формирование устьичных комплексов. Расположение зоны влияния холодного стресса, рассмотренного в нашей работе, предсказуемо, визуально дифференцируемо и позволяет получать как качествен-

ные, так и количественные характеристики нарушений морфогенеза специализированных клеток. Преимущество предложенного подхода – в качестве контрольной зоны можно использовать фрагмент этого же листа, удаленный от зоны стрессового воздействия в сторону кончика листа, морфогенез которого на момент стрессового воздействия завершен. Это позволяет нивелировать влияние различий в условиях выращивания отдельных растений и работать с гетерогенными выборками: гибридами, полевыми образцами и т.д. Применение предлагаемого метода дает возможность получать стандартизованные качественные и количественные оценки о стресс-индуцированных нарушениях морфогенеза в эпидермисе листа пшеницы. В дальнейшем эти данные будут важны для верификации компьютерных моделей морфогенеза листа. При подборе соответствующих условий метод может быть использован на других однонаправленных растущих органах растений, прежде всего листьях злаков, и при других видах стрессов.

Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of the Laboratory of Artificial Plant Growth, SB RAS (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=142>), for providing experimental plots; of the Shared Access Center for Microscopy of Biologic Objects, SB RAS, for access to equipment (microscopes ZEISS LSM 780 NLO and ZEISS Axioskop 2 plus); and of the Shared Access Center Bioinformatics, SB RAS, for access to computational resources and Mathematica 10 software (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>, supported by State Budgeted Project 0324-2018-0017). The authors thank Drs. T.A. Pshenichnikova and N.L. Podkolodnyy for valuable discussion.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Венжик Ю.В., Титов А.Ф., Таланова В.В., Мирославов Е.А., Котеева Н.К. Структурно-функциональная реорганизация фотосинтетического аппарата растений пшеницы при холодной адаптации. Цитология. 2012;54(12):916-924. Доступно на http://www.tsitologiya.cytspb.rssi.ru/54_12/venzhik.pdf. [Venzhik J.V., Titov A.F., Talanova V.V., Miroslovov E.D., Koteeva N.K. Structural and functional reorganization of photosynthetic apparatus in cold adaptation of wheat plants. Tsitologiya = Cytology (St.-Petersburg). 2012;54(12):916-924. Available at http://www.tsitologiya.cytspb.rssi.ru/54_12/venzhik.pdf. (in Russian)]
Дорошков А.В., Пшеничникова Т.А., Афонников Д.А. Анализ особенностей морфологии и наследования опушения листа пшеницы *Triticum aestivum* L. с помощью компьютерных методов фенотипирования. Генетика. 2011;47(6):836-841. [Doroshkov A.V., Pshenichnikova T.A., Afonnikov D.A. Morphological characterization and inheritance of leaf hairiness in wheat (*Triticum*

aestivum L.) as analyzed by computer-aided phenotyping. Russ. J. Genet. 2011;47(6):739-743. DOI 10.1134/S1022795411060093.]
Chater C.C., Caine R.S., Fleming A.J., Gray J.E. Origins and evolution of stomatal development. Plant Physiol. 2017;174(2):624-638. DOI 10.1104/pp.17.00183.
Collins T.J. ImageJ for microscopy. Biotechniques. 2007;43(Suppl. 1):25-30. DOI 10.2144/000112517.
Dale J.E., Stacciarini Seraphin E., Sattin M. The effects of root cooling on leaf growth. Eds. W.J. Davies, B. Jeffcoat. Importance of Root to Shoot Communication in the Responses to Environmental Stress. Bristol, UK: British Society for Plant Growth Regulation, 1990;21:149-161. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19920754078>.
Doroshkov A.V., Afonnikov D.A., Dobrovolskaya O.B., Pshenichnikova T.A. Interactions between leaf pubescence genes in bread wheat as assessed by high throughput phenotyping. Euphytica. 2016;207(3):491-500. DOI 10.1007/s10681-015-1520-2.
Gallagher K., Smith L.G. Roles for polarity and nuclear determinants in specifying daughter cell fates after an asymmetric cell division in the maize leaf. Curr. Biol. 2000;10(19):1229-1232. DOI 10.1016/S0960-9822(00)00730-2.
Hepworth C., Caine R.S., Harrison E.L., Sloan J., Gray J.E. Stomatal development: focusing on the grasses. Curr. Opin. Plant Biol. 2018;41:1-7. DOI 10.1016/j.pbi.2017.07.009.
Limin A.E., Fowler D.B. Inheritance of cell size in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relationship to the vernalization loci. Theor. Appl. Genet. 2001;103(2-3):277-281. DOI 10.1007/s00122-001-0550-4.
Liu T., Ohashi-Ito K., Bergmann D.C. Orthologs of Arabidopsis thaliana stomatal bHLH genes and regulation of stomatal development in grasses. Development. 2009;136(13):2265-2276. DOI 10.1242/dev.032938.
Matías-Hernández L., Aguilar-Jaramillo A.E., Cigliano R.A., Sanseverino W., Pelaz S. Flowering and trichome development share hormonal and transcription factor regulation. J. Exp. Bot. 2015;67(5):1209-1219. DOI 10.1093/jxb/erv534.
Peterson K.M., Rychel A.L., Torii K.U. Out of the mouths of plants: the molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. The Plant Cell. 2010;22(2):296-306. DOI 10.1105/tpc.109.072777.
Rudall P.J., Chen E.D., Cullen E. Evolution and development of monocot stomata. Am. J. Bot. 2017;104(8):1122-1141. DOI 10.3732/ajb.1700086.
Skinner R.H., Nelson C.J. Elongation of the grass leaf and its relationship to the phyllochron. Crop Sci. 1995;35(1):4-10. DOI 10.2135/cropsci1995.0011183X003500010002x.
Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell. 2002;14(Suppl. 1):S165-S183. DOI 10.1105/tpc.000596.
Yadav S.K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. Agron. Sustain. Dev. 2010;30(3):515-527. DOI 10.1051/agro/2009050.
Yang C., Ye Z. Trichomes as models for studying plant cell differentiation. Cell. Mol. Life Sci. 2013;70(11):1937-1948. DOI 10.1007/s00018-012-1147-6.

ORCID ID

U.S. Zubairova orcid.org/0000-0002-0730-9145

Паттерны и модели цветения некоторых видов семейства Campanulaceae Juss.

Э.С. Фомин¹✉, Т.И. Фомина²

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

² Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Настоящая работа посвящена фенологии индивидуального цветения и построению на ее основе структурно-динамических моделей этого процесса. Представлены результаты исследования фенологии цветения *Campanula bononiensis*, *C. sarmatica* и *Platycodon grandiflorus*. Полученные данные характеризуют фенологические признаки (время и продолжительность цветения, длительность жизни отдельного цветка) и структурные (степень ветвления соцветия, длина осей, число цветков, порядок их распускания), описывающие цветение монокарпического побега. Соцветия изученных видов удлинённые многоцветковые, относятся к характерному для Campanulaceae переходному типу и отличаются высокой вариабельностью всех структурных признаков. Результаты наблюдений были обработаны стандартными статистическими методами и использовались для построения стохастических компьютерных моделей цветения побегов, при этом пропуски в рядах наблюдений были восстановлены методом максимального правдоподобия. Выявлены паттерны цветения видов, обусловленные различиями фенологических и структурных признаков. Показано, что формы кривых цветения зависят от согласованности во времени распускания цветков на главной оси (1-го порядка) и боковых осях 2-го порядка. У *C. bononiensis* на кривой цветения отмечается один несимметричный пик с уширением слева, достигаемый при одновременном распускании цветков в верхней и нижней частях главной оси и на боковых осях в средней части соцветия, где цветки 1-го порядка уже отцвели (последние обеспечили уширение). У *C. sarmatica* и *P. grandiflorus* кривые цветения двухмодальные, при этом первый пик обусловлен распусканием цветков на главной оси, а второй – на боковых осях. Полученные модели с естественной вариабельностью воспроизводят картину цветения побегов и могут применяться для моделирования цветения группы особей (популяции), например, при ландшафтном проектировании. В комбинации с внешними программами визуализации их можно использовать для заполнения баз данных изображений синтетических растений на разных стадиях развития, которые применимы, например, для обучения нейронных сетей в задачах фенотипирования.

Ключевые слова: паттерны цветения; модели цветения; Campanulaceae; побег; соцветие; декоративные многолетники.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Фомин Э.С., Фомина Т.И. Паттерны и модели цветения некоторых видов семейства Campanulaceae Juss. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):845-855. DOI 10.18699/VJ18.33-0

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Fomin E.S., Fomina T.I. Patterns and models of flowering of some Campanulaceae Juss. species. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):845-855. DOI 10.18699/VJ18.33-0 (in Russian)

Received 20.03.2018
Accepted for publication 13.06.2018
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: fomin@bionet.nsc.ru

Patterns and models of flowering of some Campanulaceae Juss. species

E.S. Fomin¹✉, T.I. Fomina²

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

² Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia

The present work is devoted to the phenology of individual flowering and the construction of structure-dynamic models of this process on its basis. The results of the study of the flowering phenology of *Campanula bononiensis*, *C. sarmatica* and *Platycodon grandiflorus* are presented. The data obtained characterize both the phenological (time and duration of flowering, lifespan of individual flowers) and structural features (degree of branching of the inflorescence, length of floral axes, number of flowers, order of their blooming) that describe the flowering of a monocarpic shoot. Inflorescences of the species are elongated and multiflorous, of the compound type inherent for Campanulaceae, and characterized by a high variability of all structural features. Observation data were processed by standard statistical methods and used to construct stochastic computer models of flowering shoots, while omissions in data were restored by using the maximum likelihood method. Flowering patterns of the species, due to differences in phenological and structural features, have been revealed. It has been shown that flowering curves depend on the synchrony in the flowers blooming on the main (first-order) axis and lateral (second-order) axes. *C. bononiensis* has one asymmetrical peak with a broadening on the left, achieved with the simultaneous blooming of flowers in the upper and lower parts of the main axis and on lateral axes in the middle part of the inflorescence, where the first-order flowers have already finished blooming (they provided the broadening). Flowering curves for *C. sarmatica* and *P. grandiflorus* are bimodal, with the first peak being due to the flowers blooming on the main axis and the second one on lateral axes. The constructed models reproduce the patterns of individual flowering well, with natural variability, and can be used to simulate the flowering of a group of individuals (population), for example, in landscape design. In combination with visualization tools, they can be used for augmenting plant phenotyping datasets with rendered images of synthetic plants for the purpose of training neural networks in this field.

Key words: flowering patterns; flowering models; Campanulaceae; shoot; inflorescence; ornamental perennials.

Цветение – важнейшее событие в сезонном цикле развития растений, реализация которого в значительной степени определяет репродуктивный успех и служит одним из критериев адаптации вида к условиям обитания. Этот процесс может изучаться на разных уровнях организации – органном, индивидуальном, популяционном, фитоценоотическом, каждый из которых характеризуется своим набором задач и методов исследования (Левина, 1981; Primack, 1985; Жмылев и др., 2009).

В интродукции декоративных растений цветение изучается главным образом на уровне особи или группы особей и акцентировано на параметрах, обуславливающих декоративный эффект (сроки, продолжительность и интенсивность цветения, длительность жизни цветка, структура соцветий и порядок распускания в них цветков), а также корреляции этих параметров между собой и с экологическими условиями. При этом фенологическими датами начала и конца цветения отдельного цветка считаются визуально регистрируемые даты распускания и, соответственно, увядания околоцветника (венчика), а на более высоких уровнях – даты зацветания первого и последнего цветков (Левина, 1981).

Одним из способов описания динамики развития как растительного сообщества в целом, так и отдельных органов растения, являются фенологические кривые, отражающие изменение тех или иных признаков в течение вегетационного периода. Наибольшее признание среди них получили кривые цветения, параметры которых: время начала, средняя дата, максимум, продолжительность, синхронность зацветания (дисперсия) и асимметрия отражают филогенетический тип цветения (Rathke, Lacey, 1985). Ряд исследователей предложили прогностические модели фенологического развития, включая цветение, для различных таксономических и биоморфологических групп растений (Osawa et al., 1983; Chuine et al., 1998; Blionis et al., 2001; Normand et al., 2002). Показано, что для популяции общий характер кривой цветения описывается кривой плотности обобщенного асимметричного нормального распределения, для расчета параметров которого используется метод максимального правдоподобия (Clark, Thompson, 2011). Большинство существующих моделей описывают процесс цветения именно на уровне популяций, тогда как моделированию индивидуального цветения уделяется недостаточное внимание, что было отмечено в классической работе (Primack, 1985). Между тем фенология цветения обусловлена главным образом эндогенными факторами, но сроки его наступления и продолжительность существенно зависят от экологических условий (Серебряков, 1966; Зайцев, 1978; Ausin et al., 2005; Etwin, 2007), поэтому актуально изучение этого явления на организменном уровне.

Интерес к моделированию развития растений на уровне отдельного организма связан также с разработкой в последние годы автоматизированных систем фенотипирования растений, которые основаны на распознавании образов (Li et al., 2014; Афонников и др., 2016; Zhang et al., 2016; Cagganza-Rojas et al., 2017). Высокие затраты на сбор и аннотацию больших объемов данных, необходимых для настройки параметров распознающей нейронной сети, ограничивают развитие приложений в этой области. Для

снижения остроты проблемы можно использовать изображения, генерируемые компьютером в неограниченном количестве по заданной трехмерной модели растения (Ubbens et al., 2018). Несмотря на несомненные успехи трехмерного моделирования, подходы, основанные на правилах и ограничениях и не базирующиеся на реальных данных (Prusinkiewicz et al., 1993; Deussen et al., 1998; Ijiri et al., 2005), вряд ли можно считать подходящими, поскольку они имитируют, а не воспроизводят реальную вариабельность растений в структуре и динамике развития. Для решения этой задачи более приемлемыми являются развиваемые в последние годы подходы, основанные на реальных данных (Neubert et al., 2007; Zhang et al., 2014; Zheng et al., 2017).

Среди многообразия травянистых растений, благодаря высокой декоративности и значительному содержанию различных групп биологически активных веществ, интерес представляют виды семейства колокольчиковых (Campanulaceae Juss.) (Растительные ресурсы..., 1991; Халипова, 2005; Scariot et al., 2012). Для семейства характерны многоцветковые соцветия, структура которых сложная и весьма вариабельная, что затрудняет их типификацию. По мнению большинства авторов (Кузнецова и др., 1992; Викторова, 2000; Fomina, 2001; Балобанова, 2017), они принадлежат к переходному типу между рацемозными и цимозными соцветиями. Это подтверждается наличием у некоторых видов обоих типов соцветий, смешанным характером распускания цветков, многоцветковостью боковых осей. В рамках физиономического подхода простые соцветия Campanulaceae описываются как кистевидные, а сложные – как метельчатые. Соцветия у представителей семейства могут быть закрытыми, если главная ось заканчивается терминальным цветком, реже – открытыми. Порядок распускания цветков в них неодинаковый. В простых соцветиях первым раскрывается терминальный цветок, вторым – цветок, расположенный в нижней трети соцветия, дальнейшее распускание акропетальное или дивергентное. Другой вариант: первым зацветает базипетальный или расположенный в нижней трети цветок, далее порядок акропетальный или дивергентный, но терминальный цветок всегда опережает 2–4 нижерасположенных цветка. В сложных соцветиях общие закономерности цветения сохраняются; на боковых осях терминальный цветок раскрывается первым, далее распускание идет, как правило, акропетально.

Фенология индивидуального цветения растений определяется графиком распускания цветков и долговечностью отдельных цветков, а также закономерностями, обусловленными структурой соцветий (степень ветвления, длина боковых осей, число цветков, порядок их распускания). Исследование этих параметров во взаимосвязи обеспечивает возможность построения структурно-динамических моделей цветения особи или ее структурной единицы – побега. У травянистых многолетних растений имеется в виду побег с цветением, развивающийся из почки возобновления в течение одного вегетационного периода и называемый монокарпическим.

Цель настоящей работы – построение компьютерных моделей, основанных на данных наблюдений за цветением ряда видов семейства Campanulaceae, и исследование с

их помощью паттернов цветения на уровне отдельных побегов.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили колокольчик болонский *Campanula bononiensis* L., колокольчик сарматский *C. sarmatica* Ker-Gawl. и ширококолокольчик крупноцветковый *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. из коллекции

декоративных растений природной флоры Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (Новосибирск) (рис. 1). Это оригинальные красивоцветущие многолетники с продолжительным и обильным цветением, вполне адаптированные к условиям лесостепной зоны Западной Сибири (Фомина, 2012). Они характеризуются летнецветущим феноритмотипом с летними сроками начала цветения у *Campanula* (конец июня – середина июля) и

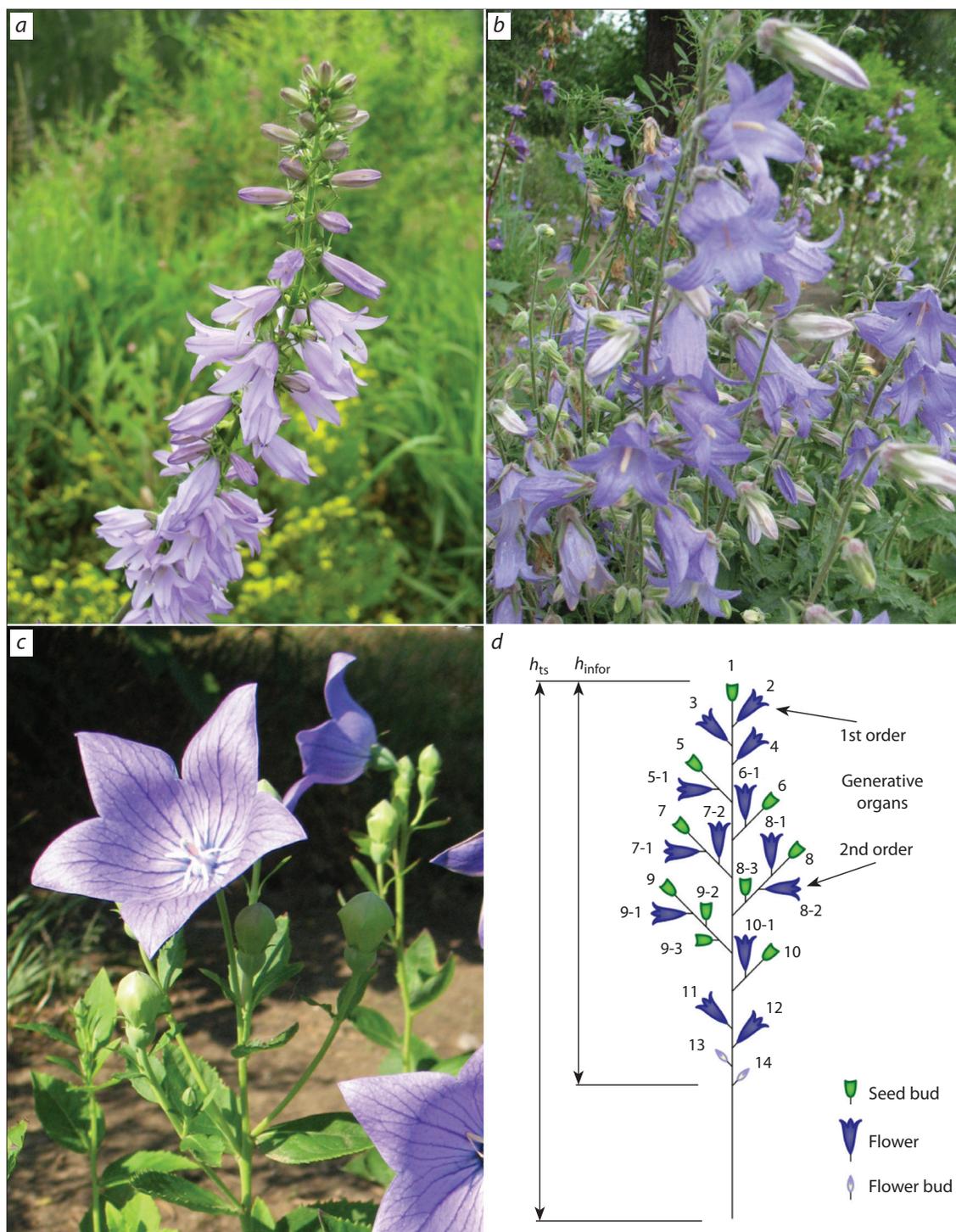


Fig. 1. General view of the inflorescences: a, *Campanula bononiensis*; b, *C. sarmatica*; c, *Platycodon grandiflorus*; d, inflorescence scheme for the Campanulaceae family (h_{ts} , total shoot height; h_{infor} , inflorescence height).

позднелетними – у *Platycodon* (вторая половина июля). У всех видов ежегодно формируются удлиненные вегетативно-генеративные побеги с терминальными многоцветковыми соцветиями.

Морфометрические показатели цветения и структуру соцветий каждого вида исследовали в течение четырех-шести лет. При описании соцветий использовали общепринятые методические подходы (Федоров, Артюшенко, 1979; Кузнецова и др., 1992). Фенологию индивидуального цветения изучали в 2007 г. на трех учетных побегах каждого вида. Наблюдения проводили регулярно, как правило, каждые три дня в течение всего периода цветения. Для каждого генеративного органа на побеге отмечали фазы бутонизации, начала цветения (раздвижение лепестков венчика), цветка, конца цветения (увядание и побурение венчика) и завязи (начало формирования плода). Нумерация цветков осуществлялась по порядку их расположения на главной оси соцветия сверху вниз, точно так же – на боковых осях: коротких – цветоножках и удлиненных – паракладиях (см. рис. 1, з). На уровне побега динамику цветения отмечали по следующим фенофазам: начало (распускание первого цветка), полное цветение (распустилось около половины цветков, появились первые завязи) и конец (последние 1–2 цветка).

Пропущенные данные в наблюдениях восстановлены методом максимального правдоподобия (см. ниже), при этом минимизация функции максимального правдоподобия выполнена с помощью алгоритма Бройдена–Флетчера–Гольдфарба–Шанно (BFGS), реализованного в библиотеке GSL (Galassi et al., 2009). Все графики и диаграммы построены в графической утилите gnuplot (Williams, Kelley, 2013). Схематические структуры побегов получены с использованием пакета расширения TikZ для системы верстки документов LaTeX (Tantau, 2010). Все расчеты, связанные с получением стандартных статистических параметров моделей и непосредственно с моделированием, сделаны в оригинальной программе на языке C++ в ОС Linux.

Восстановление пропущенных данных

Собранный исследовательский материал представляет собой совокупность записей, каждая из которых включает значения: идентификатор цветка, фазу развития, дату наблюдения. Поскольку наблюдения проводились в среднем раз в три дня, то из таких данных нельзя определенно сказать, когда началась и когда закончилась та или иная фаза развития каждого цветка. В лучшем случае известен промежуток времени между соседними датами наблюдений, который содержит дату смены фаз, а в худшем случае известна только одна из границ этого промежутка. Возникает вопрос, как уточнить имеющиеся данные и получить наиболее вероятные значения стандартных статистических параметров, таких как среднее значение продолжительности каждой фазы и ее среднеквадратичное отклонение.

Способ восстановления пропущенных данных продемонстрируем на примере произвольной фазы φ . Пусть мы имеем множество F объектов, состоящее из цветков выбранного вида растений, общим объемом в N элементов. Для любого i -го объекта из множества F у нас имеются

следующие данные: $\tau_{\alpha 1}^{(i)}$ – последняя дата, когда фаза φ для объекта i еще не наблюдалась, $\tau_{\alpha 2}^{(i)}$ – первая дата, когда объект i был обнаружен в заданной фазе φ , $\tau_{\beta 1}^{(i)}$ – последняя дата наблюдения фазы φ и $\tau_{\beta 2}^{(i)}$ – первая дата, когда объект i был обнаружен в следующей фазе развития $\varphi' \neq \varphi$. То есть для каждого объекта есть четыре значения, представляющие границы двух интервалов: $[\tau_{\alpha 1}^{(i)}, \tau_{\alpha 2}^{(i)}]$ – интервал появления фазы φ и $[\tau_{\beta 1}^{(i)}, \tau_{\beta 2}^{(i)}]$ – интервал завершения фазы φ . Таким образом, продолжительность фазы φ для i -го объекта составляет от $\tau_{\beta 1}^{(i)} - \tau_{\alpha 2}^{(i)}$ до $\tau_{\beta 2}^{(i)} - \tau_{\alpha 1}^{(i)}$ дней.

Допустим, что продолжительность Δt фазы φ для объектов множества F подчиняется нормальному распределению с плотностью вероятности $P(\Delta t | \mu, \sigma)$, с неизвестными средним значением μ и среднеквадратичным отклонением σ . Для получения статистических параметров μ и σ воспользуемся методом максимального правдоподобия.

Если начало фазы для i -го объекта происходит в момент времени $\tau_{\alpha}^{(i)} \in [\tau_{\alpha 1}^{(i)}, \tau_{\alpha 2}^{(i)}]$ и завершение – в момент времени $\tau_{\beta}^{(i)} \in [\tau_{\beta 1}^{(i)}, \tau_{\beta 2}^{(i)}]$, то продолжительность фазы равна $\Delta t^{(i)} = \tau_{\beta}^{(i)} - \tau_{\alpha}^{(i)}$. Вероятность наблюдения такого случая согласно нормальному распределению равна

$$P(\tau_{\alpha}^{(i)}, \tau_{\beta}^{(i)} | \mu, \sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{\left(\tau_{\beta}^{(i)} - \tau_{\alpha}^{(i)} - \mu\right)^2}{2\sigma^2}\right].$$

Оценка полной вероятности того, что все N объектов будут иметь заданные для них значения $\tau_{\alpha}^{(i)}$ и $\tau_{\beta}^{(i)}$, равна

$$P(\tau_{\alpha}^{(1)}, \tau_{\beta}^{(1)}, \tau_{\alpha}^{(2)}, \tau_{\beta}^{(2)}, \dots, \tau_{\alpha}^{(N)}, \tau_{\beta}^{(N)} | \mu, \sigma) = \prod_{i=1}^N P(\tau_{\alpha}^{(i)}, \tau_{\beta}^{(i)} | \mu, \sigma).$$

Полученная оценка вероятности $P(\tau_{\alpha}^{(1)}, \tau_{\beta}^{(1)}, \tau_{\alpha}^{(2)}, \tau_{\beta}^{(2)}, \dots, \tau_{\alpha}^{(N)}, \tau_{\beta}^{(N)} | \mu, \sigma)$ является функцией правдоподобия для данной задачи. Ее максимизация относительно неизвестных значений параметров позволяет найти такое распределение, которое наилучшим способом описывает данные наблюдений.

Заметим, что в вычислениях удобнее искать не максимум функции P , а минимум логарифма этой функции с обратным знаком, т. е. функции L_2 :

$$L_2 = -\ln(P(\tau_{\alpha}^{(1)}, \tau_{\beta}^{(1)}, \tau_{\alpha}^{(2)}, \tau_{\beta}^{(2)}, \dots, \tau_{\alpha}^{(N)}, \tau_{\beta}^{(N)} | \mu, \sigma)),$$

или, раскрывая логарифм,

$$L_2 = N \ln(\sigma) + \frac{1}{2\sigma^2} \sum_{i=1}^N (\tau_{\beta}^{(i)} - \tau_{\alpha}^{(i)} - \mu)^2.$$

Для обеспечения условия, что переменные $\tau_{\alpha}^{(i)}$ и $\tau_{\beta}^{(i)}$ принадлежат известным из наблюдений временным интервалам: $\tau_{\alpha}^{(i)} \in [\tau_{\alpha 1}^{(i)}, \tau_{\alpha 2}^{(i)}]$ и $\tau_{\beta}^{(i)} \in [\tau_{\beta 1}^{(i)}, \tau_{\beta 2}^{(i)}]$, добавим к функции L_2 регуляризационный член L_{req} вида

$$L_{\text{req}} = \frac{C_{\text{req}}}{2} \left[\begin{aligned} & \sum_{i=1}^N (\tau_{\alpha}^{(i)} - \tau_{\alpha 1}^{(i)})^2, \text{ if } \tau_{\alpha}^{(i)} < \tau_{\alpha 1}^{(i)} \\ & \sum_{i=1}^N (\tau_{\alpha}^{(i)} - \tau_{\alpha 2}^{(i)})^2, \text{ if } \tau_{\alpha}^{(i)} > \tau_{\alpha 2}^{(i)} \\ & 0, \text{ otherwise} \end{aligned} \right] + \left[\begin{aligned} & \sum_{i=1}^N (\tau_{\beta}^{(i)} - \tau_{\beta 1}^{(i)})^2, \text{ if } \tau_{\beta}^{(i)} < \tau_{\beta 1}^{(i)} \\ & \sum_{i=1}^N (\tau_{\beta}^{(i)} - \tau_{\beta 2}^{(i)})^2, \text{ if } \tau_{\beta}^{(i)} > \tau_{\beta 2}^{(i)} \\ & 0, \text{ otherwise} \end{aligned} \right],$$

где коэффициент регуляризации $C_{\text{req}} > 0$ является произвольным положительным вещественным числом. Регуляризационный член L_{req} не влияет на значение целевой функции $L = L_2 + L_{\text{req}}$, если все коэффициенты $\tau_\alpha^{(i)}$ и $\tau_\beta^{(i)}$ удовлетворяют необходимым условиям, однако за выход переменных из заданных диапазонов налагает на нее «штраф» $\frac{1}{2} C_{\text{req}} \Delta \tau_i^2$, квадратично зависящий от «степени нарушения» $\Delta \tau_i^2$.

Аргументы $\{\tau_\alpha^{(1)}, \tau_\beta^{(1)}, \tau_\alpha^{(2)}, \tau_\beta^{(2)}, \dots, \tau_\alpha^{(N)}, \tau_\beta^{(N)}, \mu, \sigma\}$, при которых функция L , называемая также функцией потерь, достигает минимума, являются решением данной задачи:

$$\{\tau_\alpha^{(1)}, \tau_\beta^{(1)}, \tau_\alpha^{(2)}, \tau_\beta^{(2)}, \dots, \tau_\alpha^{(N)}, \tau_\beta^{(N)}, \mu, \sigma\} = \operatorname{argmin}(L_2 + L_{\text{req}}).$$

Результаты и обсуждение

Особенности цветения

По результатам наших многолетних исследований структуры соцветий, порядка распускания в них цветков, продолжительности цветения отдельного цветка и соцветия в целом получены следующие характеристики видов.

Campanula bononiensis. Соцветие – закрытая или открытая фрондулезная кисть (см. рис. 1, а). Ветвление до осей 2-го порядка, на отдельных побегах возможно формирование единичных осей 3-го порядка в нижней части соцветия. Число узлов в зоне соцветия варьирует в пределах 15–80. Верхняя часть главной оси несет цветки только 1-го порядка (8–29 шт.). Далее по направлению вниз в узлах соцветия появляется по 1–5 боковых цветков. Форма кисти колосовидная за счет сильно удлиненной главной оси, коротких боковых осей (цветоножек) и сближенных узлов соцветия. В редких случаях отмечается развитие удлиненных боковых осей (до 16 см) в нижней части соцветия, несущих до 6–13 цветков или один верхушечный цветок. В первом случае парциальное соцветие может быть как закрытым, так и открытым. При развитии группы удлиненных паракладиев соцветие приобретает форму кистевидно-метельчатого. Цветение начинается в средней части или нижней трети соцветия и распространяется дивергентно, одновременно с ростом главной оси. Цветение многоцветковых паракладиев акропетальное. Распускание цветков дружное: максимум достигается спустя 3–5 дней от начала цветения; в фазу полного цветения, в зависимости от развитости соцветия, одновременно раскрыты 12–39 цветков. Продолжительность жизни одного цветка составляет 2–4 дня, продолжительность цветения побега – 15–25 дней.

Campanula sarmatica. Соцветие – закрытая однобокая фрондулезная кисть, простая или с ветвлением осей до 2-го порядка (см. рис. 1, б). В сложных кистях верхние 3–9 цветков 1-го порядка, ниже образуются боковые цветки в числе 1–2, затем в числе 3–5, т. е. наиболее развитые боковые оси (до 13.5 см длиной) расположены в нижней части соцветия. Последнее состоит из 6–19 узлов. Порядок цветения побега различный, часто базипетальный. Иногда цветение начинается с терминального цветка, сопровождаемого 3–4 цветками в нижней трети соцветия, далее идет дивергентно. На паракладиях порядок цветения смешанный. В целом цветение побега растянутое, при этом темпы распускания цветков в верхней половине соцветия могут существенно опережать их появление в нижней. Длительность жизни одного цветка составляет 2–4 дня, продолжительность цветения побега – около 15 дней.

Platycodon grandiflorus. Соцветие – закрытая фрондузная кисть с ветвлением осей до 2-го порядка (см. рис. 1, в). Число узлов соцветия варьирует в пределах 4–17. На главной оси до зоны ветвления развивается 2–5 цветков, на боковых осях их число не превышает 1–3. Порядок цветения всех осей побега базипетальный. Лишь на главной оси отмечается некоторое нарушение последовательности распускания, когда 1–3 цветка под терминальным отстают от нижерасположенных цветков. Характер распускания постепенный, при этом длительность жизни одного цветка составляет 7–10 дней, т. е. значительно больше, чем у видов *Campanula*. Это обуславливает продолжительное, около 1.5 месяца, цветение побега.

Некоторые показатели, характеризующие цветение и, следовательно, декоративные качества исследованных видов, приведены в табл. 1. Объем выборки для расчета параметров составлял от 10 до 50 измерений. Вариабельность большинства показателей высокая, особенно касающихся соцветий – их высоты и числа цветков, тогда как размеры цветков менее изменчивы.

Модели цветения побегов

Возможность построения структурно-динамических моделей цветения побегов основывается на метамерности организации последних и наличии устойчивых взаимосвязей между положением цветков в соцветии и временем их распускания. В силу высокой вариабельности всех признаков растений в процессе роста и развития, подобные модели неизбежно являются стохастическими, причем наблюдаемые повторяемости структуры в них описываются функциями распределения случайных величин, а

Table 1. Morphometric indices of flowering in species of the Campanulaceae family

Index	<i>C. bononiensis</i>		<i>C. sarmatica</i>		<i>P. grandiflorus</i>	
	$M \pm m$	lim (V, %)	$M \pm m$	lim (V, %)	$M \pm m$	lim (V, %)
Total shoot height, cm	111.7 ± 4.8	55–170 (28.8)	65.3 ± 2.3	36–90 (21.4)	49.7 ± 2.5	31–70 (21.5)
Inflorescence height, cm	39.0 ± 2.2	12–81 (38.7)	41.3 ± 2.7	15–73 (39.6)	16.4 ± 1.8	8–35 (47.2)
Flowers per inflorescence	112 ± 10	34–267 (51.1)	12 ± 1	6–25 (42.2)	9 ± 1	4–16 (42.9)
Corolla height, cm	1.72 ± 0.02	1.5–2.0 (8.2)	3.08 ± 0.11	2.5–3.5 (11.1)	5.28 ± 0.18	3.7–6.7 (14.7)
Corolla diameter, cm	1.74 ± 0.04	1.1–2.2 (15.3)	3.85 ± 0.07	3.4–4.1 (5.6)	7.00 ± 0.30	4.5–9.1 (17.9)

Table 2. Structural indices of shoots examined

Index	<i>C. bononiensis</i>	<i>C. sarmatica</i>	<i>P. grandiflorus</i>
	$M \pm \sigma [n]$	$M \pm \sigma [n]$	$M \pm \sigma [n]$
n_1	44.0 ± 11.9	11.7 ± 8.2	12.3 ± 2.9
n_2	62.3 ± 29.6	15.7 ± 12.7	15.3 ± 6.2
k_1	2.3 ± 1.1 ⁺ [81]	2.0 ± 1.0 ⁺ [23]	1.6 ± 0.5 [28]
n_{inflor}	13.0 ± 4.0	5.6 ± 1.2	1.7 ± 0.5
n_{parac}	30.8 ± 14.5	8.0 ± 5.7	11.7 ± 1.9
n_{single}	0.7 ± 0.9	0.3 ± 0.4	0.7 ± 0.5

Designations: n_1 , the number of flowers on the ascending axis (1st order); n_2 , number of flowers on 2nd-order axes; k_1 , mean number of flowers on 2nd-order axes; n_{inflor} , mean number of flowers on the ascending axis to the inflorescence branching; n_{parac} , mean number of 2nd-order axes; n_{single} , mean number of flowers on the ascending axis below the inflorescence branching. For each index, values averaged over examined shoots are presented.

Table 3. Flowering-related indices of shoots examined

Index	<i>C. bononiensis</i>	<i>C. sarmatica</i>	<i>P. grandiflorus</i>
	$M \pm \sigma [n]$	$M \pm \sigma [n]$	$M \pm \sigma [n]$
n_{start}	31.3 ± 5.1	8.7 ± 0.6	4.7 ± 0.2
w_{start}	11.3 ± 3.1	3.3 ± 1.7	2.0 ± 0.8
Δt_{term}	8.9 ± 4.8	-0.3 ± 0.4	-7.6 ± 3.4
Δt_{up}	14.0 ± 2.2	5.0 ± 3.6	9.4 ± 3.4
Δt_{down}	15.1 ± 3.4	3.8 ± 3.0	16.2 ± 3.4
Δt_2	13.0 ± 3.0	9.9 ± 2.1	26.8 ± 3.0
Δt_{flower}	3.7 ± 1.0 [324]	3.5 ± 0.5 [82]	6.9 ± 2.9 [84]
Δt_{bud}	5.4 ± 1.5 [202]	3.7 ± 0.5 [54]	13.2 ± 4.0 [70]

Designations: n_{start} , order number of the nonterminal flower that effloresced first; w_{start} , the number of flowers efflorescing concurrently with n_{start} ; Δt_{term} , time from the efflorescence of n_{start} to the start of the terminal flower efflorescence, a negative value indicates that the terminal flower effloresced first; Δt_{up} , time from the efflorescence of n_{start} to the efflorescence of the last flower on the ascending axis above the branching zone; Δt_{down} , time from the efflorescence of n_{start} to the efflorescence of the last flower on the ascending axis below the branching zone; Δt_2 , time from the efflorescence of the first flower on 2nd-order axes to the efflorescence of the last on the same axes; Δt_{flower} , mean lifetime of one flower; Δt_{bud} , mean duration of bud development. For each index, values averaged over examined shoots are presented.

взаимосвязи «положение цветка—время его распускания» – регрессионными зависимостями. Особое положение в соцветии занимает терминальный цветок, распускание которого не подчиняется закономерностям, отмеченным для остальных цветков, поэтому он учитывается в модели отдельно.

Параметры модели получены статистической обработкой имеющегося массива данных наблюдений (более 4300 контрольных точек) и представлены в виде пар $M \pm \sigma$ (среднее значение ± среднеквадратическое отклонение). Дополнительно для каждого параметра указано

Table 4. Regression parameters of shoots examined associated with flowering dynamics

Index	<i>C. bononiensis</i>	<i>C. sarmatica</i>	<i>P. grandiflorus</i>
	$M \pm \sigma [n]$	$M \pm \sigma [n]$	$M \pm \sigma [n]$
a_{up}	0.78 ± 0.07 [74]	1.31 ± 0.03 [11]	2.31 ± 0.01 [7]
b_{up}	-0.68 ± 0.12 [74]	-1.32 ± 0.01 [11]	-2.27 ± 0.01 [7]
a_{down}	0.05 ± 0.08 [24]	0.25 ± 0.01 [13]	0.68 ± 0.15 [24]
b_{down}	0.86 ± 0.06 [24]	0.42 ± 0.01 [13]	0.41 ± 0.19 [24]
a_2	0.50 ± 0.15 [187]	0.57 ± 0.06 [40]	0.23 ± 0.17 [37]
b_2	-0.68 ± 0.04 [187]	-0.40 ± 0.15 [40]	0.26 ± 0.46 [37]

Designations: a , b , coefficients in the regression equation $t = a + bx$; a_{up} , b_{up} are coefficients of the regression equation describing the order of efflorescence on the ascending axis above the branching zone calculated with respect to n_{start} (Table 3); a_{down} , b_{down} , ditto, below the branching zone; a_2 , b_2 , coefficients of the regression equation describing the order of efflorescence on lateral axes calculated with respect to the start of efflorescence on the axis.

число точек n , использованных для их получения. Для тех параметров, при расчете которых было доступно не более трех точек, их число не указано. В табл. 2 и 3 для каждого признака учетного побега приведены параметры его функции плотности распределения, а в табл. 4 – набор коэффициентов a и b линейных регрессионных отношений $t = a + bx$ для каждой взаимосвязи «положение цветка x —время его распускания t ». Параметры модели описывают:

- структуру соцветия учетного побега – число цветков на главной оси (1-го порядка), число цветков на боковых осях 2-го порядка (см. табл. 2);
- динамику цветения учетного побега – число и локализацию цветков, распускающихся первыми; период от начала цветения первых цветков до начала цветения последних в различных зонах соцветия; среднюю продолжительность жизни цветка (см. табл. 3);
- регрессионные отношения между временем распускания цветков на осях 1-го и 2-го порядков и их положением в соцветии (см. табл. 4).

При построении регрессионных зависимостей использовались относительные величины, как по положению цветков, так и по времени распускания: положение цветков на главной оси отсчитывалось от нетерминального цветка, зацветающего первым; положение цветков на осях 2-го порядка – от цветка на верхушке оси; время распускания цветков на главной оси – относительно времени распускания первого нетерминального цветка; время распускания цветков на осях 2-го порядка – от времени распускания цветка на верхушке соответствующей оси. Все коэффициенты регрессии получены при нормировании массивов точек к единичным интервалам по абсциссе и ординате. Используемые нормировки позволяют максимальным образом свести друг к другу данные с различных учетных побегов при заметном снижении дисперсии, которая остается неучтенной регрессионными прямыми. Коэффициенты детерминации (R^2), которые показывают долю учтенной регрессионными прямыми дисперсии, для цветков на главной оси в зоне выше первого цветущего

нетерминального цветка равны $R_{up}^2 = \{0.742, 0.927, 0.774\}$; на них же, но в зоне ниже этого цветка $R_{down}^2 = \{0.880, 0.269, 0.386\}$; для цветков на осях 2-го порядка $R_2^2 = \{0.354, 0.200, 0.035\}$ – для *C. bononiensis*, *C. sarmatica* и *P. grandiflorus* соответственно. Все рассчитанные коэффициенты, за единственным исключением R_2^2 для *P. grandiflorus*, значимы по *t*-критерию Стьюдента. Значения коэффициентов детерминации показывают, что последовательность распускания цветков у всех исследованных видов только в верхней части соцветия с хорошей точностью подчиняется линейному соотношению, а в нижней части и для цветков 2-го порядка эти зависимости ослабевают (так, для *P. grandiflorus* зацветание цветков 2-го порядка хаотично).

Несмотря на то что часть учетных данных описывается асимметричными распределениями, в модели асимметричность не учитывается. Параметры модели, полученные из таких распределений, помечены символом «+». Дополнительно следует отметить наличие систематической ошибки в параметре Δt_{bud} (средняя продолжительность развития бутона) в силу неопределенности даты начала бутонизации.

Алгоритм генерации случайного модельного побега из функций распределения и регрессионных отношений состоит из следующих шагов:

- 1) генерация структуры соцветия – число цветков на оси 1-го порядка до зоны ветвления соцветия n_{inflow} и ниже этой зоны n_{single} , число осей 2-го порядка n_{parac} и цветков на каждой из них k_1 (единичные цветки на осях 3-го порядка не были учтены) согласно соответствующим распределениям;
- 2) генерация порядкового номера нетерминального цветка, зацветающего первым n_{start} , и числа цветков w_{start} , одновременно цветущих с ним;
- 3) для каждого цветка (сперва для всех цветков 1-го порядка, затем для цветков 2-го порядка):
 - а) генерация даты начала цветения t_{start} , что включает:
 - расчет относительного расстояния x до цветка, цветущего первым;
 - выбор регрессионного отношения в зависимости от зоны локализации;
 - получение допустимого диапазона и генерация случайной даты начала цветения t_{start} в этом диапазоне;
 - б) генерация продолжительности жизни Δt_{flower} ;
 - в) генерация продолжительности фазы бутонизации Δt_{bud} и установка даты ее начала путем обратного сдвига от даты начала цветения t_{start} ;
- 4) прохождение по циклу всех возможных дат развития побега и извлечение на каждую дату текущей фазы для каждого цветка (в случае неопределенности фазы для ранних дат считается, что бутон еще не сформировался, а для поздних дат – что он перешел в фазу завязывания плода).

Проверка адекватности полученной модели сделана путем сравнения кривых цветения, полученных из учетных данных и моделированием. Для моделирования использовались выборки из 1 000 случайных модельных побегов. Размер выборки подбирался таким, чтобы обеспечить повторяемость характера кривых цветения, построенных на разных выборках. Набор данных, необходимых для

построения диаграмм и схем цветения (массив записей, определяющий локализацию каждого цветка на побеге и на каждую дату – фазу его развития), получался усреднением. Кривые цветения получены суммированием числа раскрытых цветков на каждую дату. Результаты расчетов для *C. bononiensis*, *C. sarmatica* и *P. grandiflorus*, включая также для сравнения результаты наблюдений учетных побегов, представлены на рис. 2–4.

На всех рисунках для диаграмм и кривых цветения используется единая ось абсцисс, на которой указано время в днях от начала цветения побега. Кривые цветения привязаны к левой оси ординат, показывают число открытых цветков n_t на заданную дату и получены сглаживанием с помощью кубических сплайнов. Диаграммы привязаны к правой оси ординат и указывают диапазоны дат цветения каждого цветка. Значения на правой оси ординат, обозначающие номера цветков, возрастают в направлении сверху вниз, поскольку их нумерация начинается от терминального цветка. Начало цветения t_s отмечается кружком, а его продолжительность Δt – отрезком соответствующей длины. Цветки, локализованные на побегах 1-го и 2-го порядков, дополнительно различаются с помощью верхнего индекса $i = \{1, 2\}$. Цветки, локализованные на побегах 2-го порядка, привязаны по оси ординат к соответствующему номеру цветка 1-го порядка. В правой части рис. 2–4 приведены схемы соцветий тех же побегов в динамике цветения: a – начало, b – полное, c – конец. В левой части рисунков сделана привязка фаз цветения по датам к кривым цветения. Схемы соцветий используются для визуализации результатов наблюдений и данных, сгенерированных моделью. Усреднение данных для модельного побега приводит к снижению уровня детализации кривых цветения.

C. bononiensis (рис. 2). Наблюдается качественное совпадение диаграмм и кривых цветения для учетного и модельного побегов с коэффициентом корреляции между кривыми цветения 0.83. Общий характер кривой цветения – один несимметричный пик с уширением (до 3 дней) с левой стороны. Уширение обусловлено распусканием цветков, локализованных на главной оси соцветия. Пик достигается при одновременном распускании цветков в верхней и нижней частях главной оси и на боковых осях в средней части соцветия, где цветки 1-го порядка уже отцвели. При этом максимум цветения смещен к концу кривой; период от начала цветения до максимума равен 10 дням, а от максимума до конца цветения – 4.

C. sarmatica (рис. 3). Наблюдается качественное совпадение диаграмм и кривых цветения для учетного и модельного побегов с коэффициентом корреляции между кривыми цветения 0.77. Общий характер кривой цветения двухмодальный, причем первый пик обусловлен цветением главной оси, а второй – осей 2-го порядка. В случае простой кисти кривая цветения будет одновершинной. Распускание растянутое, поскольку цветки на боковых осях зацветают после того, как большая часть их на главной оси отцвела. Из-за отсутствия наложения пиков характер кривой цветения заметно отличается от таковой для *C. bononiensis*. Максимумы цветения не смещены, с равными промежутками (4 дня) от начала цветения до первого максимума, от первого максимума до второго

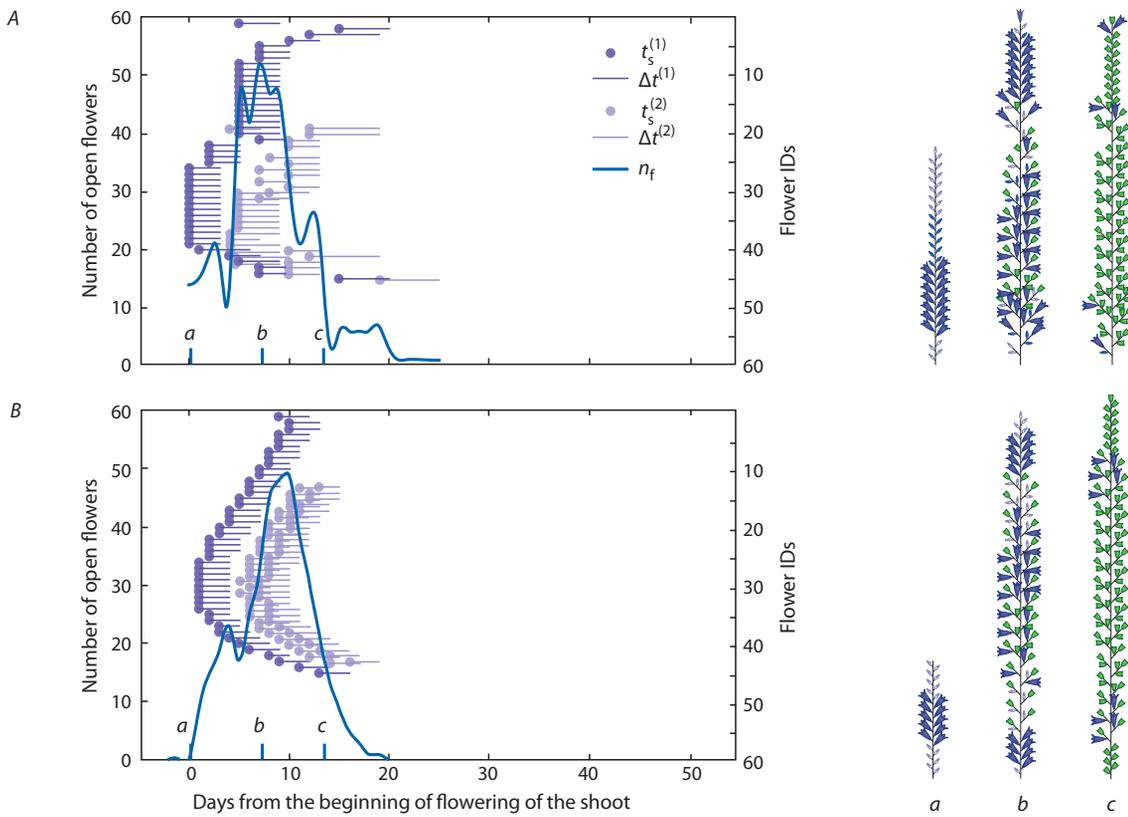


Fig. 2. Graphs and flowering curves (left), inflorescence schemes (right) of *C. bononiensis* for (A) an examined shoot and (B) a model shoot. Flowering phenophases: *a*, beginning; *b*, maximum; *c*, end.

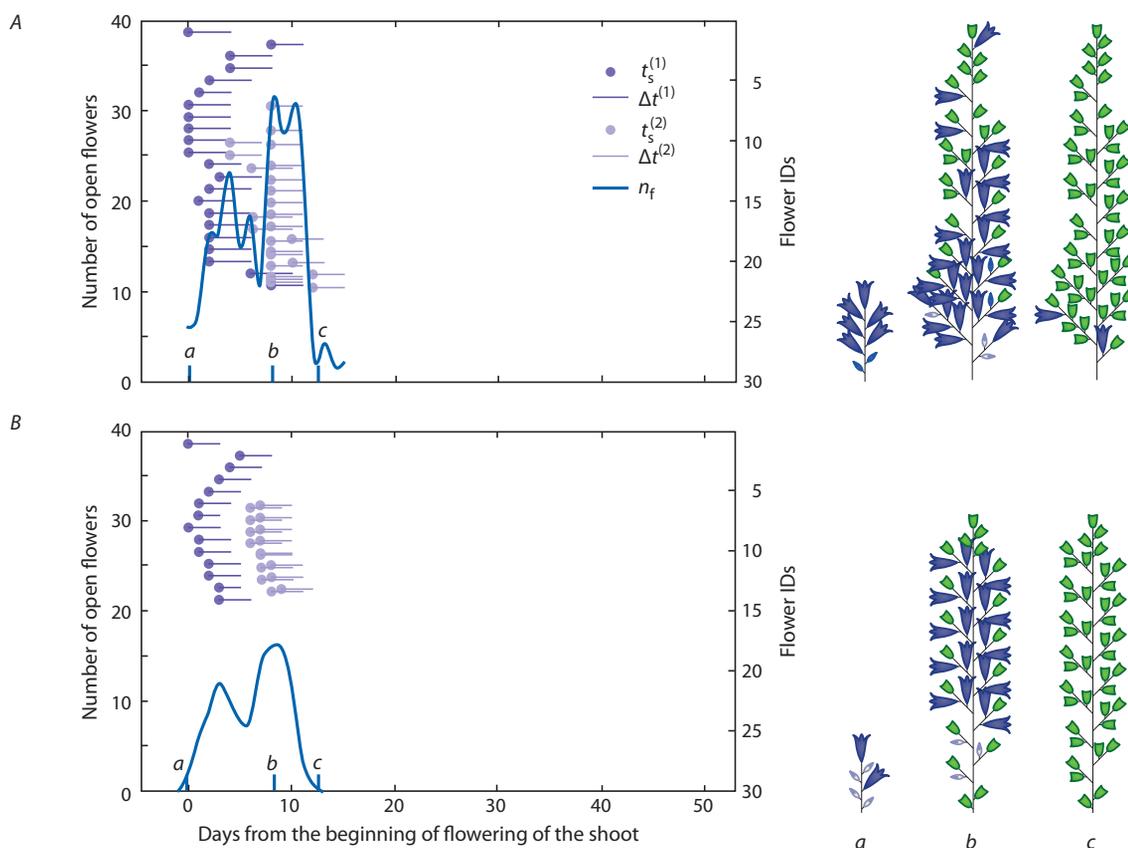


Fig. 3. Graphs and flowering curves (left), inflorescence schemes (right) of *C. sarmatica* for (A) an examined shoot and (B) a model shoot. Flowering phenophases: (*a*) beginning, (*b*) maximum, (*c*) end.

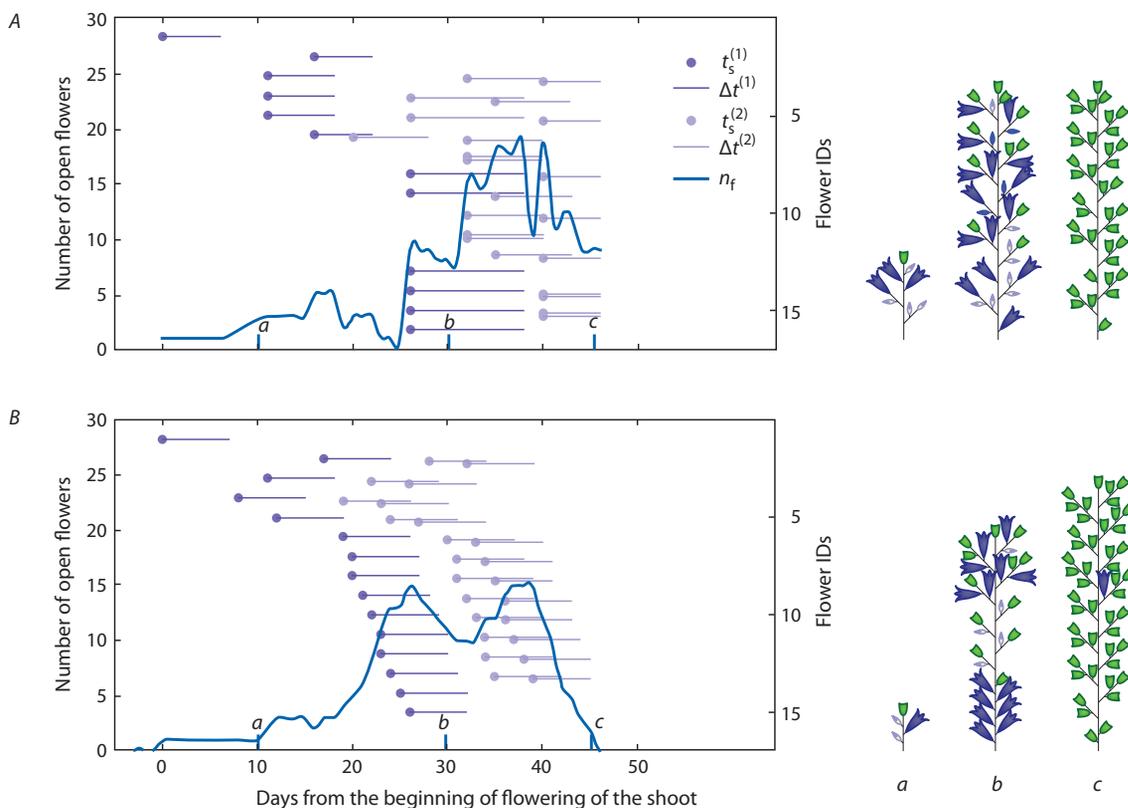


Fig. 4. Graphs and flowering curves (left), inflorescence schemes (right) of *P. grandiflorus* for (A) an examined shoot and (B) a model shoot. Flowering phenophases: (a) beginning, (b) maximum, (c) end.

и от второго максимума до конца цветения. Совпадение между структурами учетного и модельного побегов несколько хуже, чем у *C. bononiensis*. Не воспроизводится пропорция в числе цветков на осях 2-го порядка в верхней и нижней частях соцветия. Это связано с простотой модели, в которую не были включены регрессии, описывающие подобную зависимость.

P. grandiflorus (рис. 4). Наблюдается качественное совпадение диаграмм и кривых цветения для учетного и модельного побегов с коэффициентом корреляции 0.65. Общий характер кривой цветения, как и для *C. sarmatica*, двухмодальный. Первый пик обусловлен распусканием цветков 1-го порядка, второй – цветков на боковых осях. В отличие от *C. sarmatica*, отмечается сильная задержка цветения всего побега после распускания терминального цветка. Первый максимум смещен на 28 дней от начала цветения, период между пиками равен 12 дням, тогда как период от второго максимума до конца цветения составляет всего 4 дня.

Заключение

Исследована индивидуальная фенология цветения травянистых многолетних растений *Campanula bononiensis*, *C. sarmatica* и *Platycodon grandiflorus* в связи с особенностями структуры соцветий. Выявлены паттерны цветения видов, характеризующие фенологическими признаками (время и продолжительность цветения, длительность жизни отдельного цветка) и структурными (степень ветвления соцветия, длина боковых осей, число цветков, порядок

их распускания). С использованием этих параметров построены компьютерные модели цветения структурной единицы особи – монокарпического побега. Основанием для построения таких моделей являются, во-первых, метамерность побега и его флоральной зоны, которая описывается функциями распределения случайных величин (стохастически); во-вторых, наличие устойчивых взаимосвязей между положением цветков в соцветии и временем их распускания, описываемое регрессионными зависимостями.

Созданные на базе реальных данных модели с естественной вариабельностью воспроизводят картину цветения побегов и могут быть расширены. Например, возможно моделирование цветения группы особей (популяции) при проектировании декоративных композиций путем генерации множества побегов и различных дат начала цветения для них. На основании сгенерированных схем соцветий с использованием программ визуализации возможно построение баз данных синтетических изображений, которые могут применяться для ряда задач, в том числе для обучения нейронных сетей в автоматизированных системах фенотипирования растений, основанных на распознавании образов. Кривые цветения отражают эндогенную ритмику этого процесса у исследованных видов, но реализованную при адаптации к конкретным экологическим условиям, и потому могут рассматриваться как новый фенотипический признак для описания биоморф. Используемые в работе методические подходы применимы для построения моделей цветения других

полезных растений в рамках изучения и сохранения биоразнообразия.

Acknowledgements

The study was performed with materials from the Bioresource Scientific Collection of the Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the RAS, Unique Research Facility “Field and Greenhouse Collections of Living Plants”, USU 440534. The work was supported by State Budgeted Projects 0312-2016-0003 and 0324-2018-0017.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Афонников Д.А., Генаев М.А., Дорошков А.В., Комышев Е.Г., Пшеничникова Т.А. Методы высокопроизводительного фенотипирования растений для массовых селекционно-генетических экспериментов. *Генетика*. 2016;52(7):788-803. DOI 10.7868/S001667581607002X. [Afonnikov D.A., Genaev M.A., Doroshkov A.V., Komyshev E.G., Pshenichnikova T.A. Methods of high-throughput plant phenotyping for large-scale breeding and genetic experiments. *Russ. J. Genet.* 2016;52(7):688-701. DOI 10.1134/S1022795416070024.]
- Балобанова Н.П. Вариабельность распускания соцветий некоторых представителей семейства Campanulaceae Juss. *Естеств. и техн. науки*. 2017;10(112):11-14. [Balobanova N.P. The variability of inflorescence opening in some representatives of the Campanulaceae family. *Estestvennyye i Tekhnicheskie Nauki = Natural and Technical Sciences*. 2017;10(112):11-14. (in Russian)]
- Викторов В.П. Морфология и основные направления эволюции соцветий в роде *Campanula* (Campanulaceae). *Ботан. журн.* 2000; 4(85):80-90. [Viktorov V.P. Morphology and the main directions of the evolution of inflorescences in the *Campanula* (Campanulaceae) genus. *Botanicheskii Zhurnal = Journal of Botany*. 2000;4(85):80-90. (in Russian)]
- Жмылев П.Ю., Карпухина Е.А., Жмылева А.П. Вторичное цветение: индукция и нарушение развития. *Журн. общ. биологии*. 2009;70(3):262-272. [Zhmylev P.Yu., Karpuhina E.A., Zhmyleva A.P. Secondary flowering: induction and development abnormalities. *Zhurnal Obshchey Biologii = Journal of General Biology*. 2009; 70(3):262-272. (in Russian)]
- Зайцев Г.Н. Фенология травянистых многолетников. М.: Наука, 1978. [Zaitsev G.N. Phenology of Herbaceous Perennials. Moscow: Nauka Publ., 1978. (in Russian)]
- Кузнецова Т.В., Пряхина Н.И., Яковлев Г.П. Соцветия. Морфологическая классификация. СПб., 1992. [Kuznetsova T.V., Pryakhina N.I., Yakovlev G.P. Inflorescences: Morphological Classification. St. Petersburg, 1992. (in Russian)]
- Левина Р.Е. Репродуктивная биология семенных растений: Обзор проблемы. М.: Наука, 1981. [Levina R.E. Reproductive Biology of Seed Plants: a Review. Moscow: Nauka Publ., 1981. (in Russian)]
- Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Hippuridaceae–Lobeliaceae. Отв. ред. П.Д. Соколов. СПб.: Наука, 1991. [Sokolov P.D. (Ed.). Plant Resources of the USSR: Flowering Plants, Chemical Composition and Use. Families Hippuridaceae–Lobeliaceae. St. Petersburg: Nauka Publ., 1991. (in Russian)]
- Серебряков И.Г. Соотношение внутренних и внешних факторов в годичном ритме развития растений. *Ботан. журн.* 1966;51(7):923-938. [Serebryakov I.G. The ratio of internal and external factors in the annual rhythm of plant development. *Botanicheskii Zhurnal = Journal of Botany*. 1966;51(7):923-938. (in Russian)]
- Федоров Ал.А., Артюшенко З.Т. Атлас по описательной морфологии высших растений. Соцветие. Л.: Наука, 1979. [Fedorov Al.A., Artyushenko Z.T. Atlas on the Descriptive Morphology of Higher Plants: Inflorescence. Leningrad: Nauka Publ., 1979. (in Russian)]
- Фомина Т.И. Биологические особенности декоративных растений природной флоры в Западной Сибири. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2012. [Fomina T.I. Biological Features of Ornamental Plants of the Natural Flora in Western Siberia. Novosibirsk: Geo Publ., 2012. (in Russian)]
- Халипова Г.И. Колокольчики. М.: АСТ, 2005. [Khalipova G.I. Bellflowers. Moscow: AST Publ., 2005. (in Russian)]
- Ausin I., Alonso-Blanco C., Martinez-Zapater J.-M. Environmental regulation of flowering. *Int. J. Dev. Biol.* 2005;49:689-705. DOI 10.1387/ijdb.052022ia.
- Blionis G.J., Halley J.M., Vokou D. Flowering phenology of *Campanula* on Mt Olympos, Greece. *Ecography*. 2001;24:696-706.
- Carranza-Rojas J., Goeau H., Bonnet P., Mata-Montero E., Joly A. Going deeper in the automated identification of herbarium specimens. *BMC Evol. Biol.* 2017;17:181. DOI 10.1186/s12862-017-1014-z.
- Chuine I., Cour P., Rousseau D.D. Fitting models predicting dates of flowering of temperate-zone trees using simulated annealing. *Plant Cell Environ.* 1998;21:455-466.
- Clark R.M., Thompson R. Estimation and comparison of flowering curves. *Plant Ecol. Divers.* 2011;4(2-3):189-200. DOI 10.1080/17550874.2011.580382.
- Deussen O., Hanrahan P., Lintermann B., Měch R., Pharr M., Prusinkiewicz P. Realistic modeling and rendering of plant ecosystems. Proc. of the 25th Annual Conf. on Computer Graphics and Interactive Techniques SIGGRAPH '98. Orlando, USA, 19–24 July, 1998;275-286. DOI 10.1145/280814.280898.
- Erwin J. Factors affecting flowering in ornamental plants. In: Anderson N.O. (Ed.) *Flower Breeding and Genetics (Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century)*. Springer, 2007;7-48.
- Fomina T. Biomorphological peculiarities of flowering of some *Campanula* L. species under the culture. Proc. of the 9th Int. Conf. of Horticulture. Lednice, Czech Republic, 3–6 Sept. 2001;2:434-437.
- Galassi M., Davies J., Theiler J., Gough B., Jungman G., Alken P., Booth M., Rossi F., Ulerich R. GNU scientific library reference manual (3rd ed.). 2009. <http://www.gnu.org/software/gsl/>
- Ijiri T., Owada S., Okabe M., Igarashi T. Floral diagrams and inflorescences: Interactive flower modeling using botanical structural constraints. *ACM Trans. Graph.* 2005;24(3):720-726. DOI 10.1145/1073204.1073253.
- Li L., Zhang Q., Huang D. A review of imaging techniques for plant phenotyping. *Sensors*. 2014;14(11):20078-20111. DOI 10.3390/s141120078.
- Neubert B., Franken T., Deussen O. Approximate image-based tree modeling using particle flows. *ACM Trans. Graph.* 2007;26:3-8. DOI 10.1145/1276377.1276487.
- Normand F., Habib R., Chadoeuf J. A stochastic flowering model describing an asynchronously flowering set of trees. *Ann. Bot.* 2002;90(3):405-415. DOI 10.1093/aob/mcf204.
- Osawa A., Shoemaker C.A., Stedinger J.R. A stochastic model of balsam fir bud phenology utilizing maximum likelihood parameter estimation. *Forest Sci.* 1983;29(3):478-490.
- Primack R.B. Patterns of flowering phenology in communities, populations, individuals, and single flowers. In: White J. (Ed.) *The Population Structure of Vegetation. Handbook of Vegetation Science. Vol 3*. Springer, Dordrecht, 1985;571-593. DOI 10.1007/978-94-009-5500-4_24.
- Prusinkiewicz P., Hammel M., Mjolsness E. Animation of plant development. Proc. of SIGGRAPH 93. Anaheim, California, 1–6 August. 1993;351-360.
- Rathke B., Lacey E.P. Phenological patterns of terrestrial plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1985;16:179-214.

- Scariot V., Seglie L., Gaiano W., Devecchi M. Evaluation of European native bluebells for sustainable floriculture. *Acta Hort.* 2012;937:273-279. DOI 10.17660/ActaHortic. 2012.937.33.
- Tantau T. The TikZ and PGF packages. Manual for version 2.10. 2010. <http://sourceforge.net/projects/pgf>
- Ubbens J., Cieslak M., Prusinkiewicz P., Stavness I. The use of plant models in deep learning: an application to leaf counting in rosette plants. *Plant Methods.* 2018;14:6. DOI 10.1186/s13007-018-0273-z.
- Williams T., Kelley C. Gnuplot 4.6: an interactive plotting program. 2013. <http://gnuplot.sourceforge.net>
- Zhang C., Gao H., Cousins J.Z.A., Pumphrey M.O., Sankaran S. 3D robotic system development for high-throughput crop phenotyping. *IFAC-PapersOnLine.* 2016;49(16):242-247. DOI 10.1016/j.ifacol. 2016.10.045.
- Zhang C., Ye M., Fu B., Yang R. Data-driven flower petal modeling with botany priors. *Proc. of the IEEE Conf. on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR).* Columbus, USA, 23–28 June. 2014;636-643.
- Zheng Q., Fan X., Gong M., Sharf A., Deussen O., Huang H. 4D reconstruction of blooming flowers. *Comput. Graph. World.* 2017; 36(6):405-417. DOI 10.1111/cgf.12989.

ORCID ID

E.S. Fomin orcid.org/0000-0002-2625-8427

T.I. Fomina orcid.org/0000-0003-4724-2480

Studying the effects of *Cantharellus cibarius* fungi on *Opisthorchis felineus* trematode and on parasite host – C57BL/6 inbred mice

M.A. Tsyganov^{1, 2}✉, G.B. Vishnivetskaya¹, T.P. Kukina³, I.V. Sorokina³, M.N. Lvova^{1, 4}, M.A. Protsenko⁵, N.E. Kostina¹, D.F. Avgustinovich¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

⁵ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Opisthorchiasis is a dangerous parasitic disease caused by trematodes in the family Opisthorchiidae. One of the causes of this infection is the species *Opisthorchis felineus*, which is common in the Russian Federation and Western Europe. The disease has a large number of complications and relatively few effective treatments, so nowadays it is relevant to look for new drugs for the treatment of opisthorchiasis, with the maximum antiparasitic and minimal side effect. In this work, a potentially anthelmintic effect of the methanol extract of the golden chanterelle mushroom (*Cantharellus cibarius*) was investigated. In *in vitro* experiments, the significantly reduced mobility and survival rates of juvenile *O. felineus* specimens with increasing concentrations (10–1000 µg/ml) of the *C. cibarius* extract were shown. In *in vivo* studies, administration of the *C. cibarius* extract on the first day after parasitic infection of inbred C57BL/6 mice resulted in a decrease of the number of helminths in the bile ducts of the liver, evaluated 6 weeks after infection. In another series of experiments, administration of the *C. cibarius* extract for 7 days to mice infected with *O. felineus* for five weeks had no anthelmintic effect. In both cases, the state of the infected hosts, evaluated by a number of physiological and biochemical parameters (relative weight of organs, blood indices), did not deteriorate, indicating that there was no adverse effect of the *C. cibarius* extract. The results obtained suggest that the *C. cibarius* extract might have anthelmintic properties if applied as parasite larvae excyst.

Key words: *Opisthorchis felineus*; methanolic extract of *Cantharellus cibarius*; C57BL/6 mice; blood biochemical markers.

Исследование эффектов грибов *Cantharellus cibarius* на трематоду *O. felineus* и на хозяина паразита – инбредных мышей C57BL/6

М.А. Цыганов^{1, 2}✉, Г.Б. Вишневецкая¹, Т.П. Кукина³, И.В. Сорокина³, М.Н. Львова^{1, 4}, М.А. Проценко⁵, Н.Е. Костина¹, Д.Ф. Августинович¹

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Россия

⁵ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия

Описторхоз – опасное паразитарное заболевание, вызываемое трематодами семейства Opisthorchiidae, в том числе видом *Opisthorchis felineus*, распространенным на территории Российской Федерации и Западной Европы. В наше время остается актуальным поиск новых препаратов для лечения описторхоза с максимальным противопаразитарным и минимальным побочным действием. В работе исследованы потенциальные антигельминтные эффекты экстракта грибов Лисичка обыкновенная (*Cantharellus cibarius*). В экспериментах *in vitro* показано, что при повышении концентрации экстракта *C. cibarius* (10–1000 мкг/мл) подвижность и выживаемость ювенильных особей *O. felineus* значительно снижается. В исследованиях *in vivo* экстракт *C. cibarius*, вводимый мышам инбредной линии C57BL/6 в первые сутки после инфицирования, приводил к снижению количества гельминтов в желчных протоках печени, оцениваемому через шесть недель после инфицирования. В другой серии экспериментов введение экстракта в течение семи дней мышам с пятидневным сроком инфицирования не оказывало антигельминтного эффекта. В обоих случаях состоянии хозяина паразита, оцениваемое по ряду физиологических и биохимических параметров, не ухудшалось, что говорит об отсутствии какого-либо негативного действия экстракта *C. cibarius*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу возможных антигельминтных свойств экстракта *C. cibarius* при применении на стадии экцистирования личинок паразита.

Ключевые слова: *Opisthorchis felineus*; метанольный экстракт *Cantharellus cibarius*; мыши C57BL/6; биохимические показатели крови.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Tsyganov M.A., Vishnivetskaya G.B., Kukina T.P., Sorokina I.V., Lvova M.N., Protsenko M.A., Kostina N.E., Avgustinovich D.F. Effects of the mushroom *Cantharellus cibarius* on the liver fluke *O. felineus* and hosting inbred C57BL/6 mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):850-858. DOI 10.18699/VJ18.426

Received 31.03.2018

Accepted for publication 14.09.2018

© AUTHORS, 2018

Opisthorchiasis is a disease of hepatobiliary system and pancreas, caused by trematodes of the Opisthorchiidae family including *Opisthorchis felineus*. The Ob-Irtysh region is the biggest area of *O. felineus*-induced opisthorchiasis in Russia. Infection of urban population is up to 80 %, in rural areas – more than 90 % (Mordvinov et al., 2012; Yurlova et al., 2017). Opisthorchiasis is characterized by inflammatory processes in liver and bile ducts (Sripa, 2003; Nair et al., 2011). *O. felineus* infection results in multiple pathologies of liver and pancreas: cholangitis, cholecystitis, strictures of bile ducts, gallstones, hepatitis-like symptoms (jaundice, hepatomegalia), pancreatitis (Paltsev, 2005; Saltykova et al., 2016). Some authors have noted a correlation between *O. felineus* infection and oncology of human hepatobiliary system and pancreas (Brazhnikiova, Tolkaeva, 2002).

Due to the large-scale Opisthorchiasis distribution, duration of the disease and severe consequences caused in the infected humans and animals, constant search for drug treatment methods is conducted on laboratory animals. To this purpose, Opisthorchiasis is frequently modeled on golden hamsters – *Mesocricetus auratus* (Pinlaor et al., 2009; Pakharukova et al., 2015). However, these animals are not natural hosts for this trematode. Some Opisthorchiasis studies are performed on knock-out (Nair et al., 2011) and C57BL/6 inbred mice (Zelentsov, 1974; Avgustinovich et al., 2016; 2017a, b, 2018). For *O. felineus*-infected C57BL/6 mice, a prolonged (up to six weeks) juvenile marita stage is typical, which distinguishes them from hamsters. It gives particular advantages in studying the chronic effect of agents on immature *O. felineus* maritae.

Praziquantel is the main and most effective agent for human opisthorchiasis treatment. Some authors assume that parasites develop resistance to this agent (Greenberg, 2014). Praziquantel also has side effects (Erko et al., 2012) and considerable cytotoxic influence on liver cells (Sripa et al., 2011). Therefore, researching new compounds, effective against opisthorchiasis remains important. Fungi of *Cantharellus* genus, particularly *C. cibarius*, are considered as potential source of such agents. These fungi demonstrate anti-nematode properties in nature (Muszyńska et al., 2016). They are broadly used in traditional medicine (Cieniecka-Rosłonkiewicz et al., 2007), because the fungus contains substances with potential therapeutic properties against various diseases (Valverde et al., 2015; Nyman et al., 2016). *In vitro* and *in vivo* studies revealed high antioxidant and anti-inflammatory properties of fungi extracts, more pronounced in alcohol extracts than in aqueous extracts (Vamanu, Nita, 2014). Methanolic fungi extract has an advantage over aqueous extract due to its antimicrobial effect (Kozarski et al., 2015; Muszyńska et al., 2016), while antimicrobial activity of methanolic extract against *Escherichia coli* is 7 times higher than ethanolic extract (Aina et al., 2012). Single-dose or chronic intraperitoneal introduction of *C. cibarius* methanolic extracts are used for mice, the dose range – 200–800 mg/kg (Khalili et al., 2014, 2015). No studies of *C. cibarius* efficacy in treating opisthorchiasis infections have been performed.

Thus, the study objective was to determine anthelmintic properties of *C. cibarius* methanolic extract in two modes of administering to mice of C57BL/6 inbred line: at the stage of introducing *O. felineus* (the first day of infection) and at the stage of parasites attached to biliary ducts (5 weeks of

infection). Fungi extract effect upon *O. felineus* was also assessed *in vitro*. In addition, we intended to obtain and compare the chemical compositions of *C. cibarius* methanolic and ethanolic extracts.

Materials and methods

Animals. Mature male mice of C57BL/6 line were obtained from the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (RFMEFI61914X0005 and RFMEFI61914X0010) of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia). The animals were kept in groups (3–6 animals) in standard cages 36 × 23 × 10 cm with light conditions – 12:12 h (day:night), air temperature 24 °C, food and water *ad libitum*. All procedures were performed in accord with the Directives of the European Communities Council of 24 November 1986 (86/609/EEC), and in line with the standards of the Bioethics Commission of the “Institute of Cytology and Genetics” Federal Research Centre (No. 26 Protocol of 13.03.2015).

O. felineus metacercariae were separated from naturally infected *Leuciscus idus*, inhabiting the Ob river within the boundaries of Novosibirsk. Metacercariae were washed with 0.9 % NaCl sterile solution and contained at 4 °C no longer than 24 h for *in vivo* experiments and up to 7 days in sterile phosphate buffer with added kanamycin antibiotic (25 µg/ml) for *in vitro* experiments.

Obtaining of *C. cibarius* extract. The extracts were obtained from *C. cibarius* fungi collected in the Novosibirsk region. The extracts were made using the method of T. Kukina with co-authors (2016). Fungi, dried at the temperature not exceeding 40 °C, were powdered on an electric mill, and then the raw material was sieved through 2 mm holes. A 50 g sample was loaded in a Soxhlet extractor for 20 h. Methanol, ethanol and ethanol with methanol reextraction were used as the extraction agents. The obtained substances were evaporated to dryness on a Buchi rotor evaporator (Switzerland) with water bath at 40 °C and reduced pressure (20–30 mm Hg) due to use of a waterjet pump. Methanolic extract was used in *in vivo* and *in vitro* experiments according to recommendations of other researchers (Aina et al., 2012). For *in vivo* studies *C. cibarius* extract was suspended in 10 % Tween 80, which is used in animal experiments as a solvent (Teufack et al., 2017). For *in vitro* studies, the extract was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO).

***In vitro* studies.** Excystation of juvenile worms was achieved by adding 0.06 % trypsin solution (Sigma, USA) to metacercariae, keeping it for 15 min at 37 °C. Then the worms were washed five times with incubation medium [the composition: RPMI 1640, L-glutamine (Life Technologies, USA), antibiotics (100 µg/ml streptomycin + 100 unit/ml penicillin, Sigma, USA), an antimycotic agent (25 µg/ml amphotericin B) and 1 % glucose] and put in wells of a standard cultural plate, containing 990 µl of the medium and 10 µl of the studied agent. Dry fungi extract was diluted to the required concentration in 100 % DMSO so that adding 10 µl to the medium made the concentration of DMSO 1 %, and the extract – 10, 100 or 1000 µg/ml. There were two wells per concentration, each containing 60–80 juvenile *O. felineus* specimens. 1 % DMSO was added to the control wells. The plate was put in CO₂-incubator (37 °C, 5 % CO₂) for 24 h.

Mobility of juvenile worms was analyzed in 24, 72, 120 and 168 h after adding the agent based on the method of J. Keiser with co-authors (2013). Mobility was assessed visually using a Axiovert 40CFL microscope (Zeiss, Germany) according to a 4-score scale (4 – active continuous worm movement, 3 – poorly pronounced, slow movements of the entire body, 2 – very rare movements, mostly limited to a single body part, 1 – complete immobility), and then normalized by the control group (1 % DMSO). A day after adding the agents, the average effective agent concentration, when complete immobility occurred in 50 % of all worms (IC_{50}), was calculated using CompuSyn 1.0 software (ComboSynInc).

In vivo studies. Two schemes of introducing *C. cibarius* extract to the infected animals were used. In the first series of experiments at 6 pm metacercariae in 0.1 ml saline were injected to half of the animals (100 larvae/mouse), and 0.9 % NaCl to the other half. On the next day at 10 am a single dose of *C. cibarius* extract solution or a solvent (10 % Tween 80) was introduced. *C. cibarius* extract was administered to half of the animals in each group, and the solvent to the other half. Each subgroup had 7–14 mice. In the second series of the experiments *C. cibarius* extract (or solvent) were administered to the infected animals daily during 7 days, 5 weeks after introducing *O. felineus* metacercariae. Two groups of 14–15 mice were used. The substances were administered to the mice intragastrically via special probes (Braintree Scientific, Inc., USA). A 600 mg/kg dose was chosen based on the literature data (Khalili et al., 2014).

During both experiments the animal body mass was measured every ten days. In 6 weeks after infection the mice were euthanized by decapitation and the biomaterial for further studies was taken. Liver, spleen and thymus were weighted and the relative organ mass was calculated to gram of body mass. Liver was put in 0.9 % NaCl solution to calculate the number of parasites in biliary ducts and gall bladder and to determine their maturity state. For exposing worms and analyzing the state of biliary ducts, an Axiovert 40CFL light microscope (Zeiss, Germany) with $\times 4$ magnification was used. The blood collected during decapitation was centrifuged at 3000 rpm, 4 °C, 20 min. Serum was separated and stored at –70 °C until performing the biochemical studies.

Biochemical studies. Activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and lactic dehydrogenase (LDH) enzymes, the content of glucose (GLU), total protein (TP), cholesterol (CHOL), triglycerides (TG) in blood serum was determined with a standard reagents kit (Biocon, India). The measurements were performed using a Photometer-5010 biochemical semiautomatic analyzer (Boehringer Mannheim, Germany).

Studying biochemical composition of *C. cibarius* extracts. The content of protein, polysaccharides, phenol compounds, flavonoids and carotinoids in *C. cibarius* extracts were determined applying an earlier described method (Protsenko et al., 2018).

Statistics. Statistical processing of the data was made in Statistica 6.0 (StatSoft) software suit. Two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out for the first scheme of administration: the first factor was “infection” (infected – non-infected), the second factor was “agent” (*C. cibarius*

extract, solvent). To analyze the extract effect in the second administration scheme, one-way ANOVA was used. Body mass changes were evaluated by the Wilcoxon test criteria for paired comparison. The data were presented as the mean value \pm error of mean. The results were considered statistically significant at $p \leq 0.05$ and as a trend at $0.05 < p < 0.1$. Parasite survival in the *in vitro* experiment was estimated with Kaplan–Meier method, the survival curves were compared using χ^2 . The curves differed at $p \leq 0.05$.

Results

In vitro study

In the first minutes after introducing the extract or 1 % DMSO no changes in worm appearance or activity were observed. In 24 h worm mobility in wells with 10, 100 and 1000 $\mu\text{g/ml}$ extract concentration was 6.15 %, 7.69 % and 41.15 % below the control mobility respectively. Further on (in 72–120 h) worm mobility was gradually decreasing. In 120 h the group with 10 $\mu\text{g/ml}$ of extract had 64 % less mobility than in the control group; in 100 $\mu\text{g/ml}$ group – 71.2 % less than in the control group; and in the 1000 $\mu\text{g/ml}$ group complete termination of activity was observed. In 168 h most worms died. In 24 h after adding *C. cibarius* extract IC_{50} was 1.58 $\mu\text{g/ml}$.

At each stage of observation the number of dead (immobile, non-transparent) worms was calculated. Mortality in the control group was 0 % 24 h after the beginning of the experiment, 9.41 % – in 72 h, 37.65 % – in 120 h and 87.65 % – in 168 h; in the group with concentration of *C. cibarius* extract 10 $\mu\text{g/ml}$ the results were 2.08, 29.86, 70.14 and 97.92 %, respectively. With 100 $\mu\text{g/ml}$ extract concentration the values were 3.96, 37.62, 77.23 and 91.19 %, respectively, while with 1000 $\mu\text{g/ml}$ extract concentration – 12.08, 87.25 and 100 % in 120–168 h. In all cases the parasite survival diagrams upon administering *C. cibarius* extract were significantly different from the control values (10 $\mu\text{g/ml}$: $\chi^2 = 41.57$, $p = 1.14 \cdot 10^{-10}$; 100 $\mu\text{g/ml}$: $\chi^2 = 17.33$, $p = 3.13 \cdot 10^{-5}$; 1000 $\mu\text{g/ml}$: $\chi^2 = 227.48$, $p = 0.000$).

The appearance of parasites had changed under the agent influence: many worms in wells with 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ extract doses had enlarged excretory bladder in 72 h (Fig. 1, a, b), maintained further on. No such changes were observed in the control worms during the entire 168-hour period (Fig. 1, d) and specimens with 1000 $\mu\text{g/ml}$ extract concentration that had nearly all died by that time (Fig. 1, c).

In vivo study

Single-dose *C. cibarius* extract administered on the first day after infection led to a statistically significant ($F_{1,20} = 4.36$, $p = 0.048$) decrease of the number of parasites in biliary ducts of liver 6 weeks after infection (18.1 ± 1.5), in comparison with the control group (23.5 ± 2.2). No considerable changes in the appearance of the parasites separated from mice liver with and without introducing *C. cibarius* extract were found microscopically. The worms were mostly immature, with two properly visualized intestine branches. Both groups had an animal with one mature *O. felineus* specimen.

No significant effect of the “infection” and “agent” factors on the relative mass of liver and spleen in the analyzed groups was found; there was no interaction between the factors (Table 1). Thymus mass increased in *O. felineus*–

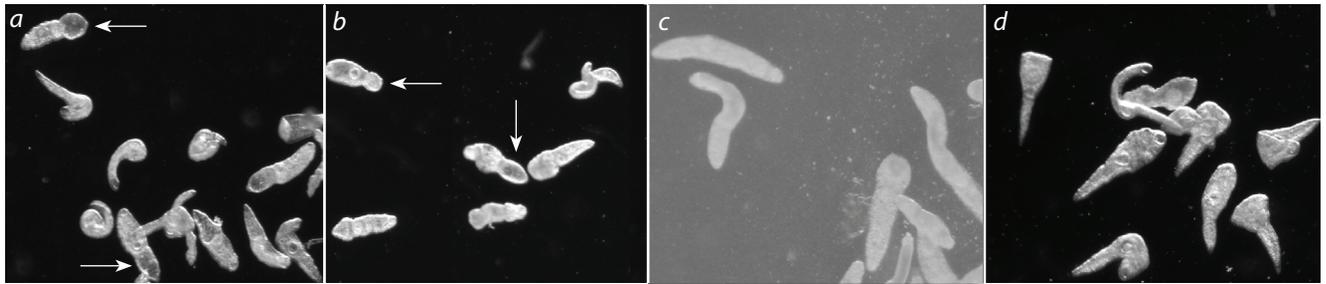


Fig. 1. Appearance of juvenile *O. felinus* specimens in 72 h after exposure to 10 µg/ml (a), 100 µg/ml (b) and 1000 µg/ml (c) *C. cibarius* extract and the solvent (d).

The arrows point at excretory bladder.

Table 1. Relative organ mass after single-dose introduction of *C. cibarius* extract on the first day after infecting mice with *O. felinus*

Organ, mg/g	Control		<i>O. felinus</i>	
	solvent	<i>C. cibarius</i>	solvent	<i>C. cibarius</i>
Liver	46.2 ± 3.33	49.5 ± 1.02	49.6 ± 1.22	51.3 ± 1.29
F _{1,36} ^{OfCc} = 2.34, p = 0.136; F _{1,36} ^{Cc} = 2.10, p = 0.156; F _{1,36} ^{OfxCc} = 0.20, p = 0.655				
Spleen	3.8 ± 0.60	3.1 ± 0.23	3.5 ± 0.17	3.7 ± 0.14
F _{1,36} ^{Of} = 0.24, p = 0.628; F _{1,36} ^{Cc} = 0.43, p = 0.514; F _{1,36} ^{OfxCc} = 2.70, p = 0.109				
Thymus	1.2 ± 0.04	1.2 ± 0.06	1.2 ± 0.06	1.4 ± 0.05 [#]
F _{1,36} ^{Of} = 3.48, p = 0.070; F _{1,36} ^{Cc} = 0.25, p = 0.618; F _{1,36} ^{OfxCc} = 2.53, p = 0.120				

Note: [#]p < 0.05 in comparison with the control group. Of – the “infection” factor; Cc – the “agent” factor.

infected animals with administration of *C. cibarius* extract, in comparison with mice from the control group.

No impact of *C. cibarius* extract upon animal body weight gain in the 6 weeks of the experiment was discovered: mice in each subgroup were equally gaining weight that increased on average by 2.5–3 g.

In the second series of experiments introduction of *C. cibarius* extract for 7 days in 5 weeks after infecting did not cause any statistically significant change in the number of parasites (26.2 ± 0.89 – *C. cibarius*, 28.4 ± 1.85 – solvent; F_{1,29} = 1.16, p = 0.292). At the same time, the worms separated from biliary ducts after introducing solvent and *C. cibarius* extract were different: the latter had considerably enlarged excretory bladder (Fig. 2, a, b). All worms were immature, had properly visualised two intestine branches in all mice, except two in each group that had a single mature *O. felinus* specimen (Fig. 2, c).

In 7-day introduction, no differences were found between animals that received *C. cibarius* extract and the control mice in terms of the relative liver mass (F_{1,29} = 2.10, p = 0.159) (51.6 ± 1.07 mg/g – control; 48.5 ± 1.75 mg/g – *C. cibarius*) and spleen mass (F_{1,29} = 2.85, p = 0.103) (3.1 ± 0.09 mg/g – control; 3.4 ± 0.15 mg/g – *C. cibarius*). There were no intergroup differences in body mass at the beginning (F_{1,29} = 0.036, p = 0.851) and at the end (F_{1,29} = 1.24, p = 0.275) of the experiment. At the same time, the body mass of mice reduced in both groups during the period of agent introduction (7 days): from 28.0 ± 0.50 g to 26.6 ± 0.46 g in the control

group of mice (p = 0.000) and from 28.2 ± 0.58 g to 27.2 ± 0.42 g in mice with *C. cibarius* extract (p = 0.015).

Biochemical blood analysis

Table 2 shows the results of biochemical studies of infected and non-infected mice after single-dose introduction of *C. cibarius* or the solvent. ANOVA did not find any influence of the “agent” factor on activity of ALT (F_{1,35}^{Cc} = 0.01, p = 0.915), AST (F_{1,35}^{Cc} = 0.02, p = 0.898) and LDH (F_{1,35}^{Cc} = 0.29, p = 0.591). The effect of the “infection” factor was significant with introducing both *C. cibarius* extract and the solvent (ALT: F_{1,35}^{Of} = 13.16, p = 0.001; ACT: F_{1,35}^{Of} = 14.06, p = 0.001; LDH: F_{1,35}^{Of} = 12.68, p = 0.001). No factor interaction was noticed (ALT: F_{1,35}^{CcOf} = 0.06, p = 0.805; AST: F_{1,35}^{CcOf} = 0.25, p = 0.623; LDH: F_{1,35}^{CcOf} = 0.05, p = 0.821). Statistically significant influence of both the “infection” factor (F_{1,35}^{Of} = 7.35, p = 0.010), and the “agent” factor (F_{1,35}^{Cc} = 4.51, p = 0.041) was shown for ALP with no factor interaction (F_{1,35}^{CcOf} = 1.06, p = 0.311). As demonstrated with further *post hoc* comparison, ALP activity in the group of non-infected animals was decreasing with introducing *C. cibarius* extract, which was not observed in the infected mice. Moreover, the infected mice displayed much higher ALP activity with administration of *C. cibarius* extract in comparison with the non-infected animals. The effects of the “agent” and “infection” factors on the glucose level were statistically significant (F_{1,35}^{Cc} = 4.54, p = 0.040; F_{1,35}^{Of} = 4.23, p = 0.047,



Fig. 2. Appearance of *O. felineus* specimens separated from mice livers. *a* – the control group; *b* – the group received *C. cibarius* extract; *c* – a mature *O. felineus* specimen.

Table 2. Blood biochemical values of the control and *O. felineus*-infected mice after a single-dose introduction of *C. cibarius*

Index	Control		<i>O. felineus</i>	
	Solvent	<i>C. cibarius</i>	Solvent	<i>C. cibarius</i>
ALT, unit/l	47.3 ± 6.15	45.6 ± 5.67	88.0 ± 9.40 [#]	92.3 ± 13.87 ^{##}
AST, unit/l	199.0 ± 26.17	184.4 ± 13.68	275.2 ± 33.15 [#]	283.8 ± 19.14 ^{##}
ALP, unit/l	256.8 ± 19.91	209.2 ± 11.38 [*]	282.3 ± 14.96	265.7 ± 13.22 ^{##}
LDH, unit/l	2873.3 ± 223.36	3140.9 ± 264.29	4190.0 ± 475.53 [#]	4299.3 ± 290.81 ^{##}
GLU, mmol/l	11.0 ± 0.78	10.0 ± 0.47	10.0 ± 0.36	9.1 ± 0.32
TP, g/l	88.3 ± 1.99	83.3 ± 5.63	90.8 ± 1.54	86.7 ± 2.02
CHOL, mmol/l	3.5 ± 0.23	3.0 ± 0.43	2.8 ± 0.26	2.9 ± 0.19
TG, mmol/l	0.3 ± 0.04	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.02 ^(#)	0.2 ± 0.01

* $p < 0.05$ – in comparison with the solvent; [#] $p < 0.05$; ^{##} $p < 0.01$; ^(#) $0.05 < p < 0.1$ – in comparison with the control.

respectively], with no factor interaction ($F_{1;35}^{CcxOf} = 0.01$, $p = 0.937$) *Post hoc* comparison, however, did not reveal any differences between the groups. There were no effects of the “agent” factor on the content of total protein (TP) ($F_{1;35}^{Cc} = 1.45$, $p = 0.237$), triglycerides (TG) ($F_{1;35}^{Cc} = 0.10$, $p = 0.757$) and cholesterol (CHOL) ($F_{1;35}^{Cc} = 0.34$, $p = 0.565$). The “infection” factor ($F_{1;35}^{Of} = 4.22$, $p = 0.047$) determined noticeable, though statistically insignificant, reduction of TG level against solvent introduction ($p = 0.072$). No effect of infection upon the content of protein and cholesterol in blood was found ($F_{1;35}^{Of} = 0.61$, $p = 0.441$; $F_{1;35}^{Of} = 1.65$, $p = 0.207$). По всем трем показателям взаимодействие $p = 0.207$). There was no factor interaction for all three parameters (TP: $F_{1;35}^{CcxOf} = 0.01$, $p = 0.914$; TG: $F_{1;35}^{CcxOf} = 0.85$, $p = 0.362$; CHOL: $F_{1;35}^{CcxOf} = 0.87$, $p = 0.357$).

Table 3 gives the results of the biochemical studies of the infected mice administered the solvent or *C. cibarius* extract daily during 7 days, 5 week after infection. There was no difference between the mice of the compared groups in all measured parameters, except glucose (ALT: $F_{1;27} = 0.01$, $p = 0.936$; AST: $F_{1;27} = 1.14$, $p = 0.295$; ALP: $F_{1;27} = 0.04$, $p = 0.838$; LDH: $F_{1;27} = 2.64$, $p = 0.116$; TP: $F_{1;27} = 1.28$, $p = 0.268$; CHOL: $F_{1;27} = 0.004$, $p = 0.951$; TG: $F_{1;27} = 0.004$, $p = 0.949$). *C. cibarius* extract increased the glucose level ($F_{1;37} = 5.35$, $p = 0.029$).

C. cibarius extract composition

Composition of different *C. cibarius* extracts was analysed. It was found that metanolic extraction is better for separating

Table 3. Biochemical blood values in *O. felineus*-infected mice after 7-day introduction of *C. cibarius*

Index	Solvent	<i>C. cibarius</i>
ALT, unit/l	61.0 ± 7.74	60.2 ± 5.02
AST, unit/l	232.1 ± 22.94	206.0 ± 10.04
ALP, unit/l	274.5 ± 13.58	270.8 ± 11.77
LDH, unit/l	3933.6 ± 308.83	3418.7 ± 103.66
GLU, mmol/l	8.3 ± 0.30	9.1 ± 0.21 [*]
TP, g/l	84.5 ± 0.83	83.0 ± 1.10
CHOL, mmol/l	2.9 ± 0.10	2.8 ± 0.27
TG, mmol/l	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01

* $p < 0.05$ in comparison with solvent.

phenol compounds, and ethanol extraction – for carotinoids (Table 4). Reextraction by ethanol after methanolic extraction helps increase the number of polysaccharides and phenol compounds, but is accompanied by considerable protein loss. In all three types of extraction the equal and insignificant content of flavonoids was obtained.

Discussion

In the present work, the first data on anthelmintic activity of *C. cibarius* extracts on a model of *O. felineus*-induced opisthorchiasis in mice was obtained. Earlier, anti-inflammatory effects (Vamanu, Nita, 2014), insecticide

Table 4. Composition of *C. cibarius* extracts in three extraction techniques

<i>C. cibarius</i> extract	The content of substances in the sample (in terms of dry weight of the extract)				
	Polysaccharides mg/g	Total protein	Phenolic compounds	Flavonoids	Carotenoids, mkg/g
Ethanol	89.4±6.2	13.7±1.3	1.95±0.10	≤ 5	22.3
Methanol	82.3±3.5	12.0±0.8	2.47±0.10	≤ 5	3.2
Ethanol-methanol	148.0±4.7	≤ 5	4.42±0.12	≤ 5	6.0

activity (Cieniecka-Rosłonkiewicz et al., 2007), antioxidant and hepatoprotective properties – decreased fibrotic liver changes associated with induced inflammation (Aina et al., 2012; Khalili et al., 2014, 2015), as well as cytotoxic effects on cancer cells *in vitro* (Sari et al., 2017) for *C. cibarius* extracts were demonstrated. In view of the above, one might expect a possible inhibitory action of *C. cibarius* directly on helminths.

Our *in vitro* experiments proved that survival and mobility of juvenile *O. felineus* specimens reduces in accordance with increasing the dose of *C. cibarius* extract in the incubational medium. In 120 h after starting the experiments, actively moving worms were found only in the control group. Enlarged excretory bladder in parasites also indicate anthelmintic activity of *C. cibarius*: similar morphological changes were observed as an effect of praziquantel (Pakharukova et al., 2015). It is believed that praziquantel damages parasite’s metabolism affecting membrane transport proteins, particularly, proteins of the parasite’s excretory system (Greenberg, 2014). It is possible that *C. cibarius* also affects performance of the excretory system of *O. felineus*.

IC₅₀ of *C. cibarius* extract (1.58 mg/ml) is much higher than IC₅₀ of other clinically used agents such as praziquantel (IC₅₀ = 0.33 µg/ml for juvenile specimens and 0.14 µg/ml for adult specimens) (Pakharukova et al., 2015) or tribendimidin which is used to treat clonorchiasis (IC₅₀ = 0.05 µg/ml for adult specimens) (Keiser et al., 2013). It can be explained by low content of potentially anthelmintic compounds in used *C. cibarius* extract. Such substances in *C. cibarius* could be specific beta-glucans as immunomodulators with cytotoxic effect on tumor cells (El Enshasy, Hatti-Kaul, 2013; Valverde et al., 2015; Sari et al., 2017), ergosterol – fungal steroid with antioxidant properties, as well as phenol compounds (myricetin and catechine) involved in antioxidant processes (Ebrahimzadeh et al., 2015; Valverde et al., 2015; Muszyńska et al., 2016). Several authors emphasize high activity of flavonoids (Kozarski et al., 2015). The obtained composition of *C. cibarius* extract shows presence of a considerable number of polysaccharides, with prevalence of beta-glucans (Muszyńska et al., 2016). Flavonoids and phenol compounds are present in smaller quantities. Ergosterol was discovered earlier in *C. cibarius* extracts by other researchers (Muszyńska et al., 2016).

The *in vivo* model demonstrated a prolonged juvenile stage of parasite development in mice in comparison with hamsters (Avgustinovich et al., 2017a, 2018). Almost all parasites were immature: only two intestine branches were visible, and there were no gonads. In natural hosts (humans, cats), parasites mature in a month after infection (Beyer, 2005). It can indicate that mice have special resistance mechanisms to *O. felineus*

infection. Mice groups with solvent and *C. cibarius* extract under both schemes of administering had only single mature worm specimen. Therefore, it can be assumed that the extract did not influence maturation of *O. felineus* specimens in case of natural worm development. Enlargement of worm excretory bladder after administering *C. cibarius* extract to mice, similar to those found in the *in vitro* study, corroborates the anthelmintic effect of *C. cibarius* extract on parasites.

It should be emphasized that single-dose administration of *C. cibarius* extract on the first day after infecting caused a statistically significant reduction of the number of worms in the animals’ biliary ducts. Therefore, possible preventative anthelmintic effect of *C. cibarius* extract on the model of *O. felineus*-induced opisthorchiasis is shown for the first time. There were no statistically significant changes in the number of parasites in the animals’ biliary ducts when *C. cibarius* extract was administered for 7 days, 5 weeks after infection. Probably, some time after *O. felineus* migrate to biliary ducts, they become resistant to the effects of *C. cibarius* extract even under longer administration conditions. Thus, *C. cibarius* extract prevents worm attachment to the walls of biliary ducts and helps wash them out, but is not efficient against already attached parasites. However, we do not exclude that a higher concentration of one of the extract components could have the anihelminth effect at the later stages of infection.

C. cibarius extract did not effect changes in the relative mass of liver, spleen and thymus in intact as well as infected animals under both schemes of introduction of *C. cibarius* extract. It means that the extract does not have any apparent toxic effect upon host organisms. Since the infected animals that received *C. cibarius* extracts had increased relative thymus weight in comparison with non-infected animals that were administered the extract, it is possible to assume that *C. cibarius* extract can stimulate T-cell immunity of host in parasitic infections.

Single-dose introduction of *C. cibarius* extract did not prevent normal body weight gain in animals, which implies absence of any negative effects upon the organism of hosts. The observed decreased mice body weight when *C. cibarius* extract was administered for 7 days is most likely related to an impact of daily stress from the substance administering procedure, which other authors also pointed out (Charmandari et al., 2005).

O. felineus infection increased activity of ALT, AST, and LDH. Such changes are noted in opisthorchiasis as well as other inflammatory processes in liver (Wonkchalee et al., 2012). Administering of *C. cibarius* extract did not normalize but also did not worsen these parameters. One can assume that single-dose introduction of the extract does not have

any adverse effect immediately after infection start as in the control group of mice. Reduced ALP can be considered a positive effect, indicating possible anti-cholestasis effect of the extract, because increased ALP activity is observed in chronic opisthorchiasis and other diseases that cause cholestasis (Dechakhampfu et al., 2010). It is possible that reduced ALP activity in the non-infected animals caused by the extract is due to N-glucans, which are considered as potential immunomodulators (Sari et al., 2017).

Based on the biochemical blood values, the 7-day administering of *C. cibarius* extract did not have a noticeable therapeutic effect upon the infected animals; at the same time, no adverse impact of the extract was found too. The observed increased level of glucose in the animal blood can be explained by the stress from the agent administering procedure.

Thus, the study has revealed an anthelmintic effect of *C. cibarius* extract administered on the first day after infecting of animals with *O. felineus* metacercariae. Damaged vital activities of parasites were shown *in vitro* and *in vivo*, visually demonstrated as enlarged excretory bladder. The observed anthelmintic effect means a higher extract efficacy at the state of parasite excystation. Absence of impaired body and organ weight in animals as well as their biochemical blood parameters prove that the fungi extract has no adverse effects. Further studying of certain components of *C. cibarius* extract is necessary to evaluate their anthelmintic properties.

Acknowledgments

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) (No. 17-04-00790 grant) and the budget project of the Animal and Human Genetics Division, the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (No. 0324-2018-0016).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aina D.A., Jonathan S.G., Olawuyi O.J., Ojelabi D.O., Durowaju B.M. Antioxidant, antimicrobial and phytochemical properties of alcoholic extracts of *Cantharellus cibarius* – a Nigerian mushroom. *N. Y. Sci. J.* 2012;5(10):114-120.
- Avgustinovich D.F., Katokhin A.V., Kontsevaya G.V., Lvova M.N., Vishnivetskaya G.B., Kashina E.V., Marenina M.K., Maksimova G.A., Zav'yalov E.V., Mordvinov V.A. A comparative study of *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) infection in inbred C57BL/6 and outbred CD-1 mice. *Parazitologiya.* 2018;52(1):19-31.
- Avgustinovich D.F., Marenina M.K., Zhanaeva S.Y., Tenditnik M.V., Katokhin A.V., Pavlov K.S., Sivkov A.Y., Vishnivetskaya G.B., Lvova M.N., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A. Combined effects of social stress and liver fluke infection in a mouse model. *Brain Behav. Immun.* 2016;53:262-272. DOI 10.1016/j.bbi.2016.01.012.
- Avgustinovich D.F., Orlovskaya I.A., Toporkova L.B., Vishnivetskaya G.B., Katokhin A.V., Lvova M.N., Kashina E.V., Bondar N.P., Feofanova N.A., Mordvinov V.A. Experimental opisthorchiasis: study of blood cell composition, hematopoiesis, and startle reflex in laboratory animals. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7(1):82-92.
- Avgustinovich D.F., Vishnivetskaya G.B., Pirozhkova D.S., Tsyganov M.A., Vavilin V.A., Pakharukova M.Y., Shilov A.G., Dudarev V.G., Mordvinov V.A. Influence of N-(4-methyl-3-chlorophenyl)-2-acetoxy-3,5-dichlorobenzamide on the adult and juvenile worms of *O. felineus* under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Sibirskyy Nauchnyy Meditsynskyy Zhurnal = The Siberian Scientific Medical Journal.* 2017;37(3):17-26. (in Russian)
- Be'er S.A. Biology of the Agent of Opisthorchiasis. Moscow: KMK Scientific Press Ltd, 2005. (in Russian)
- Brazhnikova N.A., Tolkaeva M.V. Cancer of liver, biliary tracts and pancreas at chronic opisthorchiasis. *Bulleten Sibirskoy Meditsyny = Bulletin of Syberian Medicine.* 2002;2:71-76. (in Russian)
- Charmandari E., Tsigos T., Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 2005;67:259-284. DOI 10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816.
- Cieniecka-Roslonkiewicz A., Sas A., Przybysz E., Morytz B., Syguda A., Pernak J. Ionic liquids for the production of insecticidal and microbicidal extracts of the fungus *Cantharellus cibarius*. *Chem. Biodiversity.* 2007;4:2218-2224. DOI 10.1002/cbdv.200790179.
- Dechakhampfu S., Pinlaor S., Sitthithaworn P., Nair J., Bartsch H., Yongvanit P. Lipid peroxidation and etheno DNA adducts in white blood cells of liver fluke-infected patients: protection by plasma α -tocopherol and praziquantel. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010;19(1):310-318. DOI 10.1158/1055-9965.
- Ebrahimzadeh M.E., Safdari Y., Khalili M. Antioxidant activity of different fractions of methanolic extract of the golden chanterelle mushroom *Cantharellus cibarius* (higher basidiomycetes) from Iran. *Int. J. Med. Mushrooms.* 2015;17(6):557-565. DOI 10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i6.60.
- El Enshasy H.A., Hatti-Kaul R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(12):668-677. DOI 10.1016/j.tibtech.2013.09.003.
- Erko B., Degarege A., Tadesse K., Mathiwos A., Legesse M. Efficacy and side effects of praziquantel in the treatment of *Schistosomiasis mansoni* in schoolchildren in Shesha Kekele Elementary School, Wondo Genet, Southern Ethiopia. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2012; 2(3):235-239. DOI 10.1016/S2221-1691(12)60049-5.
- Greenberg R.M. Schistosome ABC multidrug transporters: From pharmacology to physiology. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2014; 4(3):301-309. DOI 10.1016/j.ijpdr.2014.09.007.
- Keiser J., Adelfio R., Vargas M., Odermatt P., Tesana S. Activity of tribendimidine and praziquantel combination therapy against the liver fluke *Opisthorchis viverrini* *in vitro* and *in vivo*. *J. Helminthol.* 2013;87(2):252-256. DOI 10.1017/S0022149X12000387.
- Khalili M., Ebrahimzadeh M.A., Omrani F., Karami M. Antihypoxic activities of the golden chanterelle mushroom, *Cantharellus cibarius* (higher Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms.* 2014;16(4):339-344.
- Khalili M., Ebrahimzadeh M.A., Kosaryan M., Abbasi A., Azadbakht M. Iron chelation and liver disease healing activity of edible mushroom (*Cantharellus cibarius*), *in vitro* and *in vivo* assays. *RSC Adv.* 2015;5:4804-4810.
- Kozarski M., Klaus A., Vunduk J., Zizak Z., Niksic M., Jakovljevic D., Vrvic M.M., Van Griensven L.J.L.D. Nutraceutical properties of the methanolic extract of edible mushroom *Cantharellus cibarius* (Fries): primary mechanisms. *Food Funct.* 2015;6:1875-1886. DOI 10.1039/c5fo00312a.
- Kukina T.P., Shcherbakov D.N., Gensh K.V., Tulysheva E.A., Salmikova O.I., Grazhdannikov A.E., Kolosova E.A. Bioactive constituents from sea buckthorn *Hippophae rhamnoides* L tree green. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja = Chemistry of Plant Raw Material.* 2016;1:37-42. (in Russian)
- Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. *Parasitol. Int.* 2012;61(1):25-31. DOI 10.1016/j.parint.2011.07.021.
- Muszyńska B., Kała K., Firlej A., Sułkowska-Złaja K. *Cantharellus cibarius* – culinary-medicinal mushroom content and biological activity. *Acta Pol. Pharm.* 2016;73(3):589-598.
- Nair N.N., Bommana A., Pakala S.B., Ohshiro K., Lyon A.J., Suttiprapa S., Periago M.V., Laha L., Hotez P.J., Bethony J.M., Sripa B., Brindley P.J., Kumar R. Inflammatory response to liver fluke *Opisthorchis viverrini* depends on host-master coregulator, MTA1, a marker for parasite induced cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2011; 54(4):1388-1397. DOI 10.1002/hep.24518.
- Nyman A.A.T., Aachmann F.T., Rise F., Balance S., Samuelsen A.B.C.

- Structural characterization of a branched (1→6)- α -mannan and β -glucans isolated from the fruiting bodies of *Cantharellus cibarius*. *Carbohydr. Polym.* 2016;146:197-207. DOI 10.1016/j.carbpol.2016.03.052.
- Pakharukova M.Y., Shilov A.G., Pirozhkova D.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. The first comprehensive study of praziquantel effects *in vivo* and *in vitro* on European liver fluke *Opisthorchis felineus* (Trematoda). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2015;46(1):94-100. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.012.
- Paltsev A.I. Chronic opisthorchiasis in scope of system approach. *Russkyy Meditsynskyy Zhurnal = Russian Medical Journal.* 2005;2:96-101. (in Russian)
- Pinlaor S., Prakobwong S., Boonmars T., Wongkham C., Pinlaor P., Hiraku Y. Effect of praziquantel treatment on the expression of matrix metalloproteinases in relation to tissue resorption during fibrosis in hamsters with acute and chronic *Opisthorchis viverrini* infection. *Acta Trop.* 2009;111(2):181-191. DOI 10.1016/j.actatropica.2009.04.011.
- Protsenko M.A., Kostina N.E., Teplyakova T.V. Selection of nutrient media for submerged culturing of wood-destroying mushroom of *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer. *Biotechnologiya = Biotechnology.* 2018; 34(1):45-51. (in Russian)
- Saltykova I.V., Petrov V.A., Logacheva M.D., Ivanova P.G., Merzlikin N.V., Sazonov A.E., Ogorodova L.M., Brindley P.J. Biliary microbiota, gallstone disease and infection with *Opisthorchis felineus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(7):e0004809. DOI 10.1371/journal.pntd.0004809.
- Sari M., Prange A., Lelley J.L., Hambitzer R. Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chem.* 2017;216:45-51. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.08.010.
- Sripa B. Pathobiology of opisthorchiasis: an update. *Acta Trop.* 2003; 88(3):209-220. DOI 10.1016/j.actatropica.2003.08.002.
- Sripa B., Bethony J.M., Sithithaworn P., Kaewkes S., Mairiang E., Loukas A., Mulvenna J., Laha T., Hotez P.J., Brindley P.J. Opisthorchiasis and *Opisthorchis*-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Trop.* 2011;120(1):158-168. DOI 10.1016/j.actatropica.2010.07.006.
- Teufack S.E.N., Tayo G.N.M., Alidou M.N., Yondo J., Djiozene A.F., Poné J.W., Mbida F.M. Anthelmintic properties of methylene chloride-methanol (1:1) extracts of two Cameroonian medicinal plants on *Heligmosomoides bakeri* (Nematoda: Heligmosomatidea). *BMC Complement. Altern. Med.* 2017;17:400. DOI 10.1186/s12906-017-1908-8.
- Valverde M.E., Hernández-Pérez T., Paredes-López O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *Int. J. Microbiol.* 2015;2015:376-387. DOI 10.1155/2015/376387.
- Vamanu E., Nita S. Bioactive compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Cantharellus cibarius*. *Rev. Chim.* 2014;65(3):372-379.
- Wonkchalee O., Boonmars T., Aromdee C., Laummaunwai P., Khunkitti W., Vaeteewoottacharn K., Sriraj P., Aukkanimart R., Loilome W., Chamgramol Y., Pairojkul C., Wu Z., Juasook A., Sudsarn P. Anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective effects of *Thunbergia laurifolia* Linn. on experimental opisthorchiasis. *Parasitol. Res.* 2012;111(1):353-359. DOI 10.1007/s00436-012-2846-5.
- Yurlova N.I., Yadrenkina E.N., Rastyazhenko N.M., Serbina E.A., Glupov V.V. Opisthorchiasis in Western Siberia: epidemiology and distribution in human, fish, snail, and animal populations. *Parasitol. Int.* 2017;66(4):355-364. DOI 10.1016/j.parint.2016.11.017.
- Zelentsov A.G. Susceptibility of inbred mice to helminths. II. Development of *Opisthorchis felineus* in mice of strains A/He, CBA/Lac, CC57w/MJ, C57BL/LJ, DBA/2J and SWR/J. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Diseases.* 1974; 43(1):95-98. (in Russian)

ORCID ID

M.A. Tsyganov orcid.org/
G.B. Vishnivetskaya orcid.org/
T.P. Kukina orcid.org/
I.V. Sorokina orcid.org/
M.N. Lvova orcid.org/
M.A. Protsenko orcid.org/
N.E. Kostina orcid.org/
D.F. Avgustinovich orcid.org/



Роль полиморфного локуса *VNTR* гена агрекана в развитии остеоартроза у женщин

Д.А. Шаповалова¹✉, А.В.Тюрин², С.С. Литвинов¹, Э.К. Хуснутдинова¹, Р.И. Хусаинова¹

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, Россия

Остеоартроз (ОА) – наиболее распространенное многофакторное заболевание суставов, одним из вероятных факторов риска развития которого является недифференцированная дисплазия соединительной ткани (нДСТ) – генетически детерминированное нарушение структуры соединительной ткани, в том числе и в суставах. Проблема сочетания ОА с фенотипическими проявлениями нДСТ чрезвычайно актуальна, является как фундаментальной, так и практической задачей, решение которой будет способствовать разработке подходов ранней диагностики ОА и профилактике заболевания. Агрекан представляет собой основной протеогликан внеклеточного матрикса суставного хряща, он отвечает за способность ткани выдерживать сжимающие нагрузки. У 316 женщин (средний возраст 50.5 ± 4.77), обследованных на наличие признаков нДСТ и ОА, выполнено исследование полиморфизма *VNTR* гена агрекана (*ACAN*), который представлен варибельным числом тандемных повторов, каждый из которых состоит из 57 нуклеотидов. Осуществлен поиск ассоциаций изученного локуса с ОА в целом, с учетом локализации патологического процесса, а также наличия признаков нДСТ. Обнаружено 12 аллельных вариантов и 24 генотипа *VNTR* полиморфизма гена агрекана (*ACAN*), наиболее частыми оказались аллели с 27, 28 и 26 повторами. Установлена значимость аллеля с 27 повторами в формировании остеоартроза у женщин в целом ($\chi^2 = 6.297$, $p = 0.012$, odds ratio (OR) = 1.50; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1.09–2.05), ОА коленных суставов ($\chi^2 = 4.613$, $p = 0.031$, OR = 1.52; 95 % ДИ 1.04–2.23) и полиартроза ($\chi^2 = 4.181$, $p = 0.04$, OR = 1.68; 95 % ДИ 1.02–2.78). Гомозиготный генотип *27*27 ассоциирован с остеоартрозом в целом как в изолированном состоянии ($\chi^2 = 3.921$, $p = 0.047$, OR = 1.72; 95 % ДИ 1–2.96), так и в сочетании с недифференцированной дисплазией соединительной ткани ($\chi^2 = 5.415$, $p = 0.019$, OR = 2.34; 95 % ДИ 1.13–4.83) у женщин.

Ключевые слова: остеоартроз; недифференцированная дисплазия соединительной ткани; агрекан; *VNTR* полиморфизм; генетическая предрасположенность.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шаповалова Д.А., Тюрин А.В., Литвинов С.С., Хуснутдинова Э.К., Хусаинова Р.И. Роль полиморфного локуса *VNTR* гена агрекана в развитии остеоартроза у женщин. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):865-872. DOI 10.18699/VJ18.427

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shapovalova D.A., Tyurin A.V., Litvinov S.S., Khusnutdinova E.K., Khusainova R.I. The role of *VNTR* aggrecan gene polymorphism in the development of osteoarthritis in women. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):865-872. DOI 10.18699/VJ18.427 (in Russian)

Received 30.03.2018

Accepted for publication 18.06.2018

© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: daria-ufa92@mail.ru

The role of *VNTR* aggrecan gene polymorphism in the development of osteoarthritis in women

D.A. Shapovalova¹✉, A.V. Tyurin², S.S. Litvinov¹, E.K. Khusnutdinova¹, R.I. Khusainova¹

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

² Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia

Osteoarthritis (OA) is a common multifactorial joint disease. Undifferentiated connective tissue dysplasia (uCTD) is a genetically determined lesion of the connective tissue structures, including joints, and it can be one of the factors predisposing to development of OA. Solving the problem of comorbidity of OA and uCTD signs will contribute to the early diagnosis and prophylactics of OA. Aggrecan is one of the major structural components of cartilage and it provides the ability to resist compressive loads throughout life. We examined 316 women (mean age 50.5 ± 4.77) for signs of uCTD and OA. A study of the aggrecan gene (*ACAN*) *VNTR* polymorphism, which is represented by a variable number of 57 nucleotide repeats, was performed. We searched for associations between the *VNTR* locus and OA in general and with an account of the localization of the pathological process, as well as with the presence of uCTD signs. Twelve allelic variants and 24 genotypes of the *VNTR* polymorphism of the aggrecan gene (*ACAN*) were identified, the most frequent variants were alleles with 27, 28 and 26 repeats. A significance of allele *27 ($\chi^2 = 6.297$, $p = 0.012$, odds ratio (OR) = 1.50; 95 % confidence interval (CI) 1.09–2.05) in the development of OA in general, knee OA ($\chi^2 = 4.613$, $p = 0.031$, OR = 1.52; 95 % CI 1.04–2.23), and multiple OA ($\chi^2 = 4.181$, $p = 0.04$, OR = 1.68; 95 % CI 1.02–2.78) was revealed. Homozygous genotype *27*27 was associated with OA ($\chi^2 = 3.921$, $p = 0.047$, OR = 1.72; 95 % CI 1–2.96), and OA with uCTD signs in women ($\chi^2 = 5.415$, $p = 0.019$, OR = 2.34; 95 % CI 1.13–4.83).

Key words: osteoarthritis; non-differentiated connective tissue dysplasia; aggrecan; *VNTR* polymorphism; genetic predisposition.

Остеоартроз (остеоартрит – в зарубежной литературе) – прогрессирующее заболевание суставов неизвестной этиологии, характеризующееся поражением всех компонентов сустава – хряща, субхондральной кости, синовиальной оболочки, связок, капсулы околоуставных мышц (Reynard, Loughlin, 2013; Steinberg, Zeggini, 2016). Остеоартроз (ОА) является самым распространенным заболеванием суставов в мире, он поражает примерно 10 % мужчин и 18 % женщин старше 60 лет (Wang et al., 2016).

Множество факторов, включая возраст, женский пол, избыточный вес тела, травмы, аномалии развития суставов, вносят вклад в развитие ОА (Brandt et al., 2009; Musumeci et al., 2015). Одним из таких факторов, вероятно предрасполагающих к развитию ОА, выступает недифференцированная дисплазия соединительной ткани (нДСТ) – генетически детерминированное нарушение развития соединительной ткани, характеризующееся дефектами волокнистых структур и основного вещества, приводящее к расстройству гомеостаза на тканевом, органном и организменном уровнях (Тябут, Каратыш, 2009). В номенклатуре болезней (МКБ-10) термин «дисплазия соединительной ткани» не значит нозологической единицей, отдельные синдромы как дифференцированных (наследственных), так и недифференцированных (многофакторных) форм ДСТ «рассеяны» в различных рубриках XIII и XVII классов.

Считается, что у 10–22.5 % населения мира встречаются фенотипические признаки нДСТ различной выраженности, не укладывающиеся в структуру наследственных синдромов (Кадурина, Горбунова, 2009), которые, как правило, носят прогрессирующий характер и лежат в основе формирования значительного числа соматической патологии, ухудшая прогноз основного заболевания (Земцовский, 2008).

Недифференцированная дисплазия соединительной ткани характеризуется нарушением строения и функций межклеточного вещества соединительной ткани, что патогенетически сходно с развитием ОА (Нечаева и др., 2008; Яковлев, Нечаева, 2011). Такие изменения затрагивают не только фибриллярный компонент матрикса – волокна коллагена, эластина, фибриллина, но и другие компоненты матрикса, важнейший из которых – агрекан. Он представляет собой главный протеогликан суставного хряща, отвечает за способность ткани выдерживать сжимающие нагрузки, с которыми суставы сталкиваются на протяжении всей жизни. Эта функция тесно связана со структурой макромолекулы агрекана, образующей большие протеогликановые агрегаты в сочетании с гиалуроновой кислотой (Roughley, Mort, 2014; Mort et al., 2016). Агрекан содержит три сферических домена (G1, G2, G3) и короткий интерглобулярный домен между G1 и G2 доменами (Doerge et al., 1991; de Souza et al., 2008). Область G1 отвечает за взаимодействие гиалуроновой кислоты с агреканом (Hardingham, 1979), длинный домен гликозаминогликана, находящийся между доменами G2 и G3, состоит из смежных областей, содержащих цепи кератинсульфата (КС) и хондроитинсульфата (ХС) (Roughley et al., 2006). Цепи КС и ХС обеспечивают осмотические свойства, ответственные за сохранение воды при нагруз-

ках, предотвращая повреждения тканей (Urban et al., 1979; Mort et al., 2016). Белок агрекан кодируется геном *ACAN* (*AGCI*), расположенным на 15-й хромосоме в регионе *q26.1* (Doerge et al., 1991; de Souza et al., 2008). Установлена роль мутаций этого гена в развитии некоторых видов хондродисплазии, множественно-эпифизальной дисплазии, рассекающего остеохондрита, сопровождающихся развитием раннего ОА (Gibson, Briggs, 2016). Ряд исследований выявил ассоциации полиморфных вариантов гена агрекана с развитием патологии межпозвоночных дисков и связочного аппарата (Kawaguchi et al., 1999; Roughley et al., 2006; Ryder et al., 2008; Xu et al., 2012). Обнаружена значимость *VNTR* полиморфизма, расположенного в 12-м экзоне гена агрекана, который состоит из варьирующего числа tandemных повторов протяженностью 57 нуклеотидов, кодирующих 19 аминокислот. Описаны аллели в диапазоне от 13 до 34 повторов. Каждый повтор содержит серин-глициновые пары как две возможные точки крепления для цепей ХС, крайний диапазон аллелей может обуславливать вариацию количества ХС цепей в мономере белка до 30 % (Rodriguez et al., 2006; de Souza et al., 2008). Таким образом, длина основного белка изменяется прямо пропорционально количеству повторов, изменение этой длины может привести к изменениям в функциональных свойствах соединительной ткани и хряща (Doerge et al., 1997). Имеющиеся данные о влиянии аллелей *VNTR* на соединительную ткань противоречивы и требуют дальнейших исследований.

Целью настоящего исследования был поиск ассоциаций аллелей и генотипов *VNTR* локуса гена *ACAN* с формированием ОА различных локализаций с учетом наличия признаков нДСТ у женщин, проживающих в Республике Башкортостан.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования использовали образцы ДНК 316 женщин (средний возраст 50.5 ± 4.77), обследованных на наличие признаков нДСТ и ОА в терапевтическом отделении городской клинической больницы № 18, а также в поликлиниках № 2, 18, 38 Уфы. Исследование одобрено биоэтическими комитетами ФГБОУ ВО Башкирского государственного медицинского университета и Института биохимии и генетики обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта».

По этническому составу выборку составляли женщины: 116 (37 %) русского, 122 (36 %) – татарского, 27 (8 %) башкирского происхождения, метисы и представители других этносов – 51 (16 %). Этническая принадлежность определялась на основании информации о предках до третьего поколения. В связи с этнической неоднородностью выборки нами проведена оценка наличия значимых различий в распределении частот генотипов между группами разной этнической принадлежности с применением компьютерной программы RxC (Rows × Columns), кото-

рая позволяет провести точный тест Фишера на таблице сопряженности любого размера посредством использования алгоритма Метрополиса (Miller, 1997). Не выявлено статистически значимых различий между группами лиц с русской, татарской и башкирской этнической принадлежностью ($p = 0.089$), что позволяет рассматривать выборку без разделения на группы по этнической принадлежности.

Критерием исключения из исследования были наличие онкологической патологии, системных заболеваний соединительной ткани, признаков активного воспалительного процесса как инфекционной, так и неинфекционной этиологии, травматические повреждения суставов в анамнезе, беременность (или кормящие женщины), отказ от участия в исследовании.

Группу женщин с ОА составили 155 пациенток, группу сравнения – 161 женщина без признаков ОА. Диагноз ОА выставлен в соответствии с критериями Американской ассоциации ревматологов (1995 г.), классификацией В.А. Насоновой и М.Г. Астапенко (1989) и рентгенологическим подтверждением. Полиартроз диагностирован у 38 женщин (24.52 %), гонартроз – у 81 (52.26 %), коксоартроз – у 36 женщин (23.22 %). Рентгенологическая стадия II (по Kellgren-Lawrence) была у 97 пациенток (61.4 %), III – у 40 (25.3 %), IV – у 21 (13.3 %). Длительность заболевания составила от 3 до 18 лет (в среднем 4.7 ± 1.8 года). Симптомокомплекс нДСТ был выявлен у 151 человека, среди них у 123 женщин (81.45 %) – легкой степени, у 28 (18.54 %) – выраженной степени. Наличие фенотипических признаков нДСТ оценивалось в баллах по критериям, предложенным Т.И. Кадуриной и Л.Н. Аббакумовой (2008), в модификации авторов. При сумме баллов от 9 до 14 определялась нДСТ легкой степени, свыше 15 баллов – выраженная. Было сформировано несколько групп сравнения, в зависимости от наличия и отсутствия признаков ОА в изолированном и коморбидном состояниях с нДСТ, локализации ОА и выраженности нДСТ. Численность каждой выборки указана в табл. 1–3.

ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1985). Генотипирование проводили с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Фрагменты полиморфного локуса *VNTR* гена *ACAN* были амплифицированы с использованием прямого праймера 5'-TAG AGG GCT CTG CCT CTG GAG TTG-3' и обратного праймера 5'-AGG TCC CCT ACC GCA GAG GTA GAA-3'. Для реакции амплификации использовали прибор Thermal Cycler 2720 Applied Biosystems. Амплифицированные фрагменты варьировали от 1143 пар оснований (п. о.) для аллеля с 19 повторами, до 1770 п. о. для аллеля с 30 повторами. Продукты ПЦР разделяли в 6 % полиакриламидном геле при одинаковой длине разгона (25 см) и окрашивали раствором бромид аэтидия. Число повторов подтверждено методом секвенирования по Сэнгеру. Оценку результатов электрофореза осуществляли с использованием видеогельдокументирующей системы Geldokulant (Франция).

Статистическая обработка полученных данных проведена на основании общепринятых методов вариационной статистики с использованием стандартных пакетов Microsoft Excel 2007, Statistica 6.0, MedCalc, Rows × Co-

lums. При сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 . Для таблиц сопряженности 2×2 использован критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность, если частота хотя бы в одной ячейке таблицы была меньше или равна 5. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов (OR). Исследование клинико-генетических взаимодействий проводилось с использованием метода многофакторной логистической регрессии с построением ROC-кривых; состоятельность итоговых уравнений регрессии оценивали путем вычисления площади под кривой (AUC – area under ROC curve), показатель которой в диапазоне 0.6–0.7 считался средним, 0.7–0.8 – хорошим, 0.8–0.9 – очень хорошим. Поправка на множественность сравнений рассчитывалась с применением метода Бенджамини–Хокберга (FDR – false discovery rate).

Результаты

В исследованной нами выборке женщин выявлено 12 аллельных вариантов и 29 генотипов *VNTR* полиморфизма гена *ACAN*, содержащих от 19 до 30 повторов, наиболее частыми из которых оказались аллели с 26 (14.74 %), 27 (44.47 %) и 28 (31.97 %) повторами как у пациентов с ОА, так и в контрольной группе (см. табл. 1). Аллели с числом повторов 19, 20, 21, 24, 30 были редкими и встречались в единичных случаях. Гетерозиготность по исследуемому локусу в целом составила 62.97 %.

Для подтверждения размера повторов нами было выбрано три гомозиготных по исследуемому локусу образца с разным числом повторов и проведено секвенирование по Сэнгеру. При этом были обнаружены вариации нуклеотидов (ACC ACT, ACC GCT, ACT GCT и ACT ACT) в 17 и 18 кодонах внутри повторов, состоящих из 57 нуклеотидов (19 кодонов). В исследованиях К.Д. Doege с коллегами (1997) сообщалось о полиморфизме внутри повторов, наши результаты согласуются с этими данными. Вариант ACT GCT является самым распространенным. Таким образом, существует не только полиморфизм в числе повторов, но и однонуклеотидный полиморфизм внутри локуса, что приводит к высокой гетерогенности белка агрекана.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей между группами пациентов и контроля выявил статистически значимые различия по частоте аллеля *27 между группами женщин с ОА (0.497) и контроля (0.398) ($\chi^2 = 6.297, p = 0.012$), OR составил 1.50 (95 % ДИ 1.09–2.05), что свидетельствовало о повышенном риске развития ОА для носителей аллеля *27. При рассмотрении выборки пациентов с ОА, в зависимости от локализации патологического процесса, аллель *27 наиболее часто встречался у женщин с артрозом нескольких суставов (полиартроз), достигая 0.526, с наименьшей частотой выявлен у женщин с коксартрозом (0.458). Обнаружена ассоциация аллеля *27 с полиартрозом и гонартрозом ($\chi^2 = 4.181; p = 0.04$; OR = 1.68 (95 % ДИ 1.02–2.78) и $\chi^2 = 4.613; p = 0.031$; OR = 1.52 (95 % ДИ 1.04–2.23) соответственно). Отсутствие ассоциации с ОА тазобедренного сустава, возможно, связано с малочисленностью этой группы женщин. Таким образом, аллель *27 является маркером риска развития ОА в целом и его различных локализаций.

Table 1. Comparison of allelic frequencies of the VNTR polymorphism in the ACAN gene in women with OA, hip OA, knee OA, polyarthritis, and the control group

Allele	Groups compared				
	Control (161)	OA (155)	HOA (36)	KOA	PA (38)
19	1 (0.003)	0	0	0	0
20	0	2 (0.006)	0	1 (0.006)	1 (0.013)
21	1 (0.003)	1 (0.003)	0	1 (0.006)	0
22	0	2 (0.006)	1 (0.014)	0	1 (0.013)
23	1 (0.003)	3 (0.011)	0	2 (0.012)	1 (0.013)
24	1 (0.003)	0	0	0	0
25	13 (0.040)	6 (0.019)	0	3 (0.019)	3 (0.040)
26	52 (0.161)	42 (0.135)	13 (0.181)	22 (0.136)	7 (0.092)
27	128 (0.397)	154 (0.497) $\chi^2 = 6.297$ $p = 0.012$ OR = 1.50 CI 1.09–2.05	33 (0.458) $\chi^2 = 0.900$ $p = 0.342$	81 (0.500) $\chi^2 = 4.613$ $p = 0.031$ OR = 1.52 CI 1.04–2.23	40 (0.526) $\chi^2 = 4.181$ $p = 0.04$ OR = 1.68 CI 1.02–2.78
28	117 (0.363)	95 (0.306)	24 (0.333)	48 (0.297)	23 (0.303)
29	8 (0.025)	3 (0.011)	1 (0.014)	2 (0.012)	0
30	0	2 (0.006)	0	2 (0.012)	0

Designations: HOA, hip osteoarthritis; KOA, knee osteoarthritis; PA, polyarthritis (involving several joints).

Table 2. Comparison of allelic frequencies of the VNTR polymorphism in the ACAN gene in OA women with uCTD signs, uCTD of various grades, and control groups

Allele	Groups compared				Groups compared	
	Control (165)	uCTD (151)	uCTD moderate (123)	uCTD severe (28)	OA+ uCTD+ (93)	OA- uCTD- (103)
19	1 (0.003)	0	0	0	0	1 (0.005)
20	0	2 (0.007)	2 (0.008)	0	2 (0.011)	0
21	1 (0.003)	1 (0.003)	1 (0.004)	0	1 (0.005)	1 (0.005)
22	1 (0.003)	1 (0.003)	1 (0.004)	0	1 (0.005)	0
23	3 (0.009)	1 (0.003)	0	1 (0.018)	1 (0.005)	1 (0.005)
24	1 (0.003)	0	0	0	0	1 (0.005)
25	12 (0.036)	7 (0.023)	4 (0.017)	3 (0.054)	4 (0.022)	10 (0.048)
26	55 (0.167)	39 (0.129)	33 (0.134)	6 (0.107)	23 (0.124)	36 (0.175)
27	138 (0.418)	144 (0.477) $\chi^2 = 2.194$ $p = 0.138$	117 (0.476)	27 (0.482)	92 (0.495) $\chi^2 = 6.305$ $p = 0.012^*$ OR = 1.674 CI 1.12–2.51	76 (0.369)
28	110 (0.334)	102 (0.339)	84 (0.341)	18 (0.321)	60 (0.323)	75 (0.364)
29	7 (0.021)	4 (0.013)	3 (0.012)	1 (0.018)	1 (0.005)	5 (0.024)
30	1 (0.003)	1 (0.003)	1 (0.004)	0	1 (0.005)	0

* The association remains significant after applying the multifactorial logistic regression analysis.
uCTD, undifferentiated connective tissue dysplasia.

При анализе распределения частот аллелей изучаемого полиморфизма у пациентов с ОА с учетом наличия нДСТ нами было обнаружено статистически значимое преобладание аллеля *27 у лиц с ОА в сочетании с нДСТ (0.495)

($\chi^2 = 6.305$, $p = 0.012$, OR = 1.67; 95 % ДИ 1.12–2.51), при этом показатель OR стал выше, чем при анализе ОА без учета признаков нДСТ, что свидетельствует о повышении риска развития ОА у женщин с нДСТ (см. табл. 2).

Table 3. Comparison of allelic frequencies of the *VNTR* polymorphism in the *ACAN* gene in patients with OA vs. the control group, patients with uCTD vs. the control group, and OA + uCTD patients vs. the control group in women

Genotype	Groups compared		Groups compared		Groups compared	
	OA+ (155)	OA- (161)	uCTD+ (151)	uCTD- (165)	OA+uCTD+ (93)	OA-uCTD- (103)
19/27	0	1 (0.006)	0	1 (0.006)	0	1 (0.010)
20/25	1 (0.006)	0	1 (0.007)	0	1 (0.011)	0
20/28	1 (0.006)	0	1 (0.007)	0	1 (0.011)	0
21/27	0	1 (0.006)	0	1 (0.006)	0	1 (0.010)
21/28	1 (0.006)	0	1 (0.007)	0	1 (0.011)	0
22/28	2 (0.013)	0	1 (0.007)	1 (0.006)	1 (0.011)	0
23/27	1 (0.006)	1 (0.006)	1 (0.007)	1 (0.006)	1 (0.011)	1 (0.010)
23/28	1 (0.006)	0	0	1 (0.006)	0	0
24/27	0	1 (0.006)	0	1 (0.006)	0	1 (0.010)
25/26	1 (0.006)	1 (0.006)	0	2 (0.013)	0	1 (0.010)
25/27	3 (0.020)	8 (0.051)	5 (0.033)	6 (0.036)	3 (0.032)	6 (0.058)
25/28	1 (0.006)	3 (0.019)	1 (0.007)	3 (0.018)	0	2 (0.019)
25/29	0	1 (0.006)	0	1 (0.006)	0	1 (0.010)
26/26	1 (0.006)	4 (0.025)	0	5 (0.030)	0	4 (0.039)
26/27	24 (0.156)	20 (0.124)	17 (0.113)	27 (0.164)	11 (0.117)	14 (0.136)
26/28	15 (0.098)	23 (0.143)	22 (0.145)	16 (0.097)	12 (0.129)	13 (0.126)
26/29	1 (0.006)	0	0	1 (0.006)	0	0
27/27	41 (0.265) $\chi^2 = 3.921$ $p = 0.047$ OR = 1.72 CI 1–2.96	28 (0.174)	39 (0.258)	30 (0.182)	25 (0.269) $\chi^2 = 5.415$ $p = 0.019^*$ OR = 2.34 CI 1.13–4.83	14 (0.136)
27/28	41 (0.265)	35 (0.217)	38 (0.251)	38 (0.230)	25 (0.269)	22 (0.213)
27/29	2 (0.013)	5 (0.031)	4 (0.026)	3 (0.018)	1 (0.011)	2 (0.019)
27/30	1 (0.006)	0	1 (0.007)	0	1 (0.011)	0
28/28	16 (0.104)	27 (0.168)	19 (0.125)	24 (0.145)	10 (0.107)	18 (0.175)
28/29	0	2 (0.012)	0	2 (0.013)	0	2 (0.019)
28/30	1 (0.006)	0	0	1 (0.006)	0	0

* The association remains significant after multifactorial logistic regression analysis.

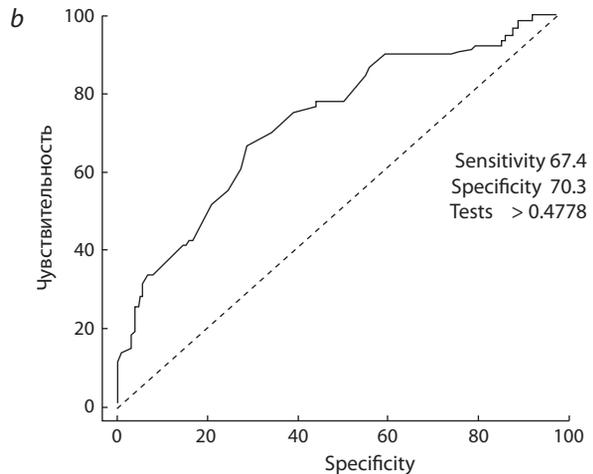
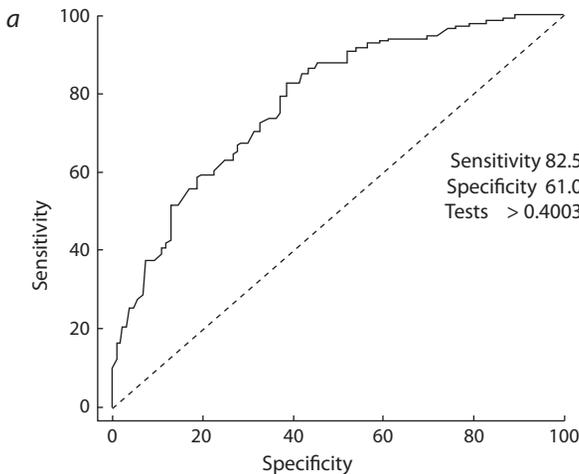
Не выявлена ассоциация аллеля *27 ($\chi^2 = 2.194$, $p = 0.138$) с нДСТ без учета наличия патологии сустава и с учетом ее степени тяжести (см. табл. 2).

Сравнительный анализ распределения частот генотипов локуса *VNTR* гена *ACAN* показал, что гомозиготный генотип *27*27 статистически значимо чаще встречается также у женщин с ОА без учета наличия признаков нДСТ (0.265) и с ОА в сочетании с нДСТ (0.269) по сравнению с группами контроля (0.174 и 0.136; $\chi^2 = 3.921$, $p = 0.047$ и $\chi^2 = 5.415$, $p = 0.019$ соответственно) и оказался маркером повышенного риска развития ОА в изолированном и коморбидном с нДСТ состояниях (OR = 1.72; 95 % ДИ 1–2.96 и OR = 2.34; 95 % ДИ 1.13–4.83) соответственно (см. табл. 3).

С учетом того что заболевание многофакторное, для комплексной оценки клинико-генетических взаимодей-

ствий был применен метод многофакторной логистической регрессии. Были использованы две модели – для развития ОА в целом и для ОА в сочетании с нДСТ (рисунки).

В предварительное уравнение регрессии было включено четыре клинических предиктора (возраст, индекс массы тела, степень тяжести нДСТ, сумма баллов нДСТ) и варианты генотипов локуса *VNTR*. По результатам анализа, в итоговое уравнение регрессии для ОА в целом вошли возраст, наличие нДСТ и генотип *27*27 локуса *VNTR*, для сочетания ОА и нДСТ – возраст и генотип *27*27 локуса *VNTR*. Обе полученные модели были статистически значимы ($F = 2.76$; $p = 0.0078$ и $F = 2.15$; $p = 0.0055$ соответственно) и обладали достаточной прогностической состоятельностью (AUC = 0.781 и AUC = 0.727 соответственно).



ROC analysis: (a) for OA; (b) for OA with uCTD signs.

Несмотря на снижение статистической значимости ряда ассоциаций после введения поправки на множественность сравнений, тенденция к преобладанию частоты генотипа *27*27 сохраняется в целом и для сочетанной патологии (OA + нДСТ +), являясь предиктором в регрессионной модели. Это позволяет рассматривать *27*27 как один из факторов риска развития патологии и подчеркивает его роль в патогенезе нарушения метаболизма соединительной ткани.

Таким образом, выявлена ассоциация аллеля *27 *VNTR* полиморфизма гена *ACAN* и его гомозиготного генотипа в формировании OA в целом, различных локализаций и в сочетании с нДСТ у женщин.

Обсуждение

Результаты исследований влияния аллельных вариантов локуса *VNTR* гена *ACAN* на состояние хряща и соединительной ткани немногочисленны и противоречивы. Длина основного белка изменяется прямо пропорционально количеству повторов, и вариация этой длины может привести к нарушению функции хряща при OA, внося свой вклад в структуру внеклеточного матрикса и его механические свойства (Doege et al., 1997; de Souza et al., 2008). Молекулы агрекана, имеющие более длинные домены ХС, будут обладать повышенной плотностью и, предположительно, лучшими осмотическими свойствами. Поэтому можно прогнозировать, что ткань, содержащая агрекан с более короткими доменами ХС, может функционально уступать и быть более восприимчивой к механическому воздействию. Однако такая закономерность соблюдается не всегда.

Исследования *VNTR* полиморфизма в популяциях России ранее не проводились. В числе первых нозологий, при которых изучена роль *VNTR* полиморфизма гена *ACAN*, были боль в спине и дегенеративные поражения межпозвоночных дисков. Результаты этих исследований обобщены в двух метаанализах. В одном из них, проведенном J. Gu с коллегами (2013), использованы данные 965 больных с дегенеративными поражениями межпозвоночных дисков и 982 человек контрольной группы из восьми исследований. Все обследованные были разделены на три

группы, в зависимости от количества повторов локуса *VNTR* – «короткие» аллели (13–25 повторов), «нормальные» (26–27 повторов) и «длинные» (28–32 повторов). Короткие аллели увеличивали риск развития заболевания на 56 % в целом (OR 1.54; $p = 0.03$) и до 65 % у пациентов азиатской этнической группы (OR = 1.65; $p = 0.004$). Анализ европеоидов не выявил статистически значимых ассоциаций. В другом метаанализе, опубликованном годом ранее, G. Xu с коллегами (2012) проводили сравнение между пациентами с малым (менее 23 и 25) и большим числом повторов. Короткие аллели увеличивали риск развития заболевания как в целом по популяции, так и при делении, в зависимости от этнической принадлежности.

T.V. de Souza с коллегами (2008) выявили ассоциацию коротких аллельных вариантов локуса *VNTR* с развитием ревматоидного артрита. Значение «аллельного индекса» – средней длины двух аллелей – в группе контроля статистически значимо превышало таковое у пациентов с ревматоидным артритом (53.7 и 52.7 соответственно, $p = 0.001$).

Изучение влияния локуса *VNTR* гена *ACAN* на развитие OA началось в конце 20-го века. По результатам работ W.E. Horton с коллегами (1998), в выборке из 93 мужчин (от 60 лет и старше) наличие аллеля *27 было ассоциировано с OA кистей (OR = 3.23), но не было обнаружено статистически значимой связи между аллелем *27 и OA других локализаций, что частично согласуется с полученной нами ассоциацией аллеля *27 с OA в целом, а также с OA коленных суставов и полиостеоартрозом.

В исследовании O.P. Kämäräinen с коллегами (2006), включавшем 630 женщин финской популяции от 45 до 60 лет, напротив, аллель *27 был протективным в развитии OA кистей рук. Аллельные варианты с большим количеством повторов (28–34) в гомозиготном состоянии увеличивали риск развития патологии ($p = 0.036$; OR = 1.73), что противоречит результатам наших исследований. P.J. Roughley с коллегами (2006) не обнаружили статистической связи между аллелем *27 и OA у 63 мужчин и женщин европейского происхождения с OA тазобедренных суставов, что подтверждают и наши результаты.

Исследование 134 близнецов К.М. Kirk с коллегами (2003) показало незначительный протективный эффект аллелей *25 и *26 для развития гонартроза и *28 для развития коксартроза, что также не противоречит нашим данным.

По результатам секвенирования и сравнения с результатами К.Д. Доеге с коллегами (1997), нами был обнаружен уже известный полиморфизм в 17-м и 18-м кодонах каждого повтора, встречающийся во всех трех гомозиготных исследованных образцах, содержащих 19 и 26 повторов внутри каждого аллеля. Наши исследования подтверждают также описанный ранее аминокислотный полиморфизм, поскольку замена первого или последнего нуклеотида 18-го или 19-го кодона приводит к чередованию аминокислот Thr/Ser/Ala.

Таким образом, полученные нами результаты являются ценным вкладом в представления о роли полиморфного локуса *VNTR* гена *ACAN* при нарушении структуры и функции соединительной ткани и хряща. Ассоциация аллеля *27 и его гомозиготного генотипа с развитием патологии суставов демонстрирует неоднозначность суждения о влиянии длины белковой молекулы на морфофункциональные характеристики суставного хряща и соединительной ткани в целом. Вероятно, этот аллельный вариант и его белковый продукт могут обладать повышенным сродством к воздействию протеолитических ферментов, отвечающих за катаболизм межклеточного матрикса соединительной ткани. Для окончательного установления роли *VNTR* полиморфизма гена *ACAN* в развитии заболеваний соединительной ткани в целом и ОА в частности необходимы проведение исследований в популяциях разных регионов и различного происхождения, а также анализ гено-фенотипических корреляций и морфофункциональных особенностей хряща у лиц с варьируемыми аллельными вариантами *VNTR* полиморфизма гена *ACAN*.

Acknowledgement

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-04-01487a, and the Federal Agency for Scientific Organizations, program for supporting bioresource collections.

Experiments were performed with the equipment of the Agidel' Shared Access Center and the unique KODINK research facility.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Земцовский Э.В. Недифференцированные дисплазии соединительной ткани. Попытка нового осмысления концепции. Мед. вестн. Север. Кавказа. 2008;2(10):8-14. [Zemtsovsky E.V. Undifferentiated connective tissue dysplasiae. Attempt of a new interpretation of the concept. Meditsinskiy Vestnik Severnogo Kavkaza = Medical Journal of the North Caucasus. 2008;2(10):8-14. (in Russian)]
Кадурина Т.И., Аббакумова Л.Н. Оценка степени тяжести недифференцированной дисплазии соединительной ткани у детей. Мед. вестн. Север. Кавказа. 2008;2(10):15-20. [Kadurina T.I., Abbakumova L.N. Assessment of the severity of undifferentiated connective tissue dysplasia in children. Meditsinskiy Vestnik Severnogo Kavkaza = Medical Journal of the North Caucasus. 2008;2(10):15-20. (in Russian)]

Кадурина Т.И., Горбунова В.Н. Дифференцированная и недифференцированная дисплазия соединительной ткани. Дисплазия соединительной ткани: руководство для врачей. СПб.: ЭЛБИ, 2009;704. [Kadurina T.I., Gorbunova V.N. Differentiated and undifferentiated connective tissue dysplasia. Connective Tissue Dysplasia: a Guide for Doctors. St. Petersburg: ELBI Publ., 2009;704. (in Russian)]
Насонова В.А., Астапенко М.Г. Клиническая ревматология. Руководство для врачей. М.: Медицина, 1989;592. [Nasonova V.A., Astapenko M.G. Clinical Rheumatology. A Guide for Doctors. Moscow: Meditsyna Publ., 1989;592. (in Russian)]
Нечаева Г.И., Яковлев В.М., Конев В.П., Друк И.В., Морозов С.Л. Дисплазия соединительной ткани: основные клинические синдромы, формулировка диагноза, лечение. Лечащий врач. 2008; 2:22-28. [Nechaeva G.I., Yakovlev V.M., Konev V.P., Druk I.V., Morozov S.L. Connective tissue dysplasia: basic clinical syndromes, diagnosis formulation, treatment. Lechaschiy Vrach = Therapist. 2008;76-80. (in Russian)]
Тябук Т.Д., Каратыш О.М. Недифференцированная дисплазия соединительной ткани. Современная ревматология. 2009;2:19-23. [Tyabut T.D., Karatysh O.M. Undifferentiated connective tissue dysplasia. Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology. 2009;2:19-23. (in Russian)]
Яковлев В.М., Нечаева Г.И. Системные дисплазии соединительной ткани: актуальность проблемы в клинике внутренних болезней. Сиб. мед. журн. 2011;26:9-13. [Yakovlev V.M., Nechaeva G.I. Systemic dysplasia of connective tissue: the clinical significance of the problem for internal diseases. Sibirskiy Meditsinskiy Zhurnal = Siberian Medical Journal. 2011;26:9-13. (in Russian)]
Brandt K.D., Dieppe P., Radin E. Etiopathogenesis of osteoarthritis. Med. Clin. North. Am. 2009;93(1):1-24. DOI 10.1016/j.mcna.2008.08.009.
de Souza T.B., Mentz E.F., Brenol C.V., Xavier R.M., Brenol J.C., Chies J.A., Simon D. Association between the aggrecan gene and rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 2008;35(12):2325-2328. DOI 10.3899/jrheum.071326.
Doege K.J., Coulter S.N., Meek L.M., Maslen K., Wood J.G. A Human-specific Polymorphism in the Coding Region of the Aggrecan Gene variable number of tandem repeats produce a range of core protein sizes in the general population. The Journal of Biological Chemistry. 1997;272(21):13974-13979. PMID:9153261.
Doege K.J., Sasaki M., Kimura T., Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. J. Biol. Chem. 1991;266:894-902. PMID: 1985970.
Gibson B.G., Briggs M.D. The aggrecanopathies; an evolving phenotypic spectrum of human genetic skeletal diseases. Orphanet J. Rare Dis. 2016;11:86. DOI 10.1186/s13023-016-0459-2.
Gu J., Guan F., Guan G., Xu G., Wang X., Zhao W., Ji Y., Yan J. Aggrecan variable number of tandem repeat polymorphism and lumbar disc degeneration: a meta-analysis. Spine (Phila Pa 1976). 2013; 38(25):E1600-E1607. DOI 10.1097/BRS.0000000000000012.
Hardingham T.E. The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. Biochem. J. 1979;177:237-247. PMC1186361.
Horton W.E., Lethbridge-Cejku M., Hochberg M.C., Balakir R., Precht P., Plato C.C., Tobin J.D., Meek L., Doege K. An association between an aggrecan polymorphic allele and bilateral hand osteoarthritis in elderly white men: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA) Osteoarthritis Cart. 1998;6(4):245-251. PMID: 9876393.
Kawaguchi Y., Osada R., Kanamori M., Ishihara H., Ohmori K., Matsui H., Kimura T. Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration. Spine. (Phila Pa 1976). 1999; 24(23):2456-2460.
Kämäräinen O.P., Solovieva S., Vehmas T., Luoma K., Leino-Arjas P., Riihimäki H., Ala-Kokko L., Männikkö M. Aggrecan core protein of

- a certain length is protective against hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartil.* 2006;14(10):1075-1080. DOI 10.1016/j.joca.2006.04.005.
- Kirk K.M., Doege K.J., Hecht J., Bellamy N., Martin N.G. osteoarthritis of the hands, hips and knees in an Australian twin sample – evidence of association with the aggrecan *VNTR* polymorphism. *Twin Res.* 2003;6(1):62-66. PMID: 12626230.
- Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. *Methods Mol. Biol.* 1985;2:31-34. DOI 10.1385/0-89603-064-4:31.
- Miller M.P. RxC: A Program for the Analysis of Contingency Tables via the Metropolis Algorithm Computer. Department of Biological Sciences. Northern Arizona University: Flagstaff, 1997. <http://www.marksgeneticssoftware.net/rxc.htm>.
- Mort J.S., Geng Y., William D., Fisher W.D., Roughley P.J. Aggrecan heterogeneity in articular cartilage from patients with osteoarthritis. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2016;17:89. DOI 10.1186/s12891-016-0944-8.
- Musumeci G., Aiello F.C., Szychlinska M.A., Di Rosa M., Castrogiovanni P., Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(3):6093-6112. DOI 10.3390/ijms16036093.
- Reynard L.N., Loughlin J. The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility. *Expert Rev. Mol. Med.* 2013;15:e2. DOI 10.1017/erm.2013.4.
- Rodriguez E., Roland S.K., Plaas A., Roughley P.J. The glycosaminoglycan attachment regions of human aggrecan. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(27):18444-18450. DOI 10.1074/jbc.M512531200.
- Roughley P., Martens D., Rantakokko J., Alini M., Mwale F., Antoniou J. The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage. *Eur. Cell Mater.* 2006;11:1-7. DOI 10.22203/eCM.v011a01.
- Roughley P.J., Mort J.S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J. Exp. Orthop.* 2014;1:8. DOI 10.1186/s40634-014-0008-7.
- Ryder J.J., Garrison K., Song F., Hooper L., Skinner J., Loke Y., Loughlin J., Higgins J.P., MacGregor A.J. Genetic associations in peripheral joint osteoarthritis and spinal degenerative disease: A systematic review. *Ann. Rheum. Dis.* 2008;67:5584-5591. DOI 10.1136/ard.2007.073874.
- Steinberg J., Zeggini E. Functional genomics in osteoarthritis: Past, present, and future. *J. Orthop. Res.* 2016;7:1105-1110. DOI 10.1002/jor.23296.
- Urban J.P.G., Maroudas A., Bayliss M.T., Dillon J. Swelling pressures of proteoglycans at the concentrations found in cartilaginous tissues. *Biorheology.* 1979;16:447-464. DOI 10.3233/BIR-1979-16609.
- Wang T., Liang Y., Li H., Li H., He Q., Xue Y., Shen C., Zhang C., Xiang J., Ding J., Qiao L., Zheng Q. Single nucleotide polymorphisms and osteoarthritis: an overview and a meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(7):1-13. DOI 10.1097/MD.0000000000002811.
- Xu G., Mei Q., Zhou D., Wu J., Han L. Vitamin D receptor gene and aggrecan gene polymorphisms and the risk of intervertebral disc degeneration – a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(11):e50243. DOI 10.1371/journal.pone.0050243.

ORCID ID

D.A. Shapovalova orcid.org/0000-0002-0921-4684

A.V. Tyurin orcid.org/0000-0002-0841-3024

S.S. Litvinov orcid.org/0000-0002-5999-149X

E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

R.I. Khusainova orcid.org/0000-0002-8643-850X

Поиск изменений нуклеотидной последовательности гена ремоделирования хроматина *PBRM1* у пациентов со светлоклеточным раком почки

Е.А. Климентова¹✉, И.Р. Гилязова^{1, 2}, А.А. Измайлов², И.М. Султанов², М.А. Бермишева¹, В.Н. Павлов², Э.К. Хуснутдинова^{1, 2}

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, Россия

Рак почки (РП) – это гетерогенная группа злокачественных опухолей, подавляющее большинство которых представляет собой почечно-клеточные карциномы различных морфологических типов, наиболее часто встречается светлоклеточный рак почки (СРП). Особое внимание в канцерогенезе СРП уделяется ряду генов-супрессоров опухолевого роста, расположенных на коротком плече третьей хромосомы. Одним из таких генов, инактивируемых при СРП, является ген полибромо 1 (*PBRM1*), кодирующий субъединицу PBAF SWI/SNF комплекса ремоделирования хроматина BAF180. Ген *PBRM1* расположен на коротком плече третьей хромосомы в области 3p21 вблизи гена фон Хиппеля–Линдау (*VHL*), мутации в котором чаще всего происходят при СРП. Целью настоящего исследования был поиск изменений нуклеотидной последовательности гена-супрессора опухолевого роста *PBRM1* у пациентов со светлоклеточным раком почки. В работе исследовано 210 парных образцов ДНК, выделенных из опухолевой ткани почки и прилегающей нормальной почечной паренхимы пациентов с СРП. Анализ изменений нуклеотидной последовательности ДНК проводили методом высокочувствительного анализа кривых плавления (HRM) с последующим секвенированием. В гене *PBRM1* было обнаружено две соматические мутации (с.233G>A (p.D45N) во 2-м экзоне и с.1675-1676delTC в 15-м экзоне), не описанные ранее, и один известный полиморфный вариант *rs17264436* (в 23-м экзоне). Частота выявленных мутаций составила 0.95 % случаев. Оценка функциональной значимости таких изменений показала, что мутации с.233G>A (p.D45N) и с.1675-1676delTC в гене *PBRM1* имеют потенциально патогенный характер. Анализ ассоциации аллелей полиморфного локуса *rs17264436* выявил статистически значимое повышение риска развития заболевания с тяжелым течением у носителей аллеля *rs17264436*А*, что может быть использовано при разработке панелей прогностических маркеров. Возможно, низкая частота мутаций у исследованных образцов связана с тем, что инактивация гена *PBRM1* происходит иными способами, а также может быть обусловлена этноспецифичностью изученной группы пациентов.

Ключевые слова: почечно-клеточная карцинома; ген полибромо 1 (*PBRM1*); мутации; гены-супрессоры опухолевого роста.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Климентова Е.А., Гилязова И.Р., Измайлов А.А., Султанов И.М., Бермишева М.А., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К. Поиск изменений нуклеотидной последовательности гена ремоделирования хроматина *PBRM1* у пациентов со светлоклеточным раком почки. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):873-877. DOI 10.18699/VJ18.428

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Klimentova E.A., Gilyazova I.R., Izmailov A.A., Sultanov I.M., Bermisheva M.A., Pavlov V.N., Khusnutdinova E.K. Identification of alterations in the nucleotide sequence of the chromatin remodeling gene *PBRM1* in clear cell renal cell carcinoma patients. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):873-877. DOI 10.18699/VJ18.428 (in Russian)

Received 30.03.2018

Accepted for publication 02.07.2018

© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: lissa987@yandex.ru

Identification of alterations in the nucleotide sequence of the chromatin remodeling gene *PBRM1* in clear cell renal cell carcinoma patients

E.A. Klimentova¹✉, I.R. Gilyazova^{1, 2}, A.A. Izmailov², I.M. Sultanov², M.A. Bermisheva¹, V.N. Pavlov², E.K. Khusnutdinova^{1, 2}

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

² Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia

Kidney cancer is a heterogeneous group of malignant tumors, the vast majority of which are renal cell carcinomas (RCC) of various morphological types, of which the most common is the clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). Particular attention in the carcinogenesis of the ccRCC is given to a number of tumor suppressor genes located on the short arm of the third chromosome. One of these genes, which are inactivated in the case of ccRCC is the *PBRM1* gene encoding the PBAF SWI/SNF subunit of the chromatin remodeling complex, BAF180. The *PBRM1* gene is located on the short arm of the third chromosome in the 3p21 region near the von Hippel–Lindau gene (*VHL*), the mutation in which is the main event in the occurrence of ccRCC. The aim of our investigation is identification of changes in the nucleotide sequence of the *PBRM1* tumor suppressor gene in patients with ccRCC. 210 pairs of DNA samples isolated from ccRCC tissue were studied. Analysis of changes in the nucleotide sequence of DNA was carried out by HRM analysis and direct sequencing. In the *PBRM1* gene, two somatic mutations were found (с.233G>A (p.D45N) in exon 2, с.1675-1676delTC in exon 15) which were not described previously, and one known polymorphic variant *rs17264436* (in exon 23). The frequency of detected mutations was 0.95 % of cases. Analysis of the allelic association for the polymorphic locus *rs17264436* showed a statistically significant increase in the risk of developing advanced kidney cancer in carriers of allele *rs17264436*А*, which can be used in the development of prognostic marker panels. Perhaps the low frequency of mutations in the samples we studied is due to the fact that the inactivation of the *PBRM1* gene takes place in other ways, and may also be due to the ethno-specificity of the studied group of patients.

Key words: renal cell carcinoma; polybromo gene 1 (*PBRM1*); mutations; tumor suppressor genes.

Рак почки (РП) – это гетерогенная группа злокачественных опухолей, подавляющее большинство которых представляют собой почечно-клеточные карциномы различных морфологических типов, из них наиболее часто встречается светлоклеточный рак почки (СРП). Ежегодно в мире регистрируют более 300 тыс. новых случаев РП (Ricketts, Linehan, 2014), в России эта цифра составляет 18 тыс., в Республике Башкортостан – 400–450 случаев в год. Особое внимание в канцерогенезе СРП уделяется ряду генов-супрессоров опухолевого роста, расположенных на коротком плече третьей хромосомы. Одним из таких генов, инактивируемых при СРП, является ген полибромо 1 (*PBRM1*), кодирующий субъединицу PBAF SWI/SNF комплекса ремоделирования хроматина BAF180. Белок PBRM1 способен изменять структуру хроматина, а также обеспечивать регуляцию транскрипции посредством контроля доступности ДНК и влияния на транскрипционную активность p53 (Macher-Goeppinger et al., 2015). Ген *PBRM1* расположен на коротком плече третьей хромосомы в области 3p21 вблизи гена фон Хиппеля–Линдау (*VHL*), мутации в котором представляют собой основное событие при возникновении СРП (Audenet et al., 2011).

Целью настоящего исследования был поиск изменений нуклеотидной последовательности в гене *PBRM1* у пациентов со светлоклеточным раком почки башкирской, русской и татарской этнической принадлежности.

Материалы и методы

Проанализировано 210 парных образцов ДНК, выделенных из опухолевой ткани почки и прилегающей нормальной почечной паренхимы неродственных больных СРП, проживающих на территории Республики Башкортостан. Все обследованные были пациентами Республиканской клинической больницы им. Г.Г. Куватова и клиники Башкирского государственного медицинского университета г. Уфы. Забор образцов тканей проводился сотрудниками кафедры урологии. Исследование одобрено биоэтическим комитетом Института биохимии и генетики. В изучаемой группе 56.7 % пациентов имели начальные стадии заболевания (I–II стадии злокачественного процесса, согласно TNM классификации) и 43.3 % пациентов – поздние стадии (III–IV). По этнической принадлежности пациенты распределились следующим образом: 14.7 % башкир, 49.5 % русских и 35.8 % татар. Возраст пациентов на момент постановки диагноза варьировал от 27 до 80 лет. Анализ ассоциации аллелей *rs17264436* гена *PBRM1* с риском развития СРП был проведен у 234 пациентов со светлоклеточным раком почки (18.7 % башкир, 44 % русских, 37.3 % татар) и 268 индивидов из контрольной группы (23.3 % башкир, 36.6 % русских, 40.1 % татар). Контрольная группа по возрасту, полу и территории проживания соответствовала группе больных. Все биологические материалы получены с информированного согласия пациентов.

Выделение геномной ДНК из парных образцов опухолевой ткани почки и прилегающей нормальной почечной паренхимы, а также из венозной крови проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Поиск мутаций в гене *PBRM1* осуществляли с помощью высокорезультативного анализа кривых плавления (high-resolution melt, HRM) с

последующим секвенированием. HRM-анализ основан на свойстве ДНК изменять свою конформацию при постепенном возрастании температуры из двуцепочечной молекулы в состояние одноцепочечной. В ходе анализа проводится реакция амплификации ДНК в присутствии интеркалирующих флуоресцентных красителей, активно связывающихся с двуцепочечными молекулами ДНК. Интенсивность флуоресценции дает возможность оценить накопление продукта ПЦР и термически индуцированное расщепление ДНК. Анализ кривых плавления выполняли на приборе Roche LightCycler® 96 с использованием флуоресцентного красителя Eva Green. Определение генотипов *rs17264436* гена *PBRM1* проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим изучением полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ). Реакцию амплификации 23-го экзона гена *PBRM1* проводили с использованием специфичных олигонуклеотидных праймеров: F-TCCCTCCCAAGAATTGAAAAAGT, R-AATTTTCTCTTTCAGGAAAGTGTGC при температуре отжига 61 °C на приборе Biorad T100. ПЦР-продукт объемом 8 мкл обрабатывался эндонуклеазой рестрикции *AclI* (ThermoScientific). Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК было проведено в 7 % полиакриламидном геле. Гель был окрашен в 1 % растворе бромистого этидия и визуализирован в проходящем ультрафиолетовом свете на гель-документирующей системе Vilber-Lourmat (Франция). Частоты генотипов и аллелей полиморфного варианта *rs17264436* у пациентов с раком почки и в контрольной группе сравнивались попарно с помощью точного двустороннего критерия Фишера, при этом достоверными считались различия частот аллелей и генотипов при значении $p < 0.05$.

Результаты

В ходе анализа нуклеотидной последовательности во втором экзоне гена *PBRM1* у пациента с метастатическим раком почки была обнаружена миссенс-мутация с.233G>A, которая приводит к замене аспарагиновой кислоты на аспарагин в 45-м положении белка (p.D45N). Замена отрицательно заряженной аспарагиновой кислоты на полярный аспарагин может влиять на свойства белка и вызывать изменение сайтов сплайсинга.

В 15-м экзоне гена *PBRM1* была обнаружена ранее не описанная соматическая мутация с.1675-1676delTC у пациента с первой стадией опухолевого процесса, приводящая к сдвигу рамки считывания, образованию стоп-кодона (L526Ifs*6) и синтезу неполноценного белка. Мутация с.1675-1676delTC являлась причиной потери консервативных областей белка, таких как ВАН1-домен (956-1074 аминокислоты) и ВАН2-домен (1156-1272 аминокислоты). Кроме того, мутация с.1675-1676delTC обуславливала утрату НМГ-домена, обеспечивающего распознавание транскрипционными факторами последовательностей ДНК-мишеней. Ранее у этого пациента нами была впервые идентифицирована делеция семи нуклеотидов в 3-м экзоне гена фон Хиппеля–Линдау (*VHL*), (с.498_504del), которая также вела к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона (p.V166Vfs*1) (Кутлыева и др., 2012).

Table 1. Prediction of the impact of the *PBRM1* gene mutations on protein structure and function

Prediction method	Mutation			Deleterious Threshold
	c.233G>A (p.D45N) <i>PBRM1</i>	c.1675-1676delTC (p.L526Ifs*6) <i>PBRM1</i>	c.3622T>A (p.P1174P) <i>PBRM1</i>	
SIFT	NA	0.00, D	NA	< 0.05
Polyphen2_HVAR	NA	0.971, D	NA	> 0.5
Polyphen2_HDIV	NA	0.899, D	NA	0.5
LRT	NA	0.843, D	NA	< 0.999
MutationTaster	0.990, D	0.810, D	0.666, D	> 0.5
MutationAssessor	NA	0.476, M	NA	0.65
FATHMM	NA	0.184, T	NA	≥ 0.45
M-CAP	NA	0.630, D	NA	0.025
CADD	25.2	31.4	8.9	> 15

Designations: SIFT: D, deleterious; Polyphen2: D, Probably damaging; LRT: D, deleterious; MutationTaster: D, disease-causing; MutationAssessor: M, medium; FATHMM: D, Damaging; M-CAP: D, deleterious; CADD: deleterious with the degree >15, higher values are more deleterious.

Table 2. Frequency distribution of alleles and genotypes for the polymorphic locus *rs17264436* in the *PBRM1* gene in renal cancer patients and healthy residents of Bashkortostan with regard to the severity of the disease

Genotypes and alleles	Patients				Healthy controls	
	with advanced disease		with localized disease			
	n_i	$p_i \pm s_p, CI\%$	n_i	$p_i \pm s_p, CI\%$	n_i	$p_i \pm s_p, CI\%$
A/A	18	20.22 ± 4.26 (12.45–30.07)	17	14.78 ± 3.31 (8.85–22.61)	36	13.43 ± 2.08 (9.59–18.11)
A/T	50	56.18 ± 5.26 (45.25–66.68)	51	44.35 ± 4.63 (35.09–53.91)	133	49.63 ± 3.05 (43.49–55.77)
T/T	21	23.6 ± 4.5 (15.24–33.78)	47	40.87 ± 4.58 (31.79–50.43)	99	36.94 ± 2.95 (31.15–43.02)
N	89		115		268	
A	86	48.31 ± 3.75 (40.78–55.91)	85	36.96 ± 3.18 (30.71–43.55)	205	38.25 ± 2.1 (34.11–42.51)
T	92	51.69 ± 3.75 (44.09–59.22)	145	92.06 ± 1.7 (88.01–95.08)	331	61.75 ± 2.1 (57.49–65.89)

Следует отметить, что выявленные изменения могут быть нивелированы системой нонсенс-опосредованного распада РНК. Однако результатом действия этой системы будет полная потеря белкового продукта *PBRM1*.

Оценка функциональной значимости обнаруженных изменений была проведена с использованием следующих аналитических программ: SIFT, Polyphen2_HDIV, Polyphen2_HVAR, LRT, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, M-CAP и CADD (табл. 1). В результате анализа было показано, что мутации c.233G>A (p.D45N) и c.1675-1676delTC в гене *PBRM1* имеют потенциально патогенный характер.

При анализе 23-го экзона гена *PBRM1* сдвиг кривой плавления был замечен в образцах ДНК как из опухолевой ткани, так и из нормальной почечной паренхимы. В результате секвенирования указанных участков был обнаружен ранее описанный полиморфный локус *rs17264436*, характеризующийся синонимичной заменой пролина в 1174 позиции белка (p.P1174P). Данный полиморфный вариант ранее был обнаружен при раке мочевого пузыря, кроме того, была продемонстрирована ассоциация его аллелей с риском развития рака молочной железы (He et

al., 2014; Huang et al., 2015). Нами было выдвинуто предположение, что аллели полиморфного локуса *rs17264436* могут быть ассоциированы с риском развития рака почки. В связи с этим был проведен анализ ассоциации генотипов и аллелей *rs17264436* гена *PBRM1* с риском развития СРП у пациентов со светлоклеточным раком почки и индивидов из контрольной группы. При сравнении группы больных с учетом тяжести течения заболевания нами выявлены статистически значимые различия в распределении частот аллелей полиморфного локуса *rs17264436* гена *PBRM1*. Аллель *rs17264436*A* встречался в группе больных с тяжелым течением заболевания в 48.3 % случаев, тогда как в контрольной группе – в 38.2 % случаев (табл. 2). Обнаружено, что аллель *rs17264436*A* может служить маркером риска развития рака почки тяжелого течения ($p = 0.023$; OR = 1.51 (95 % CI = 1.05–2.15)). Кроме того, выявлено, что генотип *rs17264436*T/T* ($p = 0.029$; OR = 0.53; (95 % CI = 0.29–0.94)) гена *PBRM1* является протективным маркером в отношении развития СРП тяжелого течения. Обнаруженная ассоциация аллелей *rs17264436* может быть использована при создании панели прогностических маркеров риска развития СРП.

Обсуждение

Белок VAF180, кодируемый геном *PBRM1*, содержит шесть бромодоменов, два ВАН-домена и домен HMG, близкий к С-концу. Белки, содержащие бромодомены, функционируют как эпигенетические считыватели (модули распознавания белка), которые распознают ацетилированные гистоновые хвосты для облегчения транскрипции генов-мишеней. Существуют сообщения, что мутации в бромодоменах обнаруживаются при различных типах рака (Lloyd, Glass, 2017). Функция доменов ВАН в настоящее время в значительной степени неизвестна. Современные исследования показывают, что домен ВАН обычно имеет тенденцию к взаимодействию с нуклеосомами/гистонами/метилованными гистонами, в том числе вокруг остановленных репликационных вилок и, возможно, способен регулировать ассоциацию других связывающих хроматин белков конкурентно, приводя к изменению локальной структуры хроматина (Niimi et al., 2015).

Потеря функции гена *PBRM1* в результате мутаций изучена при многих онкологических заболеваниях, таких как рак молочной железы, мочевого пузыря, яичников, почки (Xia et al., 2008; Varela et al., 2011; Huang et al., 2015). В работе A.H. Shain и J.R. Pollack (2013) проанализировано 24 опубликованных полноэкзомных исследования генов SWI/SNF комплекса при различных типах рака и показано, что наиболее часто мутации в этом комплексе обнаруживаются при раке яичников и раке почки, причем при раке почки наиболее часто мутационным изменениям подвержены гены *PBRM1* и *ARID1A* (AT-богатый домен взаимодействия), относящиеся к субъединицам SWI/SNF комплекса, которые, как предполагается, обладают функциональной специфичностью. Кроме того, известно, что опухоли почки с мутациями в гене *PBRM1* имеют специфический профиль экспрессии других генов, что может быть использовано для молекулярно-генетической классификации спорадического СРП (Kapur et al., 2013). Было также показано, что мутации в *PBRM1* сопровождают светлоклеточный подтип почечно-клеточных карцином и отсутствуют при саркоматоидном РП, где чаще встречаются нарушения в генах *SETD2* и *BAP1* (Wang et al., 2017). Помимо того, соматические однонуклеотидные замены, а также потеря гетерозиготности в генах *VHL*, *PBRM1* и *SETD2*, предположительно, представляют собой события, способствующие развитию саркоматозных элементов в СРП (Kluzek et al., 2017).

Частым событием при СРП являются делеции в гене *VHL*, локализованном в области 3p, причем потеря больших участков хромосомы может затрагивать находящийся в этой же области ген *PBRM1*. Таким образом, инактивация гена *PBRM1* может способствовать развитию опухоли в случаях, когда потеря гена *VHL* не достаточна для опухолевого генеза. В некоторых исследованиях описана корреляция потери *PBRM1* с худшим результатом лечения (Gao et al., 2017). В исследовании A. Högner с коллегами (2018) выявлена одновременная потеря генов *PBRM1* и *VHL* в опухолях почки в 60.4 % случаях. Была показана корреляция совместной потери этих генов с уровнем градации и стадией опухоли. В исследовании, где в качестве модельных животных использовались мыши, продемонстрировано, что потеря *PBRM1* улучшает приспособ-

ленность клеток с дефектами в гене *VHL*, усиливая их пролиферативную способность и клеточный рост. Кроме того, у мышей пожилого возраста, а также животных с дефектами только в одном из генов, *VHL* либо *PBRM1*, никаких почечных опухолей не наблюдалось. Напротив, у мышей с дефектами в обоих генах в 100 % случаев развились раковые заболевания почек к 20-месячному возрасту (España-Agusti et al., 2017). Отмечено, что уровню мРНК, индуцированных гипоксией либо HIF, выше в опухолях СРП с дефектами в обоих генах, *VHL* и *PBRM1*, по сравнению с опухолями, где мутации присутствуют только в гене *VHL* (Gao et al., 2017).

Согласно литературным данным, частота соматических мутаций в гене *PBRM1* при раке почки достигает 40 % (Sato et al., 2013). В результате поиска изменений нуклеотидной последовательности гена *PBRM1* у пациентов из Республики Башкортостан соматические мутации были выявлены в 0.95 % (2/210) случаев первичных опухолей почки. Возможно, низкая частота мутаций у исследованных нами образцов связана с тем, что инактивация гена *PBRM1* происходит иными способами, а также может быть обусловлена этноспецифичностью исследуемой группы пациентов.

Acknowledgement

This work was supported by the Russian Federation for Basic Research, project 17-44-020050. Experiments were done with the equipment of the Biomika Shared Access Center and the unique KODINK research facility. DNA samples were obtained from the Shared Access Center «Collection of Human Biologic Materials», Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Bashkortostan.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Кутлыева Л.Р., Гилязова И.Р., Хусаинова Р.И., Загидуллин А.А., Халиуллин А.А., Климентова Е.А., Шафигина А.М., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К. Поиск изменений нуклеотидной последовательности в гене фон Хиппеля–Линдау и анализ аллельных делеций в генах-супрессорах опухолевого роста у больных светлоклеточным раком почки из Республики Башкортостан. Мед. генетика. 2012;12:27-35. [Kutlyeva L.R., Gilyazova I.R., Khusainova R.I., Zagidullin A.A., Khaliullin A.A., Klimentova E.A., Shafigina A.M., Pavlov V.N., Khusnutdinova E.K. Genetic screening for von Hippel–Lindau (VHL) gene mutations and analysis of allelic deletions of tumor suppressor genes in renal cell carcinoma patients from Bashkortostan. Meditsinskaya Genetika = Medical Genetics. 2012;12:27-35. (in Russian)]
- Audenet F., Yates D.R., Cancel-Tassin G., Cussenot O., Rouprêt M. Genetic pathways involved in carcinogenesis of clear cell renal cell carcinoma: genomics towards personalized medicine. BJU Int. 2011; 109:1864-1870. DOI 10.1111/j.1464-410X.2011.10661.x.
- España-Agusti J., Warren A., Chew S.K., Adams D.J., Matakidou A. Loss of PBRM1 rescues VHL dependent replication stress to promote renal carcinogenesis. Nat. Commun. 2017;8:2026. DOI 10.1038/s41467-017-02245-1.
- Gao W., Li W., Xiao T., Liu X.S., Kaelin W.G. Inactivation of the PBRM1 tumor suppressor gene amplifies the HIF-response in VHL-/- clear cell renal carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017;114(5):1027-1032. DOI 10.1073/pnas.1619726114.
- He N., Zheng H., Li P., Zhao Y., Zhang W., Song F., Chen K. miR-485-5p binding site SNP rs8752 in HPGD gene is associ-

- ated with breast cancer risk. *PLoS One*. 2014;9(7):e102093. DOI 10.1371/journal.pone.0102093.
- Högner A., Krause H., Jandrig B., Kasim M., Fuller F.T., Schostak M., Erbersdobler A., Patzak A., Kilic E. PBRM1 and VHL expression correlate in human clear cell renal cell carcinoma with differential association with patient's overall survival. *Urol. Oncol*. 2018; 36(3):94.e1-94.e14. DOI 10.1016/j.urolonc.2017.10.027.
- Huang L., Peng Y., Zhong G., Xie W., Dong W., Wang B., Chen X., Gu P., He W., Wu S., Lin T., Huang J. PBRM1 suppresses bladder cancer by cyclin B1 induced cell cycle arrest. *Oncotarget*. 2015; 6(18):16366-16378. DOI 10.18632/oncotarget.3879.
- Kapur P., Peña-Llopis S., Christie A., Zhrebker L., Pavia-Jiménez A., Rathmell W.K., Xie X.J., Brugarolas J. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. *Lancet Oncol*. 2013;14(2):159-167. DOI 10.1016/S1470-2045(12)70584-3.
- Kluzek K., Srebnik M.I., Majer W., Ida A., Milecki T., Huminska K., van der Helm R.M., Silesian A., Wrzesinski T.M., Wojciechowicz J., Beverloo B.H., Kwias Z., Bluysen H.A.R., Wesoly J. Genetic characterization of Polish ccRCC patients: somatic mutation analysis of PBRM1, BAP1 and KDMC5, genomic SNP array analysis in tumor biopsy and preliminary results of chromosome aberrations analysis in plasma cell free DNA. *Oncotarget*. 2017;8(17):28558-28574. DOI 10.18632/oncotarget.15331.
- Lloyd J.T., Glass K.C. Biological function and histone recognition of family IV bromodomain-containing proteins. *J. Cell Physiol*. 2017; 233(3):1877-1886. DOI 10.1002/jcp.26010.
- Macher-Goeppinger S., Keith M., Tagscherer K.E., Singer S., Winkler J., Hofmann T.G., Pahernik S., Duensing S., Hohenfellner M., Kopitz J., Schirmacher P., Roth W. PBRM1 (BAF180) protein is functionally regulated by p53-induced protein degradation in renal cell carcinomas. *J. Pathol*. 2015;237(4):460-471. DOI 10.1002/path.4592.
- Niimi A., Hopkins S.R., Downs J.A., Masutani C. The BAH domain of BAF180 is required for PCNA ubiquitination. *Mutat. Res*. 2015; 779:16-23. DOI 10.1016/j.mrfmmm.2015.06.006.
- Ricketts C.J., Linehan W.M. Intratumoral heterogeneity in kidney cancer. *Nat. Genet*. 2014;46:214-215. DOI 10.1038/ng.2904.
- Sato Y., Yoshizato T., Shiraiishi Y., Maekawa S., Okuno Y., Kamura T., Shimamura T., Sato-Otsubo A., Nagae G., Suzuki H., Nagata Y., Yoshida K., Kon A., Suzuki Y., Chiba K., Tanaka H., Niida A., Fujimoto A., Tsunoda T., Morikawa T., Maeda D., Kume H., Sugano S., Fukayama M., Aburatani H., Sanada M., Miyano S., Homma Y., Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat. Genet*. 2013;45(8):860-867. DOI 10.1038/ng.2699.
- Shain A.H., Pollack J.R. The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers. *PLoS One*. 2013;8(1):e55119. DOI 10.1371/journal.pone.0055119.
- Varela I., Tarpey P., Raine K., Huang D., Ong C.K., Stephens P., Davies H., Jones D., Lin M.L., Teague J., Bignell G., Butler A., Cho J., Dalgliesh G.L., Galappaththige D., Greenman C., Hardy C., Jia M., Latimer C., Lau K.W., Marshall J., McLaren S., Menzies A., Mudie L., Stebbings L., Largaespada D.A., Wessels L.F., Richard S., Kahnoski R.J., Anema J., Tuveson D.A., Perez-Mancera P.A., Mustonen V., Fischer A., Adams D.J., Rust A., Chan-on W., Subimerb C., Dykema K., Furge K., Campbell P.J., Teh B.T., Stratton M.R., Futreal P.A. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature*. 2011; 469(7331):539-542. DOI 10.1038/nature09639.
- Wang Z., Kim T.B., Peng B., Karam J., Creighton C., Joon A., Kawakami F., Trevisan P., Jonasch E., Chow C.W., Canales J.R., Tamboli P., Tannir N., Wood C., Monzon F., Baggerly K., Varela-Garcia M., Czerniak B., Wistuba I., Mills G., Shaw K., Chen K., Sircar K. Sarcomatoid renal cell carcinoma has a distinct molecular pathogenesis, driver mutation profile, and transcriptional landscape. *Clin. Cancer Res*. 2017;23(21):6686-6696. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-17-1057.
- Xia W., Nagase S., Montia A.G., Kalachikov S.M., Keniry M., Su T., Memeo L., Hibshoosh H., Parsons R. BAF180 is a critical regulator of p21 induction and a tumor suppressor mutated in breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(6):1667-1674. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-07-5276.

ORCID ID

E.A. Klimentova orcid.org/0000-0002-7853-8658
I.R. Gilyazova orcid.org/0000-0001-9499-5632
A.A. Izmailov orcid.org/0000-0002-8461-9243
I.M. Sultanov orcid.org/0000-0002-6930-1659
M.A. Bermisheva orcid.org/0000-0002-0584-3969
V.N. Pavlov orcid.org/0000-0003-2125-4897
E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

Генетические механизмы влияния света и фототрансдукции на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*

И.А. Соловьев^{1, 2}, М.В. Шапошников¹, А.А. Москалев^{1, 2, 3, 4, 5} 

¹ Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

² Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина, кафедра экологии, Институт естественных наук, Сыктывкар, Россия

³ Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

⁴ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

⁵ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

Свет видимого спектра (с длинами волн 380–780 нм) – один из фундаментальных абиотических факторов, к которым организмы вынуждены были адаптироваться с момента их возникновения на земле. Многочисленные литературные источники устанавливают связь между длительностью экспозиции при дневном свете, канцерогенезом и продолжительностью жизни, убедительно показывая значительное снижение заболеваемости раком у слепых людей, а также в экспериментах по индуцируемому канцерогенезу и подсчету продолжительности жизни на слепых от рождения и механически ослепленных животных. С другой стороны, отмечен стимулирующий характер воздействия непрерывного освещения на репродуктивную функцию, в частности известны эффекты увеличения плодовитости самок различных видов. Повышение двигательной активности и, как следствие, скорости метаболизма и термогенеза при перманентном освещении также сокращает энергетические резервы организма и продолжительность жизни. Критичны для стареющего организма не только время экспозиции, но также и возраст начала воздействия постоянным освещением, обратные эффекты обнаруживаются при содержании подопытных животных в темноте. За длительный период эволюции систем трансдукции светового сигнала появилось множество механизмов, позволяющих сформировать адекватный ответ организма на освещение, активируя высококонсервативные сигнальные каскады (FOXO, SIRT1, NF-κB, mTOR/S6k, PPARα и др.), ассоциируемые, в том числе, со старением и продолжительностью жизни. В настоящем обзоре исследована связь продолжительности жизни, фоторежима, а также экспрессии генов элементов фототрансдукционного каскада и циркадных часов животных. Рассмотрены в контексте старения классические трансдукторы световых и иных сигналов, такие как семейство рецепторов TRP (transient receptor potential), G-белки, фосфолипаза C и др. Выдвинуты гипотезы о существовании связей между механизмами терморепреции, температурной синхронизации циркадного осциллятора (системы транскрипционно-трансляционных петель обратной связи, автономно поддерживающей колебания экспрессии генов и физиологических показателей) и продолжительностью жизни дрозофилы. На основе анализа опубликованных данных сформулирована гипотеза о возраст-зависимой фоторезистентности *Drosophila melanogaster*. Введено понятие возрастной фоторезистентности, под которой предлагается понимать утрату способности адаптироваться к фоторежиму, связанную с возрастным снижением экспрессии гена *cry*, кодирующего рецептор синего света.

Ключевые слова: фоторецепция; фототрансдукция; циркадные часы; фоторежимы; старение; продолжительность жизни.

Genetic mechanisms of the influence of light and phototransduction on *Drosophila melanogaster* lifespan

I.A. Solovev^{1, 2}, M.V. Shaposhnikov¹,
A.A. Moskaev^{1, 2, 3, 4, 5} 

¹ Institute of Biology of Komi Scientific Center, UrB RAS, Syktyvkar, Russia

² Pitirim Sorokin Syktyvkar State University, Department of Ecology, Institute of Natural Sciences, Syktyvkar, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

⁴ Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

⁵ Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

The light of the visible spectrum (with wavelengths of 380–780 nm) is one of the fundamental abiotic factors to which organisms have been adapting since the start of biological evolution on the Earth. Numerous literature sources establish a connection between the duration of exposure to daylight, carcinogenesis and longevity, convincingly showing a significant reduction in the incidence of cancer in blind people, as well as in animal models. On the other hand, the stimulating nature of the effect of continuous illumination on reproductive function was noted, in particular, the effects of increasing the fecundity of females of various species are known. Increase in motor activity and, as a result, in metabolic rate and thermogenesis during permanent exposure to light also reduces the body's energy reserves and lifespan. In principle, in the context of aging, not only the exposure time, but also the age at the onset of exposure to constant illumination matter, the reverse effects are valid for the maintenance of experimental animals in the constant darkness. Over the long period of the evolution of light signal transduction systems, many mechanisms have emerged that allow to form an adequate response of the organism to illumination, modulating the highly conservative signaling cascades, including those associated with aging and lifespan (FOXO, SIRT1, NF-κB, mTOR/S6k, PPARα, etc). In this review, we consider the relationship between lifespan, photoregimens, and also the expression of the genes encoding the phototransduction cascade and the circadian oscillator elements of animal cells. In the present paper, basic transducers of light and other signals, such as the family of TRP receptors, G proteins, phospholipase C, and others, are considered in the context of aging and longevity. A rela-

relationship between the mechanisms of thermoreception, the temperature synchronization of the circadian oscillator and the life span is established in the review. Analysis of experimental data obtained from the *Drosophila melanogaster* model allowed us to formulate the hypothesis of age-dependent photoresistance – a gradual decrease in the expression of genes associated with phototransduction and circadian oscillators, leading to deterioration in the ability to adapt to the photoregimen and to the increase in the rate of aging.

Key words: photoreception; phototransduction; circadian clocks; photoregimens; aging; lifespan.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Соловьёв И.А., Шапошников М.В., Москалев А.А. Генетические механизмы влияния света и фототрансдукции на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):878-886. DOI 10.18699/VJ18.429

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Solovev I.A., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. Genetic mechanisms of the influence of light and phototransduction on *Drosophila melanogaster* lifespan. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):878-886. DOI 10.18699/VJ18.429 (in Russian)

В результате естественного отбора организмы сформировали ряд генетически детерминированных систем, воспринимающих и передающих световые сигналы.

Продолжительность жизни (ПЖ) наравне с плодовитостью – составная часть приспособленности вида. Ранее на модели *Drosophila melanogaster* было установлено негативное влияние непрерывного освещения и увеличения длины светового дня на ПЖ (Москалев и др., 2006). В эффектах светового режима на ПЖ этого организма выявлена роль генетических механизмов, связанных с транскрипционным фактором FOXO, деацетилазами гистонов сиртуинами и белками теплового шока HSP70 (Москалев, Малышева, 2010), а также механизмами детоксикации свободных радикалов и репарации ДНК (Москалев, Малышева, 2009; Shostal, Moskalev, 2012). В экспериментах с грызунами и в эпидемиологических исследованиях по заболеваемости раком в человеческой популяции показан вклад фоторежима в канцерогенез и процесс старения (Anisimov et al., 2012; Анисимов и др., 2013). С другой стороны, отмечен стимулирующий характер воздействия непрерывного освещения на репродуктивную функцию, в частности увеличение плодовитости самок *D. melanogaster* (Москалев и др., 2006).

Согласно теории отработанной сомы (Kirkwood, 1977), репродуктивная функция и скорость старения находятся в обратной зависимости, что может быть одной из причин снижения ПЖ при увеличении длины светового дня. Повышение двигательной активности и, как следствие, скорости метаболизма и термогенеза плодовой мухи при постоянном освещении сокращает энергетические резервы организма и ПЖ (Москалев, Малышева, 2010). Кроме этого, высокую летальность куколок дрозофилы при непрерывном световом воздействии с длинами волн 378, 440 или 467 нм, относящихся к «синей» области спектра, обуславливает оксидативный стресс, индуцируемый вследствие возбуждения квантами света фотосенсибилизирующих флавоноидных и порфириновых соединений, генерирующих свободные формы кислорода (Hori et al., 2014). С данными этих авторов согласуется результат, полученный в экспериментах на дрозофиле, содержащейся при цикле освещения, в котором освещенность в темновую фазу была 1, 10 и 100 лк. В эксперименте наблюдалось снижение количества откладываемых самками

яиц (McLay et al., 2017). Однако увеличения времени ювенильного развития зарегистрировано не было, отмечалось только сокращение ПЖ имаго (McLay et al., 2017). Показано, что эффект сокращения ПЖ дрозофилы в условиях постоянного освещения зависит от пола и таких факторов, как интенсивность света и концентрация этанола в питательной среде (Shen et al., 2018). Этанол нивелирует повреждающее воздействие постоянного освещения у самцов и на 20 % сокращает жизнь самок, обитающих в тех же условиях. В отсутствие этанола в питательной среде у самцов отрицательный эффект на ПЖ менее выражен, чем у самок (Shen et al., 2018).

Одним из предполагаемых факторов, обуславливающих снижение ПЖ, является нейродегенерация, индуцируемая, в том числе, тусклым непрерывным освещением (Kim et al., 2018). У дрозофилы при индуцируемой эктопической экспрессии белка Тау (*Elav-GAL4>UAS-hTau^{RT}* или *Elav-GAL4>UAS-hTau^{WT}*) при освещенности в 10 лк было отмечено усиление вакуолизации нейронов мозга (Kim et al., 2018). При значительном росте концентрации белка Тау регистрируется нарушение периода, амплитуды и устойчивости циркадных ритмов локомоторной активности, сопровождающееся деконсолидацией сна и сокращением его суммарного времени (Kim et al., 2018).

Продолжительность экспозиции наряду с возрастом начала воздействия постоянным освещением принципиальна в контексте старения организма (Анисимов и др., 2012; Лотош и др., 2013). Установлена связь между проживанием в местностях со световым загрязнением и повышением рисков развития онкологических заболеваний (Kloog et al., 2008–2010; Kamdar et al., 2013). Отметим, что эффекты отсутствия освещения или способности к рецепции световых сигналов противоположны воздействию света, например, слепота продлевает жизнь самцов крыс (Lehrer, 1981), постоянное содержание в темноте грызунов снижает риск развития злокачественных опухолей (Анисимов, 2008; Анисимов et al., 2012; Виноградова, Анисимов, 2012). В то же время первичная слепота у женщин уменьшает вероятность заболевания раком молочной железы, так, риск его развития обратно пропорционален степени утраты способности воспринимать свет. Исследование историй болезни жителей Скандинавского полуострова показало, что слепота значительно снижает риск развития онколо-

гических заболеваний (Анисимов и др., 2013). Непрерывающаяся «функциональная ночь» слепых препятствует уменьшению выработки на свету гормона мелатонина, ответственного за регуляцию различных биологических ритмов, поскольку исключительно световое воздействие на органы зрения способно индуцировать прекращение его синтеза в супрахиазматическом ядре млекопитающих (Анисимов, 2008; Anisimov et al., 2012; Виноградова, Анисимов, 2012). Терапевтический мелатонин является геропротектором и онкосупрессором, таким образом, непрерывное поддержание его уровня в крови способствует профилактике некоторых онкологических заболеваний и замедляет процесс старения (Hardeland, 2017).

В настоящее время активно изучаются системы фоторецепции и молекулярно-генетические пути фототрансдукции, связанные с вышеописанными эффектами.

Системы фоторецепции

Группы фоторецепторных молекул выделяют по нескольким параметрам: функциям, спектральным картам, типам хромофоров, локализации, по присутствию определенных белковых доменов или типам генерируемого на выходе сигнала. Классификация по типу хромофора – одна из наиболее распространенных. В ней выделяют криптохромы, родопсины (Ostrovsky, 2017), ксантопсины, фитохромы, LOV-доменные, BLUF-доменные, цилиатные (стеноторин-ассоциированные) и UVR8 белки (Björn, 2015). Далее речь пойдет только о рецепторах, присущих животным (криптохромам и родопсинам), а также нижележащих каскадах трансдукции сигналов, поскольку наш обзор ставит целью выявление молекулярно-генетических механизмов сопряжения фоторецепции и фототрансдукции с сигнальными путями, участвующими в процессе старения плодовой мухи.

Механизм фототрансдукции

Система фототрансдукции достаточно консервативна среди животных. В настоящей работе фототрансдукционный каскад рассмотрен на примере *D. melanogaster*.

Фоторецепторы мухи очень чувствительны и реагируют на одиночные фотоны в 10–100 раз быстрее, чем палочки позвоночных, но, подобно колбочкам, могут быстро адаптироваться во всем диапазоне освещенности (Randall et al., 2015). Спектр, в котором дрозофила способна воспринимать свет, отличается от человеческого за счет присутствия родопсинов Rh3 и Rh4, улавливающих электромагнитные волны длиной 300–350 нм, при этом верхняя граница у дрозофилы ниже, она составляет не более 600 нм, в то время как у человека достигает 650 нм (Song, Lee, 2018).

У плодовой мушки, как и у других двукрылых, сложные фасеточные глаза, состоящие из примерно 750 суперпозиционных нейтральных омматидиев шестиугольной формы (фасеток). Омматидий – структура, сформированная из 19 клеток: 8 фоторецепторов и 11 вспомогательных клеток. Фоторецепторы делятся на три типа: шесть клеток первого типа R1-R6, окружающих дистальную R7 (второй тип) и проксимальную R8 (третий тип) центральные клетки. Роговичная хитиновая линза венчает омматидий, она расположена над четырьмя коническими и двумя первичными пигментными клетками (Wolff, Ready, 1993). На поверхно-

сти фоторецепторов расположено по четыре конических клетки, которые окружены двумя первичными пигментными клетками, соприкасающимися по средней линии омматидия. Сетка из вторичных и третичных пигментных клеток окружает ядро омматидия, содержащее фоторецепторы, конические клетки и первичные пигментные клетки, образуя структуру, подобную пчелиным сотам. Вторичные пигментные клетки лежат между каждыми двумя омматидиями, третичные пигментные клетки соприкасаются одновременно с тремя близлежащими омматидиями в матрице. В структуре глаза дрозофилы присутствуют также механосенсорные щетинки, не относящиеся онтогенетически к омматидию, но проецирующие его сенсорные аксоны в мозг. Рабдомерами называются вмещающие родопсин апикальные поверхности фоторецепторных клеток, которые образованы плотными стопками микроворсинок (около 60000), формируемых плазматической мембраной клетки-фоторецептора (Wolff, Ready, 1993). Элементы каскада фототрансдукции начинают функционировать именно в пределах этих клеток, приводя к их деполяризации.

Многие элементы молекулярного механизма фототрансдукции можно встретить в типичных фосфатидилинозитольных каскадах (Plachetzki et al., 2010). Традиционно выделяют рецептор, связанный с G-белком (родопсин, кодируемый *ninaE*), фосфолипазу C, кодируемую *norpA*, гетеротримерный G-белок (*Gq*) и два связанных Ca^{2+} -проницаемых катионных канала, кодируемых генами *trp* и *trpl*. Фосфолипаза C (phospholipase C, PLC), TRP, протеинкиназа C и миозин III (*ninaC*) формируют молекулярные комплексы при содействии *inaD* (Plachetzki et al., 2010).

Фосфолипаза C гидролизует фосфатидил-инозитол-4,5-бисфосфат (PIP2). В этой реакции продуктами являются диацилглицерол (ДАГ), инозитол-1,4,5 трифосфат (IP3) и протон, но какой именно продукт активизирует каналы, пока не ясно. Доказательство в пользу ДАГ получено на мутантах *rdgA*, этот ген кодирует ДАГ-киназу (DGK), которая контролирует уровни ДАГ путем его фосфорилирования до фосфатидной кислоты. У *rdgA* мутантов TRP и TRPL постоянно активны, что приводит к тяжелой дегенерации сетчатки. Гипоморфные мутации гена *norpA* (*norpA^{P12}*, *norpA^{P16}* и *norpA^{P57}*) снижают способность сетчатки формировать ответ на освещение. Однако у двойных мутантов *norpA* и *rdgA* не только эффект мутации *rdgA* скомпенсирован, но и фенотип *norpA* менее выражен, т. е. наблюдается реципрокная генетическая компенсация (Hardie, Juusola, 2015). В настоящее время неизвестно, меняется ли продолжительность жизни и/или скорость старения у двойных мутантов *norpA* и *rdgA*.

У *D. melanogaster* каскад интраокулярной фототрансдукции (рис. 1) не является единственным, параллельно с ним функционирует система криптохром-опосредованной синхронизации циркадных часов клетки, которая активна практически во всех тканях (механизм ее функционирования описан в следующем разделе обзора). У человека осцилляторами периферических тканей управляет супрахиазматическое ядро посредством гормона мелатонина, в то время как плодовая муха рецептирует свет всеми клетками, и синхронизация происходит экстраокулярно (Fogle et al., 2015).

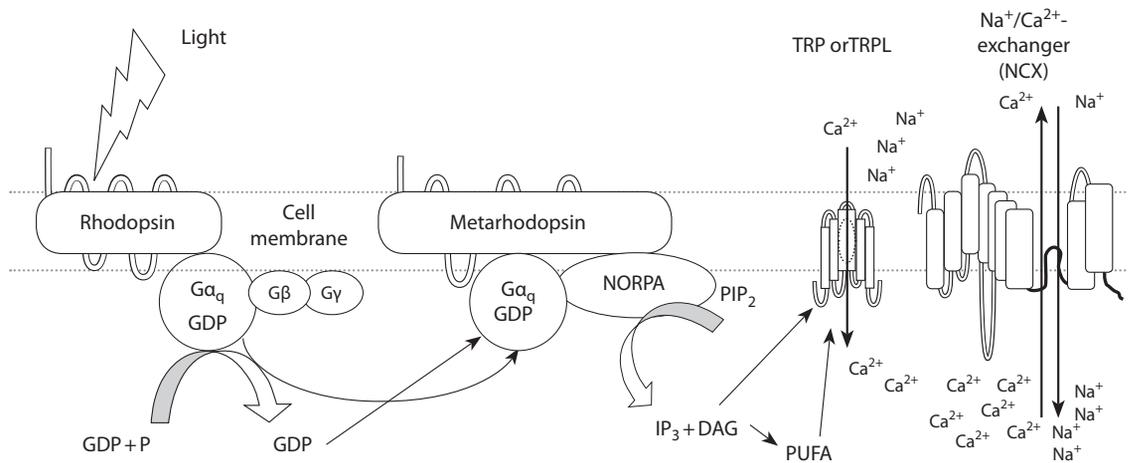


Fig. 1. Light transduction pathway in *Drosophila melanogaster*.

Designations: GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate, DAG, diacylglycerol; P, phosphate; G_q and others, G protein subunits; IP₃, inositol triphosphate; NCX, sodium/calcium exchanger, PIP₂, phosphatidylinositol bisphosphate; PUFA, polyunsaturated fatty acid; TRP, transient receptor potential channel; TRPL, TRP-like channel.

Центральный осциллятор

Циркадные часы клетки, известные также как центральный молекулярный осциллятор, представляют собой транскрипционно-трансляционные автономные петли обратной связи, которые генерируют околосуточные (циркадные) ритмы экспрессии генов и, как следствие, периодические колебания физиологических показателей и поведение организма в целом. Ранние наблюдения определили, что циркадные ритмы – не просто ответ на цикл смены дня и ночи, но и колебания, способные сохраняться в постоянной темноте с периодом, приблизительно соответствующим 24 ч, что указывает на их эндогенную природу.

Генетическая основа циркадных ритмов была убедительно продемонстрирована открытием первого «часового» гена *D. melanogaster*, названного *period* (*per*). Нулевой аллель этого гена вызывал утрату ритмического поведения, тогда как миссенс-аллели обнаруживались у мух с короткими (около 19 ч) или длинными (приблизительно 29 ч) периодами свободных осцилляций (Giebultowicz, 2017).

Последующие исследования на дрозофилах и мышах привели к открытию других генов центрального осциллятора, которые формируют транскрипционно-трансляционные петли положительной либо отрицательной обратной связи, перезапускающиеся через каждые 24 ч как под воздействием внешних стимулов, так и самостоятельно (Dibner, Schibler, 2015). Упрощенная графическая модель транскрипционно-трансляционных петель обратной связи циркадного осциллятора *D. melanogaster* показана на рис. 2.

Гетеродимер CLK/CYC, элементы которого кодируются генами *Clock* (*Clk*) и *cycle* (*cyc* или *dbmall*), формирует положительную петлю обратной связи путем связывания с последовательностями E-box в промоторах генов *period* (*per*) и *timeless* (*tim*) и стимулирует их транскрипцию при наступлении ранней ночи. Белки PER и TIM накапливаются в ядрах клеток поздно ночью и связываются с димером CLK/CYC, инактивируя его, что влечет за собой подавление

транскрипции *per* и *tim* до тех пор, пока репрессивный гетеродимер PER/TIM не деградирует и положительная обратная связь не возобладает над отрицательной, т. е. пока осциллятор не перезапустится. Суточные колебания дополнительно усиливаются через посттрансляционные модификации белков осциллятора, особенно посредством последовательного фосфорилирования (Ito, Tomioka, 2016). В то время как осцилляции сохраняются в условиях постоянной темноты, синхронизация колебаний обычно происходит относительно фоторежима через светочувствительный кодируемый геном *cry* флавопротеин CRY (флавинадениндинуклеотид выступает в нем в качестве хромофора). При активации светом CRY связывается с TIM, приводя к его деградации. Поскольку TIM стабилизирует PER, последний также деградирует при содействии DBT в течение нескольких часов после активации (Ito, Tomioka, 2016).

Существует и альтернативный механизм фототрансдукции, описанный K.J. Fogle с коллегами (2015). Индуцированный светом CRY запускает процесс деполяризации мембраны через высококонсервативный сенсор редокс-статуса, обнаруживаемый в структуре потенциал-зависимого калиевого канала, в частности его β-субъединицы (Kvβ), которая кодируется геном *hyperkinetic* (*hk*). Нейрональный ответ на свет почти полностью отсутствует у мутантов *hk*. Множественные α-субъединицы калиевого канала, кодируемые генами *Shaker* (*Sh*), *Ether-a-go-go* (*eag*) и *Ether-a-go-go-related* (*Elk*), взаимодействуют с Hk, их мутации также влияют на протекание процесса фототрансдукции. Световая индукция CRY, таким образом, приводит к деполяризации мембраны, учащению сигнализации нейронов и изменениям в поведении. Большинство циркадных генов эукариот консервативны, что позволяет сопоставлять результаты экспериментов, выполненных на дрозофиле и млекопитающих. Отличия касаются того, что в гетеродимере-репрессоре млекопитающих TIM не участвует, выступая, скорее, регулятором клеточного цикла. Его место в белковом комплексе занимает CRY1 или

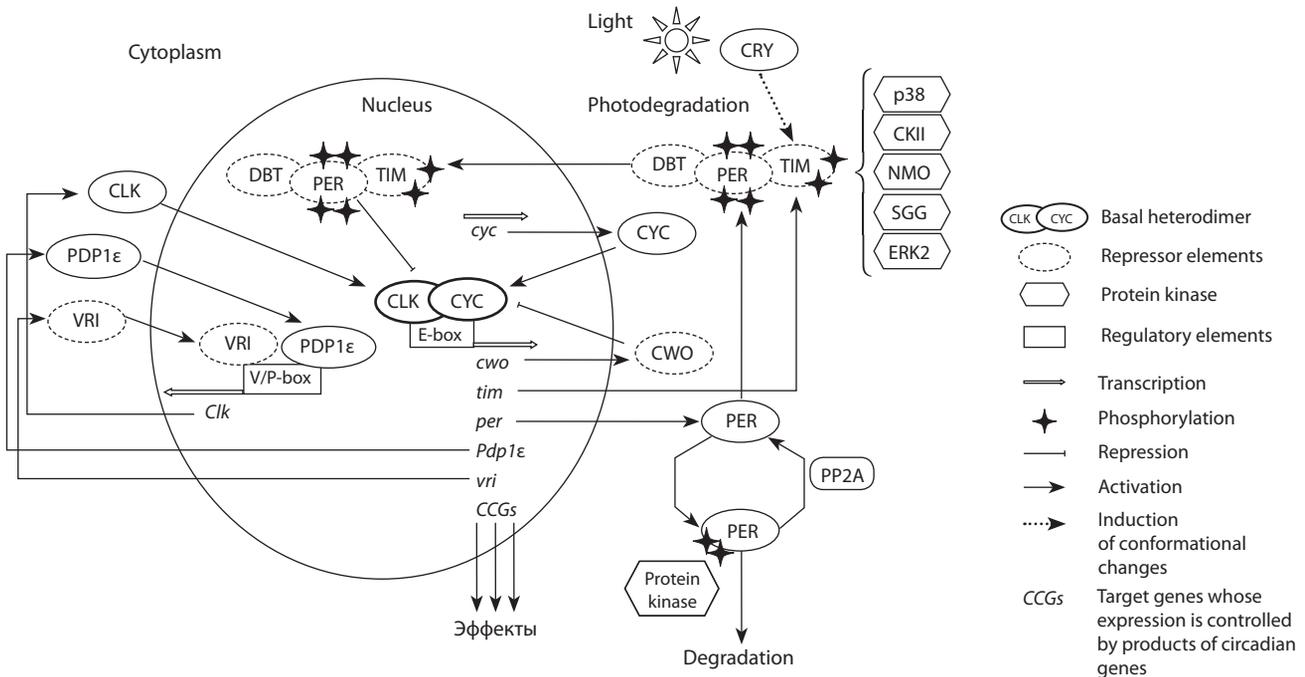


Fig. 2. The circadian oscillator in *Drosophila melanogaster*.

CRY2. Ортологом CYC у млекопитающих служит BMAL1, у них присутствует также дублирующий функцию CLK белок NPAS2 (Fuhr et al., 2015). Еще одно отличие от циркадных часов беспозвоночных – множественность генов центрального осциллятора у млекопитающих. Поскольку присутствует два или более паралога, то ритмичность достигается одновременной индукцией мутацией или инактивацией всех вариантов того или иного гена (Fuhr et al., 2015).

Вклад генов циркадных ритмов в процесс старения

Гены циркадных ритмов вносят существенный вклад в процесс старения, активируя своими продуктами, известными в качестве транскрипционных факторов, множество ассоциируемых со старением сигнальных каскадов, таких как p53/Atm, SIRT1, NF-κB, mTOR/S6k, Ppara и др. (Добровольская и др., 2016; Соловьёв и др., 2016; Moskalev et al., 2017). В табл. 1 приведено описание влияния мутаций в генах циркадных ритмов либо их эктопической экспрессии в нервной системе на медианную продолжительность жизни *D. melanogaster*.

Точкой сопряжения каскадов фототрансдукции, ведущих от зрительных пигментов и от криптохрома, является фосфолипаза C (у дрозофилы *norpA*, у млекопитающих *PLC*), по данным базы STRING (Szklarczyk et al., 2017). У млекопитающих криптохром утратил способность выступать в качестве циркадного фоторецептора, синхронизирующего организм с фоторежимом в обход зрительного пути фототрансдукции. Данные по влиянию мутаций и сверхэкспрессии *norpA* на продолжительность жизни дрозофилы обнаружить не удалось. Однако, по некоторым источникам (Fortini, Bonini, 2000), сверхэкспрессия *norpA* у плодовой мухи использовалась ранее для моделирования нейродегенерации. В то время как добавление комплекс-

ного сфинголипидного препарата (имитирует индукцию фосфолипазы C) в пищу продлевает жизнь дрожжей и дрозофил, индукция экспрессии фосфолипазы C в крысиных фибробластах приводит к их бласттрансформации (Chang et al., 1997). Выше было показано, что фосфолипаза C сопряжена в сигнальном каскаде с G-белком, который, в свою очередь, активируется группой рецепторов GPCR (G-protein coupled receptors), к ним причисляют TRP и TRPL. G-белки участвуют во множестве сигнальных каскадов. На модели *Caenorhabditis elegans* было выяснено, что особи-носители мутаций утраты функции субъединицы G_α (*odr-3* и *gra-1*), G_γ -субъединицы *grc-1* и особи с эктопической экспрессией G_α (*gra-11*) имели большую продолжительность жизни, нежели черви, не подвергавшиеся манипуляциям с генами, кодирующими элементы G-белка. Наиболее вероятным механизмом регуляции продолжительности жизни при участии G-белков у *C. elegans* является FOXO-опосредованный сигнальный путь. В экспериментах H. Lans и G. Jansen (2007) показано, что DAF-16/FOXO мутация, ведущая к утрате функции, полностью нивелирует эффекты всех вариантов мутаций субъединиц G-белка (Sheng et al., 2017).

Рецепторы TRP также участвуют в регуляции продолжительности жизни, при этом примеры этой связи можно найти, скорее, в семействах TRP-подобных белков, ассоциированных с термосенсорной системой, поскольку они изучены более глубоко, нежели подгруппы, участвующие в путях фототрансдукции. Достаточно давно известны механизмы синхронизации центрального осциллятора температурными стимулами, что может указывать на сопряженность механизмов температурной компенсации и детерминирования продолжительности жизни и циркадных ритмов, поскольку в перезапуске циркадного осциллятора участвует именно семейство рецепторов TRP (Poletini et al., 2015). Например, при активации низкими темпера-

Table 1. Effects of mutations in circadian rhythm genes on *D. melanogaster* longevity

Mutant genotype	Phenotype	Reference
<i>per^s</i>	ML reduction in males	Klarsfeld, Rouyer, 1998
<i>cyc⁰¹</i>	»	Hendricks et al., 2003
<i>per⁰¹</i>	»	Krishnan et al., 2009
<i>tim⁰¹ и per⁰¹</i>	»	Katewa et al., 2016
<i>cry⁰¹</i>	ML in males is reduced (–33 to –35 %)	Добровольская и др., 2016
<i>cry⁰²</i>	Insignificant ML increase in males (+3 %)	»
Ectopic expression of circadian rhythm genes in the central nervous system with the <i>Elav-Switch.Gal4 > UAS-“Gene”</i> system		
<i>cry</i>	ML increase in both sexes (to +15 %)	Dobrovol'skaya et al., 2016
<i>Clk</i>	ML reduction in females (–10 %)	Dobrovol'skaya et al., 2016; Solov'ev et al., 2018

Note. ML, median longevity.

Table 2. Comparison of the expression of genes for elements of the light transduction signaling pathway in *Drosophila melanogaster*

Gene	Protein	Mammalian homologs and orthologs	Change of the expression in heads on day 47 with reference to day 3, % (Zou et al., 2000)	Change of the expression in the light receptor on day 40 with reference to day 3, %, (Hall et al., 2017)
<i>norpA</i>	norpA	PLC	–34*	+29
<i>Galphaq</i>	G protein alpha q subunit	Gq	–31*	+29
<i>Gbeta13f</i>	G protein beta-subunit 13F	Gβ	–8*	+11
<i>Ggamma1</i>	G protein gamma-subunit	Gγ	+5	+5
<i>trp</i>	TRP	TRP	–17*	+57
<i>trpl</i>	TRPL	TRPL	–35*	+75
<i>inaC</i>	inaC	PKC	–16*	+10
<i>inaD</i>	inaD	–	–26*	–8
<i>inaF-B</i>	inaF-B	TRP-binding proteins	–21*	+89
<i>ninaC</i>	ninaC	Myosin III	–41*	–
<i>ninaE</i>	ninaE	Rh1	–12*	+84
<i>Rh2</i>	Rh2	Rh2	+6	–7
<i>Rh3</i>	Rh3	Rh3	+3	+35
<i>Rh4</i>	Rh4	Rh4	+60*	+127
<i>Rh5</i>	Rh5	Rh5	+14*	+59
<i>Rh6</i>	Rh6	Rh6	+3	+128
<i>Rh7</i>	Rh7	Rh7	+72	–30

Note. –, no data; *, only genes with different expression patterns in the experiment are shown (significant according to Student's *t* test, *p* < 0.05).

The comparison was performed with NCBI tools GEO Datasets: DataSetRecord GDS582, and Statistica 6.0.

турами TRPA-1 у *C. elegans* инициирует генетическую программу, которая активно способствует долголетию. Эта программа включает в себя такие этапы, как индукция притока ионов Ca²⁺, активацию кальций-чувствительной киназы PKC-2, FOXO-киназы SGK-1 и фактора транскрипции семейства FOXO DAF-16 (Xiao et al., 2015). Недавние исследования на мышах показали, что нокаут по *TRPV1* ведет к продлению жизни (Riera et al., 2014).

Произведя анализ транскриптомных данных из работы S. Zou с коллегами (2000), полученных на линии *w¹¹¹⁸* *D. melanogaster*, мы выяснили, что в головах 47-дневных имаго наблюдается повышение концентрации мРНК ро-

допсинов *Rh2-7* и снижение экспрессии родопсина 1, кодируемого *ninaE* на фоне значительного падения профилей экспрессии нижерасположенных элементов фототрансдукционного каскада. Относительные изменения экспрессии элементов представлены в табл. 2.

Ранее нами были получены данные о снижении экспрессии генов-детерминант циркадных ритмов с возрастом у дрозофилы (в головах самцов гены *cry*, *per* и *Clk*, по (Соловьёв и др., 2016) и *cry*, *per*, *tim*, *cyc* в тотальном гомогенате дрозофилы, по (Добровольская и др., 2016). Важно отметить, что эффекты возраст-зависимого снижения были показаны на тотальном гомогенате мух линии *w¹¹¹⁸*.

Любопытно отметить, что гены клеток самого фоторецептора, находящегося в фасетке, склонны с возрастом обнаруживать статистически не подтвердившуюся тенденцию к повышению профиля экспрессии, в отличие от генов, экспрессирующихся в остальных клетках головы дрозофил. В целом сравнение профилей экспрессии дало достаточно противоречивую картину, нуждающуюся в уточнении и проверке.

Гипотеза возрастной фоторезистентности

Данные, приведенные в ранее опубликованных работах, указывают на снижение с возрастом концентрации мРНК, экспрессируемых генами, кодирующими интра- и экстраокулярные фоторецепторы (Zou et al., 2000; Добровольская и др., 2016), а также элементы сигнального каскада фототрансдукции. Эта тенденция была обнаружена на дрозофиле (см. табл. 2), у которой компенсация недостаточности мРНК рецептора синего света *cry* продлевала жизнь. Проиллюстрировать сущность проблемы можно на примере патогенеза инсулинорезистентного диабета второго типа, при котором по тем или иным причинам снижается численность инсулиновых рецепторов, что вызывает инсулинорезистентность с характерными для нее нарушениями гомеостаза и гомеодинамики. Так, мы предлагаем по аналогии называть фоторезистентностью недостаточность рецептирующих свет и трансдуцирующих световой сигнал молекул в организме. Показано, что мутанты *cry⁰¹ D. melanogaster* проявляют повышенную чувствительность к голоданию (Добровольская и др., 2016). На млекопитающих описан механизм, который гипотетически может объяснить этот эффект. Белки CRY1 и CRY2 в норме подавляют глюконеогенез (модулируя глюкагоновый сигнальный путь и фосфорилирование CREB), а PER2, кроме этого, интенсифицирует накопление гликогена в печени. Таким образом, репрессорные элементы центрального осциллятора противостоят высвобождению глюкозы из депо в печени, что способствует наиболее эффективному расходованию гликогена (Chaudhari et al., 2017). У дрозофил мутация *cry⁰¹*, вероятно, препятствует нормальному ингибированию процесса высвобождения глюкозы из депо во время голодания, что и приводит к наблюдаемому эффекту снижения устойчивости.

На человеческой популяции прямой зависимости между экспрессией генов и фоторезистентностью пока установлено не было, однако сам феномен известен. Его иллюстрирует работа (Daneault et al., 2014), в которой на двух разновозрастных группах людей показана тенденция к утрате с возрастом способности формировать адекватный ответ на свет синего спектра, оказывающий стимулирующий эффект на когнитивные способности молодого организма. У пожилых испытуемых ответ на синий свет в подушке таламуса, амигдале, тегментуме, инсулярной, префронтальной и окципитальной коре был снижен на функциональной магнитно-резонансной томограмме в реальном времени относительно молодой группы, что может быть косвенно признано проявлением фоторезистентности, хотя и отличающейся, вероятно, на молекулярном уровне.

Подобное обсуждаемому явление было зарегистрировано у самцов мыши линии C57BL/6J. У старых животных

показано снижение экспрессии субъединицы NR2B и чувствительности к N-метил-D-аспартату (NMDA – агонист глутаматергических рецепторов), участвующему в передаче светового сигнала и синхронизации активности супрахиазматического ядра с фоторежимом. Вследствие наблюдаемого снижения чувствительности к синхронизирующему воздействию света возникают нарушения циркадных ритмов физиологической активности, цикл которых перезапускается независимо от фоторежима из-за недостаточности рецептирующих и трансдуцирующих молекул, что вызывает дезадаптацию организма (Biello et al., 2018).

Принимая во внимание работы, обнаруживающие снижение риска смерти от различных причин при утрате зрения (Lehrer, 1981) и врожденной слепоте (Анисимов и др., 2013), можно предположить, что усиление фоторезистентности посредством снижения с возрастом экспрессии генов, кодирующих фоторецепторы и фототрансдукторы, является генетически детерминированной адаптацией к повреждающим стимулам фоторежима, возникшей еще на ранних этапах эволюции, когда живые организмы экспонировались не в пример большим дозам оптического и космического излучений, нежели мы можем зарегистрировать в настоящее время. Тесная связь элементов центрального осциллятора клетки и фотолиз, фотореактационные свойства некоторых криптохромов, а также способность элементов осциллятора участвовать в контроле клеточного цикла (Feillet et al., 2015) и репарации ДНК (Bee et al., 2015; Papp et al., 2015) служат подтверждениями нашего предположения о сопряженности механизмов фототрансдукции и контроля продолжительности жизни (Patel et al., 2016).

Acknowledgments

This work was supported by State Projects “Molecular mechanisms of ageing, longevity, and stress tolerance in *Drosophila melanogaster*”, State Registration No. AAAA-A18-118011120004-5; and «The combination of various factors (cold, lack of insolation, restricted diet, and geroprotector treatment) for the maximum prolongation of individual life in the genus *Drosophila*” No. 18-7-4-23, State Registration No. AAAA-A18-118011120008-3.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Анисимов В.Н. Эпифиз, биоритмы и старение организма. Усп. физиол. наук. 2008;39(4):40-65. [Anisimov V.N. Pineal gland, biorhythms, and ageing. Uspehi Fiziologicheskikh Nauk = Advances in Physiological Sciences. 2008;39(4):40-65. (in Russian)]
- Анисимов В.Н., Виноградова И.А., Борисенков М.Ф., Букалев А.В., Забешинский М.А., Панченко А.В., Попович И.Г., Семенченко А.В., Тындык М.Л. Световой режим, старение и рак. Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. Медицина. 2012;(7):29-30. [Anisimov V.N., Vinogradova I.A., Borisenkov M.F., Bukalev A.V., Zabezhinsky M.A., Panchenko A.V., Popovich I.G., Semenchenko A.V., Tyndyk M.L. Light regimen, aging, and cancer. Vestnik Rossiyskogo Universiteta Druzhy Narodov. Seriya Meditsina = Bulletin of People's Friendship University of Russia. Medical Series. 2012;7:29-30. (in Russian)]

- Анисимов В.Н., Виноградова И.А., Букалев А.В., Борисенков М.Ф., Попович И.Г., Забежинский М.А., Панченко А.В., Тындык М.Л., Юрова М.Н. Световой десинхронизм и риск злокачественных новообразований у человека: состояние проблемы. *Вопр. онкологии*. 2013;59(3):302-313. [Anisimov V.N., Vinogradova I.A., Bukalev A.V., Borisenkov M.F., Popovich I.G., Zabezhinsky M.A., Panchenko A.V., Tyndyk M.L., Yurova M.N. Light-induced desynchronization and risk of malignant tumors in laboratory animals: state of the problem. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2013;59(3):302-313. (in Russian)]
- Виноградова И.А., Анисимов В.Н. Световой режим Севера и возрастная патология. Петрозаводск, 2012. [Vinogradova I.A., Anisimov V.N. Light Regime in the North and Age-Related Pathology. Petrozavodsk, 2012. (in Russian)]
- Добровольская Е.В., Соловьёв И.А., Прошкина Е.Н., Москалев А.А. Влияние сверхактивации генов циркадных ритмов в различных тканях на стрессоустойчивость и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*: Теоретическая и прикладная экология. 2016;3:32-40. [Dobrovolskaya E.V., Solovyov I.A., Proshkina E.N., Moskaev A.A. Effects of circadian rhythm gene overactivation in different tissues on stress resistance and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Teoreticheskaya i Prikladnaya Ekologiya = Theoretical and Applied Ecology*. 2016;3:32-40. (in Russian)]
- Лотош Т.А., Виноградова И.А., Букалев А.В., Анисимов В.Н. Модифицирующее влияние постоянного освещения на организм крыс в зависимости от сроков начала воздействия. *Фундаментальные исследования*. 2013;(5-2):308-313. [Lotosh T.A., Vinogradova I.A., Bukalev A.V., Anisimov V.N. Modifying influence of constant insolation on the rat body depending on the timing of the impact. *Fundamentalnye Issledovaniya = Fundamental Research*. 2013;5(2):308-313. (in Russian)]
- Москалев А.А., Малышева О.А. Роль светового режима в регуляции продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*. *Экология*. 2009;40(3):221-226. [Moskaev A.A., Malysheva O.A. Effect of illumination regime on life span in *Drosophila melanogaster*. *Russian Journal of Ecology*. 2009;40(3):206-212.]
- Москалев А.А., Малышева О.А. Роль генов транскрипционного фактора *dFOXO*, *dSIR2* и *HSP70* в изменении продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* при различных режимах освещения. *Экол. генетика*. 2010;8(3):67-80. [Moskaev A.A., Malysheva O.A. The role of genes for transcription factors *dFOXO*, *dSIR2*, and *HSP70* in lifespan alteration of *Drosophila melanogaster* under various light conditions. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2010;8(3):67-80. (in Russian)]
- Москалев А.А., Шосталь О.А., Зайнуллин В.Г. Генетические аспекты влияния различных режимов освещения на продолжительность жизни дрозофилы. *Усп. геронтологии*. 2006;18:55-58. [Moskaev A.A., Shostal O.A., Zainullin V.G. Genetics aspects of the influence of different light regimes on *Drosophila* life span. *Uspekhi Gerontologii = Advances in Gerontology*. 2006;18:55-58. (in Russian)]
- Соловьёв И.А., Добровольская Е.В., Москалев А.А. Генетический контроль циркадных ритмов и старение. *Генетика*. 2016;52(4):393-412. DOI 10.7868/s001667581604010x. [Solovyov I.A., Dobrovolskaya E.V., Moskaev A.A. Genetic control of circadian rhythms and aging. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(4):343-361.]
- Anisimov V.N., Vinogradova I.A., Panchenko A.V., Popovich I.G., Zabezhinski M.A. Light-at-night-induced circadian disruption, cancer and aging. *Curr. Aging Sci*. 2012;5(3):170-177.
- Bee L., Marini S., Pontarin G., Ferraro P., Costa R., Albrecht U., Cellotti L. Nucleotide excision repair efficiency in quiescent human fibroblasts is modulated by circadian clock. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(4):2126-2137. DOI 10.1093/nar/gkv081.
- Biello S., Bonsall R., Atkinson D., Molyneux L., Harrington P.E., Lall G.M. Alterations in glutamatergic signaling contribute to the decline of circadian photoentrainment in aged mice. *Neurobiol. Aging*. 2018;66:75-84. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2018.02.013.
- Björn L.O. *Photobiology: the Science of Light and Life*. New York, 2015.
- Chang J.S., Noh D.Y., Park I.A., Kim M.J., Song H., Ryu S.H., Suh P.G. Overexpression of phospholipase C- γ 1 in rat 3Y1 fibroblast cells leads to malignant transformation. *Cancer Res*. 1997;57(24):5465-5468.
- Chaudhari A., Gupta R., Makwana K., Kondratov R. Circadian clocks, diets and aging. *Nutr. Healthy Aging*. 2017;4(2):101-112. DOI 10.3233/NHA-160006.
- Daneault V., Hebert M., Albouy G., Doyon J., Dumont M., Carrier J., Vandewalle G. Aging reduces the stimulating effect of blue light on cognitive brain functions. *Sleep*. 2014;37(1):85-96. DOI 10.5665/sleep.3314.
- Dibner C., Schibler U. Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *J. Intern. Med*. 2015;277(5):513-527. DOI 10.1111/joim.12347.
- Feillet C., van der Horst G.T., Levi F., Rand D.A., Delaunay F. Coupling between the circadian clock and cell cycle oscillators: implication for healthy cells and malignant growth. *Front. Neurol*. 2015;6:96. DOI 10.3389/fneur.2015.00096.
- Fogle K.J., Baik L.S., Houl J.H., Tran T.T., Roberts L., Dahm N.A., Cao Y., Zhou M., Holmes T.C. CRYPTOCHROME-mediated phototransduction by modulation of the potassium ion channel β -subunit redox sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(7):2245-2250. DOI 10.1073/pnas.1416586112.
- Fortini M.E., Bonini N.M. Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a prayer. *Trends Genet*. 2000;16(4):161-167. DOI 10.1016/S0168-9525(99)01939-3.
- Fuhr L., Abreu M., Pett P., Relogio A. Circadian systems biology: when time matters. *Comput. Struct. Biotechnol. J*. 2015;13:417-426. DOI 10.1016/j.csbj.2015.07.001.
- Giebultowicz J.M. The circadian system and aging of *Drosophila*. *Circadian Rhythms and Their Impact on Aging*. Cham, Switzerland. 2017;129-145. DOI 10.1007/978-3-319-64543-8_6.
- Hall H., Medina P., Cooper D.A., Escobedo S.E., Rounds J., Brennan K.J., Vincent C., Miura P., Doerge R., Weake V.M. Transcriptome profiling of aging *Drosophila* photoreceptors reveals gene expression trends that correlate with visual senescence. *BMC Genomics*. 2017;18(1):894. DOI 10.1186/s12864-017-4304-3.
- Hardeband R. Melatonin as a geroprotector: healthy aging vs. extension of lifespan. Ed. A.M. Vaiserman. *Anti-aging Drugs: From Basic Research to Clinical Practice*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. UK, 2017;474-495. DOI 10.1039/9781782626602-00474.
- Hardie R.C., Juusola M. Phototransduction in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2015;34:37-45. DOI 10.1016/j.conb.2015.01.008.
- Hendricks J.C., Lu S., Kume K., Yin J.C., Yang Z., Sehgal A. Gender dimorphism in the role of cycle (BMAL1) in rest, rest regulation, and longevity in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms*. 2003;18(1):12-25. DOI 10.1177/0748730402239673.
- Hori M., Shibuya K., Sato M., Saito Y. Lethal effects of short-wavelength visible light on insects. *Sci. Rep*. 2014;4:7383. DOI 10.1038/srep07383.
- Ito C., Tomioka K. Heterogeneity of the peripheral circadian systems in *Drosophila melanogaster*: a review. *Front. Physiol*. 2016;7:8. DOI 10.3389/fphys.2016.00008.
- Kamdar B.B., Tergas A.I., Mateen F.J., Bhayani N.H., Oh J. Night-shift work and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat*. 2013;138(1):291-301. DOI 10.1007/s10549-013-2433-1.
- Katewa S.D., Akagi K., Bose N., Rakshit K., Camarella T., Zheng X., Hall D., Davis S., Nelson C.S., Brem R.B., Ramanathan A., Sehgal A., Giebultowicz J.M., Kapahi P. Peripheral circadian clocks mediate dietary restriction-dependent changes in lifespan and fat metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab*. 2016;23(1):143-154. DOI 10.1016/j.cmet.2015.10.014.

- Kim M., Subramanian M., Cho Y.H., Kim G.H., Lee E., Park J.J. Short-term exposure to dim light at night disrupts rhythmic behaviors and causes neurodegeneration in fly models of tauopathy and Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;495(2):1722-1729. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.12.021.
- Kirkwood T.B. Evolution of ageing. *Nature.* 1977;270(5635):301-304. DOI 10.1038/270301a0.
- Klarsfeld A., Rouyer F. Effects of circadian mutations and LD periodicity on the life span of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms.* 1998;13(6):471-478. DOI 10.1177/074873098129000309.
- Kloog I., Haim A., Portnov B.A. Using kernel density function as an urban analysis tool: Investigating the association between nightlight exposure and the incidence of breast cancer in Haifa, Israel. *Comput. Environ. Urban Syst.* 2009;33(1):55-63. DOI 10.1016/j.compenvurbsys.2008.09.006.
- Kloog I., Haim A., Stevens R.G., Barchana M., Portnov B.A. Light at night co-distributes with incident breast but not lung cancer in the female population of Israel. *Chronobiol. Int.* 2008;25(1):65-81. DOI 10.1080/07420520801921572.
- Kloog I., Stevens R.G., Haim A., Portnov B.A. Nighttime light level co-distributes with breast cancer incidence worldwide. *Cancer Causes Control.* 2010;21(12):2059-2068. DOI 10.1007/s10552-010-9624-4.
- Krishnan N., Kretschmar D., Rakshit K., Chow E., Giebultowicz J.M. The circadian clock gene period extends health span in aging *Drosophila melanogaster*. *Ageing (Albany N.Y.)*. 2009;1(11):937-948. DOI 10.18632/aging.100103.
- Lans H., Jansen G. Multiple sensory G proteins in the olfactory, gustatory and nociceptive neurons modulate longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 2007;303(2):474-482. DOI 10.1016/j.ydbio.2006.11.028.
- Lehrer S. Blindness increases life span of male rats: pineal effect on longevity. *J. Chronic. Dis.* 1981;34(8):427-429. DOI 10.1016/0021-9681(81)90041-2.
- McLay L.K., Green M.P., Jones T.M. Chronic exposure to dim artificial light at night decreases fecundity and adult survival in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 2017;100:15-20. DOI 10.1016/j.jinsphys.2017.04.009.
- Moskalev A.A., Proshkina E.N., Belyi A.A., Solovyev I.A. Genetics of aging and longevity. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2017;7(4):369-384. DOI 10.1134/s2079059717040074.
- Ostrovsky M.A. Rhodopsin: Evolution and comparative physiology. *Paleontol. J.* 2017;51(5):562-572. DOI 10.1134/s0031030117050069.
- Papp S.J., Huber A.L., Jordan S.D., Kriebs A., Nguyen M., Moresco J.J., Yates J.R., Lamia K.A. DNA damage shifts circadian clock time via Hausp-dependent Cry1 stabilization. *Elife.* 2015;4. DOI 10.7554/eLife.04883.
- Patel S.A., Chaudhari A., Gupta R., Velingkaar N., Kondratov R.V. Circadian clocks govern calorie restriction-mediated life span extension through BMAL1- and IGF-1-dependent mechanisms. *FASEB J.* 2016;30(4):1634-1642. DOI 10.1096/fj.15-282475.
- Plachetzki D.C., Fong C.R., Oakley T.H. The evolution of phototransduction from an ancestral cyclic nucleotide gated pathway. *Proc. Biol. Sci.* 2010;277(1690):1963-1969. DOI 10.1098/rspb.2009.1797.
- Poletini M.O., Moraes M.N., Ramos B.C., Jeronimo R., Castrucci A.M. TRP channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. *Temperature (Austin).* 2015; 2(4):522-534. DOI 10.1080/23328940.2015.1115803.
- Randall A.S., Liu C.H., Chu B., Zhang Q., Dongre S.A., Juusola M., Franze K., Wakelam M.J., Hardie R.C. Speed and sensitivity of phototransduction in *Drosophila* depend on degree of saturation of membrane phospholipids. *J. Neurosci.* 2015;35(6):2731-2746. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1150-14.2015.
- Riera C.E., Huising M.O., Follett P., Leblanc M., Halloran J., Van An-del R., de Magalhaes Filho C.D., Merkwirth C., Dillin A. TRPV1 pain receptors regulate longevity and metabolism by neuropeptide signaling. *Cell.* 2014;157(5):1023-1036. DOI 10.1016/j.cell.2014.03.051.
- Shen J., Zhu X., Gu Y., Zhang C., Huang J., Xiao Q. Toxic effect of visible light on *Drosophila* life span depending on diet protein content. *J. Gerontol. Ser. A.* 2018. DOI 10.1093/gerona/gly042.
- Sheng Y., Tang L., Kang L., Xiao R. Membrane ion channels and receptors in animal lifespan modulation. *J. Cell. Physiol.* 2017;232(11): 2946-2956. DOI 10.1002/jcp.25824.
- Shostal O.A., Moskalev A.A. The genetic mechanisms of the influence of the light regime on the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Front. Genet.* 2012;3:325. DOI 10.3389/fgene.2012.00325.
- Solovev I., Shaposhnikov M., Kudryavtseva A., Moskalev A. *Drosophila melanogaster* as a model for studying the epigenetic basis of aging. *Epigenetics of Aging and Longevity.* Elsevier: Academic Press, 2018; 293-307. DOI 10.1016/B978-0-12-811060-7.00014-0.
- Song B.M., Lee C.H. Toward a mechanistic understanding of color vision in insects. *Front. Neural Circuits.* 2018;12(16). DOI 10.3389/fncir.2018.00016.
- Szklarczyk D., Morris J.H., Cook H., Kuhn M., Wyder S., Simonovic M., Santos A., Doncheva N.T., Roth A., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D362-D368. DOI 10.1093/nar/gkw937.
- Wolff T., Ready D.F. Pattern formation in the *Drosophila* retina. *The Development of Drosophila melanogaster.* N.Y. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1993;2:1277-1325.
- Xiao R., Liu J., Xu X.Z. Thermosensation and longevity. *J. Comp. Physiol. A-Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 2015;201(9):857-867. DOI 10.1007/s00359-015-1021-8.
- Zou S., Meadows S., Sharp L., Jan L.Y., Jan Y.N. Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(25):13726-13731. DOI 10.1073/pnas.260496697.

ORCID ID

I.A. Solovev orcid.org/0000-0002-1038-2271

M.V. Shaposhnikov orcid.org/0000-0002-4625-6488

A.A. Moskalev orcid.org/0000-0002-3248-1633



Genetic variation of the nuclear sequences of mitochondrial origin associated with retrotransposon *Tv1* insertions in *Drosophila* species of the *virilis* group

B.V. Andrianov , D.A. Romanov, T.V. Gorelova

Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

Mitochondrial DNA sequences integrated into chromosomes are a promising object for designing genetic markers for studies of phylogenesis and genomic instability. Mitochondrial genomes of *D. virilis* and other *Drosophila* species of the *virilis* group contain (AT)_n microsatellites in the spacer region between the *atp6* and *cox3* genes, and this microsatellite sequence is one of the hallmarks of the *virilis* group. The nuclear genome of *D. virilis* contains many extended fragments of mitochondrial DNA, which in total are several times longer than the mitochondrial genome. These nuclear sequences of mitochondrial origin contain all types of mitochondrial sequences, including mitochondrial genes and the aforementioned microsatellite sequence. The presence of the (AT)_n microsatellite allows insertion of retrotransposon *Tv1*, which can transpose into the (AT)_n microsatellite in a site-specific manner. The *Tv1* insertion into (AT)_n, close to the *atp6* or *cox3* pseudogenes produces a unique sequence. This sequence is formed by retrotransposon *Tv1* and pseudogenes *atp6* or *cox3*. This unique sequence can be detected in the genome by a PCR-based method. We applied this method to the detection and analysis of the nucleotide variability of the pseudogenes *atp6* and *cox3* associated with *Tv1* insertions in a *D. virilis* cell culture and in the genomes of four *Drosophila* species of the *virilis* group: *D. virilis*, *D. montana*, *D. borealis*, and *D. laticola*. We discovered new events of mitochondrial sequence transfer to the nucleus in the transplanted cell culture of *D. virilis*, and new *Tv1* insertions, having emerged during the passage of this cell line were detected in the genome of the *D. virilis* transplanted cell culture. We found *atp6* and *cox3* pseudogenes associated with insertions of retrotransposon *Tv1* in the nuclear genomes of four *Drosophila* species from the *virilis* group. These chimeric sequences proved to be species-specific. The age of the *Tv1* insertion into the *atp6* and *cox3* pseudogenes is estimated at 1.50 Ma for *D. virilis*, 1.31 Ma for *D. laticola*, and 1.56 Ma for *D. borealis*. A specific situation was revealed for *D. montana*, in which *Tv1* insertions with nearly identical 5' and 3' long terminal repeats (LTRs) were present in accessions of flies from Europe and Asia. The age of this insertion was about 300 thousand years, and the insertion was absent from the *D. montana* fly line from North America.

Key words: mitochondrial genome; retrotransposons; numts; *Drosophila*; *virilis* group.

Изучение изменчивости ядерных последовательностей митохондриального происхождения, ассоциированных с инсерциями ретротранспозона *Tv1*, у видов дрозофил из группы *virilis*

Б.В. Андрианов , Д.А. Романов, Т.В. Горелова

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

Митохондриальные последовательности, интегрированные в ДНК хромосом, – перспективный объект для разработки генетических маркеров филогенеза и геномной нестабильности. Митохондриальный геном *D. virilis* и других видов дрозофил из группы *virilis* содержит микросателлитные последовательности (AT)_n в спейсерной области между генами *atp6* и *cox3*, что является отличительным признаком группы *virilis*. Ядерный геном *D. virilis* содержит большое количество протяженных фрагментов митохондриальной ДНК, которые в сумме в несколько раз длиннее митохондриального генома. Эти ядерные последовательности митохондриального происхождения содержат все типы митохондриальных последовательностей, в том числе митохондриальные гены и микросателлитные последовательности (AT)_n в спейсерной области между генами *atp6* и *cox3*. Наличие микросателлита (AT)_n обеспечивает возможность инсерции ретротранспозона *Tv1*, имеющего свойство встраиваться сайт-специфично в последовательности микросателлита (AT)_n. В результате инсерции транспозона в микросателлит образуется уникальная последовательность, образованная ядерной копией гена *atp6* или *cox3* и ретротранспозоном *Tv1*, которая может быть выделена из генома методом ПЦР. Используя этот подход, мы выявили и проанализировали нуклеотидную изменчивость псевдогенов *atp6* и *cox3*, ассоциированных с инсерциями *Tv1*, в клеточной культуре *D. virilis* и у четырех видов дрозофил из группы *virilis*: *D. virilis*, *D. montana*, *D. borealis* и *D. laticola*. Выявлены новые события переноса митохондриальных последовательностей в ядро клетки в пересеваемой культуре *D. virilis* и новые события инсерций ретротранспозона *Tv1* в геноме клеток пересеваемой культуры, возникших в ходе пассирования данной клеточной линии. Показана видоспецифичность фрагментов митохондриальных псевдогенов *atp6* и *cox3*, ассоциированных с инсерциями ретротранспозона *Tv1*, в ядерном геноме видов дрозофил из группы *virilis*, позволяющая идентифицировать виды группы. Возраст инсерций *Tv1* в последовательности митохондриального происхождения у *D. virilis* равен 1.50 млн лет, *D. laticola* –

1.31 млн лет, *D. borealis* – 1.56 млн лет. Особая ситуация найдена для *D. montana*. У этого вида выявлена инсерция с практически идентичными 5' и 3' длинными концевыми повторами в линиях мух европейского и азиатского происхождения. Возраст инсерции около 300 тыс. лет, и она отсутствует у линии *D. montana* из Северной Америки.

Ключевые слова: митохондриальный геном; ретротранспозоны; numts; *Drosophila*; группа *virilis*.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Andrianov B.V., Romanov D.A., Gorelova T.V. Genetic variation of the nuclear sequences of mitochondrial origin associated with retrotransposon *Tv1* insertions in *Drosophila* species of the *virilis* group. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):887-894. DOI 10.18699/VJ18.430

The transfer of mitochondrial DNA into the nucleus of the cell has been found in all eukaryotic species studied so far (Bensasson et al., 2001; Richly, Leister, 2004; Hazkani-Covo et al., 2010). Fragments of mitochondrial DNA in chromosomes were called numts (abbreviation of *nuclear sequences of mitochondrial origin*) (Lopez et al., 1994). In the literature, this term is variously capitalized and italicized. We interpret *numt* as a genetic term and write it in lowercase Roman letters. The numbers and lengths of numts vary among species, depending on the ratios of their acquisition and loss.

The main source of data on the origin and variability of numts is the comparative analysis of complete genomes. The numbers of numts in the genomes of different fruit fly species vary by an order of magnitude (Rogers, Griffiths-Jones, 2012). Such a significant variation is likely to be determined by different rates of numt acquisition and loss. In *Drosophila*, the frequency of fixation of a new numt type in the genome is 0.75 copies per million years (Rogers, Griffiths-Jones, 2012). It is natural to assume that the speed of occurrence of new copies of numts is highly variable in different species.

The number of numts detected in a complete genome depends on search parameters. Therefore, data reported by different authors are controversial. In the genome of *Drosophila melanogaster* Meigen (1830), the number of detectable numts varies from 3 to 6 (Bensasson et al., 2001; Richly, Leister, 2004; Pamilo et al., 2007; Rogers, Griffiths-Jones, 2012; Hazkani-Covo, Martin, 2017), and this is the least number of numts among the studied genomes of *Drosophila*. As reviewed in (Rogers, Griffiths-Jones, 2012), the numbers of numts found in other *Drosophila* species are 5 in *D. simulans* Sturtevant (1919), 9 in each of *D. yakuba* Burla (1954) and *D. grimshawi* Oldenberg (1914), 20 in *D. erecta* Tsacas, Lachaise (1974), 24 in *D. mojavensis* Patterson (1940), 25 in *D. sechellia* Tsacas, Bachli (1981), 26 in *D. ananassae* Doleschall (1858), 54 in *D. persimilis* Dobzhansky, Epling (1944), 59 in *D. virilis* Sturtevant (1916), and 67 in *D. willistoni* Sturtevant (1916). *D. virilis* belongs to the group of *Drosophila* species with the highest number of numts in the genome. In the nuclear genome of this species, all sequences of the mitochondrial chromosome are represented.

Since insertions of fragments of mitochondrial DNA into chromosomal DNA cause mutations, a significant increase in the number of numts in the genome can be a marker of genomic instability. The frequency of mitochondrial DNA fragment insertion into chromosomal DNA varies in the course of evolution (Hazkani-Covo, Martin, 2017). It has been suggested that in most cases the appearance of new numts in the genome is related to the speciation process (Gunbin et al., 2017). In this connection, it is of interest to study the as-

sociation of numts with retrotransposons, since the induction of transpositions of retrotransposons and numts can cause genomic instability. Numts are usually integrated into (AT)_n microsatellite sites and are often flanked by retrotransposons, or *Alu* repeats in humans (Tsuji et al., 2012). In *Drosophila*, 45 % of numts are located close to retrotransposons of LINE type and LTR-containing type (Rogers, Griffiths-Jones, 2012).

The search for numts associated with retrotransposons in the complete genome of *D. virilis* revealed an insertion of retrotransposon *Tv1* into the spacer region between the *atp6* and *cox3* numts. Retrotransposon *Tv1* was found in the *D. virilis* genome and in the genomes of all species of *Drosophila* forming the *virilis* group (Andrianov et al., 1999). Retrotransposon *Tv1* is integrated in a site-specific manner into the microsatellite (AT)_n sequence to form a direct duplication (AT)₄ at the site of insertion (Andrianov et al., 2010). The presence of the (AT)_n microsatellite favors *Tv1* integration into this site. As a result of *Tv1* insertion into the numt, a unique sequence arises, which can be detected from the genome by a PCR-based method. Using this approach, we analyzed the variability of numts associated with *Tv1* insertions in *D. virilis* fly lines, in *D. virilis* cell culture, and in the genomes of four species of *Drosophila* of the *virilis* group: *D. virilis*, *D. montana* Stone, Griffen, Patterson (1941), *D. lacicola* Patterson (1944) and *D. borealis* Patterson (1952). All numts associated with the retrotransposon *Tv1* in fly lines are located on the Y chromosome. Our data reveal new events of mitochondrial DNA transfer into chromosomes and new events of *Tv1* retrotransposition in *D. virilis* cell culture. This finding brought us to the conclusion that the emergence of new numt–*Tv1* associations were specific markers characterizing genomic instability in *D. virilis* cell culture.

Materials and methods

Fly and cell lines. *Drosophila* lines of species of the *virilis* group used in the work were obtained from the Genetic Collection of Insect Lines and Insect Cell Cultures of the Vavilov Institute of General Genetics of RAS (<http://vigg.ru/index.php?id=337>), the Collection of *Drosophila* Genetic Lines of the Koltzov Institute of Developmental Biology of the RAS (<http://idbras.comcor.ru/collection/Drosophila.pdf>), and the collection of the Tucson *Drosophila* Species Stock Center (<http://stockcenter.arl.arizona.edu>). All *Drosophila* lines were isofemale except for the old laboratory line L160. The characteristics of the fly lines studied are shown in Supplement 1¹. The permanent *D. virilis* cell line 79f7Dv3g was obtained in 1979 (Braude-Zolotarjova et al., 1986). All *Drosophila* lines

¹ Supplementary Materials 1–4 are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx14.pdf>

PCR primers

Primer designation	Sequence 5'–3'	The genomic nucleotide sequence taken for primer design	Primer specificity	Species tested with the primer
Dvir0.1F	GTCAATGTTTCAGAAATCTGTGG	<i>D. littoralis</i> 06-17a FJ447340.1	<i>cox2</i>	<i>D. borealis</i> , <i>D. kanekoi</i> , <i>D. laticola</i> , <i>D. montana</i>
Dvir4.1F	AAGGAACCCCAGCAATTCTT	<i>D. virilis</i> 1051.87 BK006340.1	<i>atp6</i>	<i>D. virilis</i> , <i>D. virilis</i> cell line
Dvir5.1R	TCGTAAACCAATAGTTACAGGGTAAG	<i>D. virilis</i> 1051.87 BK006340.1	<i>cox3</i>	<i>D. borealis</i> , <i>D. laticola</i> , <i>D. lummei</i> , <i>D. montana</i>
Dvir5.2R	AGCAGGTGGTCATGATGCTC	<i>D. virilis</i> 1051.87 BK006340.1	<i>cox3</i>	<i>D. borealis</i> , <i>D. laticola</i> , <i>D. montana</i>
Dvir5.3R	TCAATATCATGCTGCTGCTTC	<i>D. virilis</i> 1051.87 BK006340.1	<i>cox3</i>	<i>D. borealis</i> , <i>D. kanekoi</i> , <i>D. laticola</i> , <i>D. lummei</i> , <i>D. montana</i>
Dvir5.4R	TTGTGAATGGTTTCCTTCCA	<i>D. virilis</i> 1051.87 BK006340.1	<i>cox3</i>	<i>D. virilis</i> cell line
Dvir6.1F	GTAATTCGACCAGGAACCTTAGC	<i>D. virilis</i> 1051.87 BK006340.1	<i>atp6</i>	<i>D. borealis</i> , <i>D. kanekoi</i> , <i>D. laticola</i> , <i>D. lummei</i> , <i>D. montana</i>
Dvir6.2F	CTCTTTTAGGACCCTCAGGTCA	<i>D. virilis</i> 1051.87 BK006340.1	<i>atp6</i>	<i>D. borealis</i> , <i>D. laticola</i> , <i>D. lummei</i> , <i>D. montana</i> , <i>D. virilis</i>
Dvir6.3F	TTCTGTATTTCGACCCATCAGC	<i>D. virilis</i> 1051.87 BK006340.1	<i>atp6</i>	<i>D. virilis</i>
Dvir6.4R	TTCCTTGAGGAACATAATGAGC	<i>D. borealis</i> 0961.00 KF669860.1	<i>atp6</i>	<i>D. borealis</i> , <i>D. kanekoi</i> , <i>D. laticola</i> , <i>D. montana</i>
Dvir7.1R	TTCCCGAATATGAACTGATTTATCT	<i>D. virilis Tv1</i> complete sequence AF056940.1	LTR <i>Tv1</i>	<i>D. virilis</i>
Dvir7.2R	CAATTCCTTTATTTTCACTAACGGCTAC	<i>D. virilis Tv1</i> complete sequence AF056940.1	LTR <i>Tv1</i>	<i>D. borealis</i> , <i>D. laticola</i> , <i>D. montana</i>
Dvir8.1F	GCACCCACCCTTTTCACAT	<i>D. virilis Tv1</i> complete sequence AF056940.1	LTR <i>Tv1</i>	<i>D. borealis</i> , <i>D. laticola</i> , <i>D. montana</i>
Dvir8.2F	CAAAGCATTTACGTAAGCAATGA	<i>D. virilis Tv1</i> complete sequence AF056940.1	UTR <i>Tv1</i>	<i>D. virilis</i> cell line

and the cell culture used in this study are available upon request to the corresponding collections or to the authors of the article.

DNA isolation, PCR and sequencing of PCR fragments. Genomic DNA was isolated from *Drosophila* imagoes and cultured cells by the conventional phenol-chloroform extraction method (Sambrook et al., 1989). PCR amplification was performed on a template of total DNA isolated from an individual *Drosophila* imago or from 10^6 cells of permanent cell culture.

The primers used to amplify the *atp6* and *cox3* numts associated with the insertion of retrotransposon *Tv1* and fragments of the mitochondrial genes *atp6* and *cox3* of *Drosophila* species of the *virilis* group are listed in the Table. PCR was performed on an Applied Biosystems (PCR System 2700) thermocycler with a universal Encyclo Plus PCR kit (Evrogen, Moscow) as recommended by the manufacturer, the reaction volume being 25 μ L.

PCR schedule: (1) predenaturation at 95 °C for 5 min; (2) 5 cycles: denaturation at 95 °C for 40 s, annealing at 50 °C for 40 s, and elongation at 72 °C for 60 s; (3) 30 cycles: denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 59 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 60 s; (4) postextension at 72 °C for 7 min.

All conceivable structures of “chimeric” sequences resulting from the insertion of retrotransposon *Tv1* into the microsatellite (AT)_n sequence between the *atp6* and *cox3* genes in the forward and reverse orientations relative to the orientation of the mitochondrial genes are presented in Figure 1. There may be four types of sequences, and they correspond to four types of experimental design to obtain a “chimeric” PCR fragments

Experiment a1. The following pairs of primers were used to amplify the *atp6* numts associated with the insertion of retrotransposon *Tv1* in the forward orientation: (1) Dvir6.1F and Dvir7.2R, (2) Dvir6.2F and Dvir7.2R, (3) Dvir6.3F and Dvir7.2R. In case of *D. virilis*, primers Dvir6.1F and Dvir7.2R were replaced by Dvir4.1F and Dvir7.1R.

Experiment c1. Primers for *cox3* numts associated with the insertion of *Tv1* in the forward orientation: (1) Dvir8.1F and Dvir5.1R, (2) Dvir8.1F and Dvir5.2R, (3) Dvir8.1F and Dvir5.3R.

Experiment a2. Primers for *atp6* numts associated with the insertion of *Tv1* in the reverse orientation: (1) Dvir6.1F and Dvir8.1F, (2) Dvir6.2F and Dvir8.1F, (3) Dvir6.3F and Dvir8.1F.

Experiment c2. Primers for *cox3* numts associated with the insertion of *Tv1* in the reverse orientation: (1) Dvir7.2R

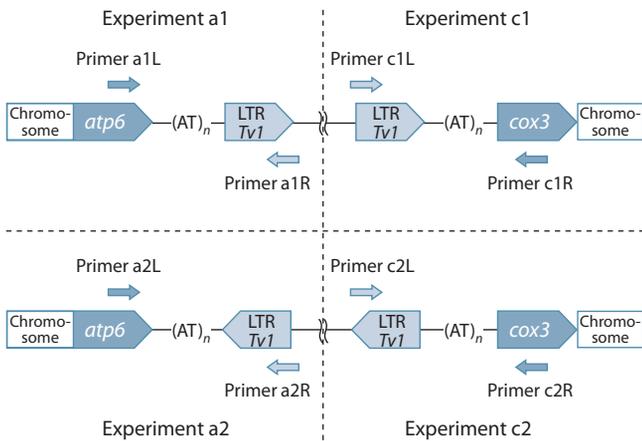


Fig. 1. Four types of experiments (a1, a2, c1, and c2) for identification of *atp6* and *cox3* numts associated with the insertion of *Tv1*.

and Dvir5.1R, (2) Dvir7.2R and Dvir5.2R, (3) Dvir7.2R and Dvir5.3R.

PCR of mitochondrial genes. Primers for fragments of mitochondrial genes *atp6* and *cox3* of *Drosophila* of the *virilis* group (1) Dvir0.1F and Dvir6.4R for *D. borealis*, *D. kanekoi*, *D. lacicola*, and *D. montana*; (2) Dvir6.2F and Dvir5.1R or Dvir6.1F and Dvir5.3R for other *Drosophila* species of the *virilis* group.

The results of electrophoretic fractionation of PCR fragments formed by *atp6* and *cox3* numts associated with the insertion of retrotransposon *Tv1* are presented in Supplement 2. The sizes of the PCR fragments can be indicated only approximately, because *atp6* and *cox3* numts reveal indels in interspecific and, sometimes, intraspecific comparison, and the lengths of the spacer sequence between *atp6* and *cox3* differ among species.

Cloning. PCR products were run in agarose gel, eluted, and purified with an elution kit (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research, USA) according to manufacturer's recommendations. All PCR products were cloned prior to sequencing. PCR product cloning was performed using the pGEM®-T Easy Vector System according to standard protocols (Fermentas InsTAclone™ PCR Cloning Kit). The resulting clones were sequenced. At least three independent clones were sequenced for each PCR fragment. Sequencing of the amplification products was conducted with both primers on an ABI PRISM 3500 instrument using a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, United States), according to manufacturer's recommendations.

Phylogenetic analysis. Alignment of the resulting sequences and phylogenetic analysis were carried out in the MEGA6.06 program (Tamura et al., 2013). For construction of dendrograms, we used the NJ method and the Kimura evolutionary model. The bootstrap support of 1000 replicas was used. Indels were removed from the compared sequences prior to the construction of dendrograms.

Results and discussion

To provide a basis for further work, we characterized *atp6* and *cox3* numts and associated insertions of retrotransposon *Tv1* in the genome of *D. virilis* (Fig. 2).

Experimental search for chimeric sequences of *atp6* numt – *Tv1* in fly lines of *D. virilis* of different geographical origins revealed the expected nucleotide sequence corresponding to the D-01 map (see Fig. 2) in all fly lines examined. We compared five *D. virilis* lines of different geographic origins (see Supplement 1). They all contain the same numt. The nucleotide divergence of this *atp6* numt from the *atp6* mitochondrial gene of *D. virilis* is 0.09. The amino acid sequence contained 21 substitutions. This numt has no internal termination codons. Insertions of *Tv1* are also the same in different fly lines, except for the insertion of *Tv1* in line L160. The *Tv1* associated with the *atp6* numt in this line has several point nucleotide substitutions and two small deficiencies in the LTR sequence. The lengths of numts in the genome of *D. virilis* flies and in the permanent cell line are constant, being the same as in the corresponding mitochondrial sequence. The genetic maps of all experimentally obtained numts of *D. virilis* associated with the insertion of *Tv1* are presented in Supplement 3. Differences in the length of PCR fragments, observed only on the DNA template of the cell culture, are determined by differences in the length of LTRs of retrotransposon *Tv1*. These differences in length are due to the presence or absence of 40-bp long duplications. Only one type of association of *atp6* numts with *Tv1* in direct orientation was found in fly genomes, and there were no associations of *cox3* numts with *Tv1*, whereas in the cell culture all the four possible types of associations were identified (see Supplements 2 and 3). Consequently, they emerged in the cell culture in the process of cultivation after the obtaining of this culture in 1979 (Braude-Zolotarjova et al., 1986). Unfortunately, the *D. virilis* cell line was established from a fly line that has been lost, and presently they cannot be compared. However, with regard to the fact that *D. virilis* is a nearly monomorphic species (Mirol et al., 2008), we can use extant fly lines for comparisons with the *D. virilis* cell line.

This raises the question of the origin of these numts and the origin of *Tv1* insertions. Theoretically, there are two possible sources of new numt insertions in the genome: mitochondrial DNA and previously arisen numts (Hazkani-Covo et al., 2003). To make it clear, we conducted a phylogenetic analysis of the variability of the obtained numts and the corresponding sequences of mitochondrial genes. The result of the comparison of mitochondrial genes with numts is shown in Figure 3.

We detected almost complete identity between the newly emerged numts in the cell culture and the sequence of the mitochondrial gene of *D. virilis*, and significant differences from the numts of *D. virilis* flies. Consequently, the numts that arise in the cell culture descend from mitochondrial DNA rather than from preexisting numts. The genome-derived numt associated with the insertion of *Tv1* belongs to the most divergent and probably the oldest insertions of numts in the *D. virilis* genome. Comparison of the variability of numts and associated copies of *Tv1* provides an answer to the question of the differences in age of these insertions. In doing it, we analyzed the *Tv1* LTR nucleotide variability from *Tv1* insertions in the numts. The result of the phylogenetic analysis of *Tv1* LTR variability is presented in Figure 4. *In silico* search revealed 12 types of *Tv1* LTRs in the *D. virilis* genome. We also found two currently active types of *Tv1* in the cell culture (Fig. 4). These types differ from the *Tv1* copy associated with the numt in the genome. Hence, both numts of *D. virilis* and

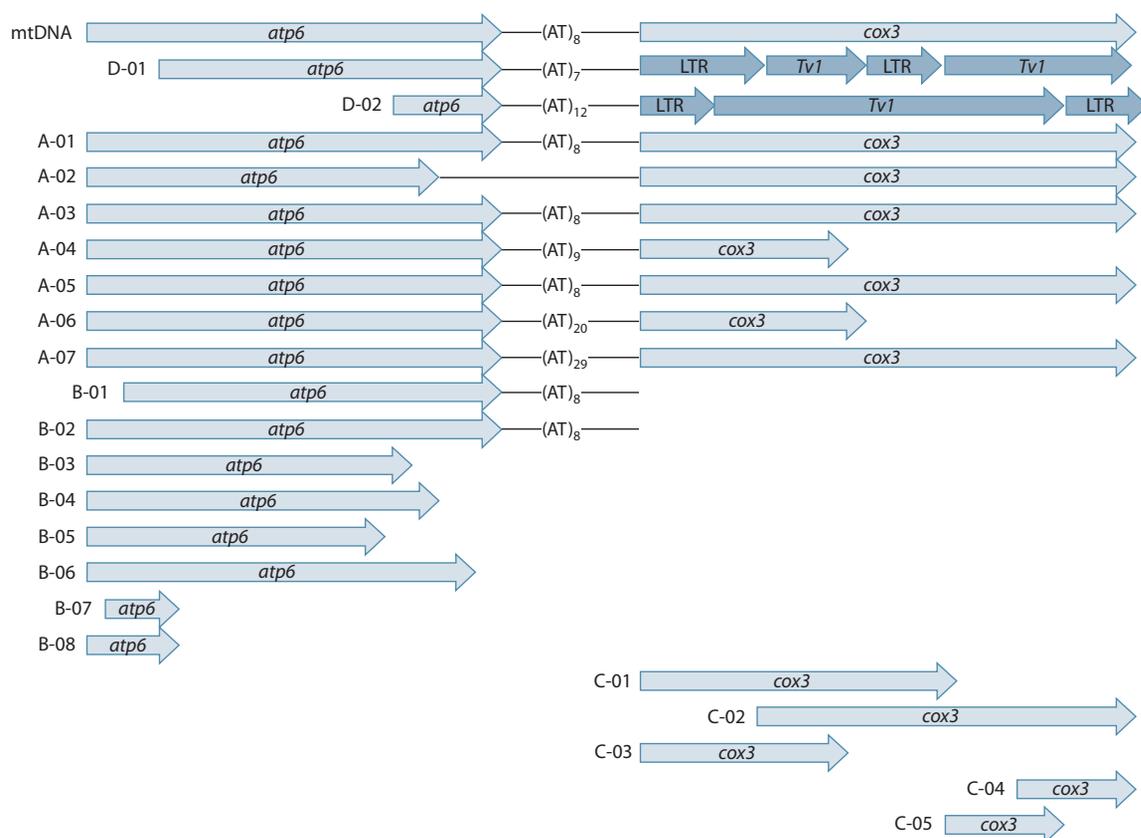


Fig. 2. Schematic representation of all *atp6* and *cox3* numts from the complete genome of *Drosophila virilis* line TSC # 15010-1051.87 (GenBank accession number: AANI00000000.1).

Each numt is assigned a unique name to the left of the map. Numts *atp6* D-01 and D-02 are associated with insertions of retrotransposon *Tv1* in the direct orientation.

the associated *Tv1* LTRs in the cell culture are among the youngest sequences in their groups, and they arose during the cell culturing. The ages of the numt and *Tv1* insertions in the cell culture match.

To find out whether *Tv1* insertions always occur in newly formed numts, we searched some *Drosophila* species of the *virilis* group for associations of numts with *Tv1* according to the experimental design shown in Figure 1. Numts marked with *Tv1* insertions were identified in *D. virilis*, *D. borealis*, *D. lacicola*, and *D. montana*. Genetic maps of the PCR fragments are presented in Supplement 4. Insertions of *Tv1* in the direct orientation with respect to *atp6* and *cox3* were found in *D. lacicola*. The nucleotide divergence of the *cox3* numt from the sequence of the corresponding mitochondrial gene of the same species is 0.05, and for the two detected *atp6* numts, the nucleotide divergences are 0.06 and 0.07. The numbers of amino acid substitutions for these numts are 6, 5, and 9, respectively. None of the nucleotide substitutions generated termination codons. These two *D. lacicola atp6* numts are associated with different copies of *Tv1* (GenBank accession numbers: KX399470, KX399471). As inferred from the intercomparison of these numts, they diverged after the transfer to the nucleus. A total of 14 nucleotide substitutions were found; of them, 5 in the first position, 6 in the second, and only 3 in the third position of codons, respectively. Note that in the mitochondrial genome most nucleotide substitu-

tions fall in the third position. It is reasonable to suggest that the observed differences accumulated after the transfer of the sequences to the nuclear genome.

Insertions of *Tv1* in the reverse orientation relative to *atp6* and *cox3* were found in the genome of *D. montana*. The nucleotide divergence of the detected numts from the corresponding mitochondrial genes of this species is 0.09. This level of nucleotide divergence suggests that the divergence of the numts is ancient. We found 12 amino acid substitutions and 1 termination codon. The *cox3* numt of the same species has 15 amino acid substitutions and 3 termination codons. In total, four lines of *D. montana* were analyzed. In the 1021.13, 20 OL8 and KR 13-09 fly lines, *atp6* and *cox3* numts are associated with retrotransposon *Tv1* in the reverse orientation. The 5' and 3' LTRs of this *Tv1* are nearly identical, which suggests a recent insertion of retrotransposon *Tv1* into the ancient numt. In *D. montana* line 1021.19 from North America, these numts were not found. In this line, we found another *cox3* numt, associated with the retrotransposon *Tv1* in the reverse orientation. The nucleotide divergence of this numt is 0.05; it has seven amino acid substitutions and one termination codon.

An insertion of *Tv1* in the reverse orientation with respect to *cox3* was found in *D. borealis*. The nucleotide divergence of the detected numt from the corresponding mitochondrial DNA is also large, 0.12. There are 14 amino acid substitu-

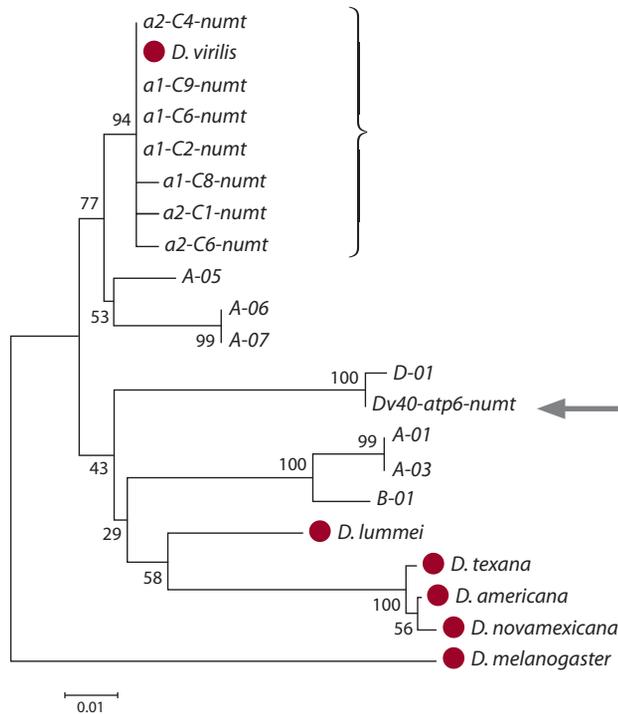


Fig. 3. Reconstruction of the phylogenetic tree of *atp6* numts from the genome of the permanent cell culture of *D. virilis* and *D. virilis* fly lines, in comparison with the mitochondrial *atp6* genes of various *Drosophila* species of the *virilis* group.

As an external group, we use *atp6* of *D. melanogaster*. Each of the *atp6* numts of *D. virilis* found during *in silico* analysis of the complete genome is indicated with a capital letter and two digits. The genetic maps of these numts are shown in Figure 2. The *atp6* numt from the genome of *D. virilis* flies of the Dv40 line is marked with an arrow. The *atp6* numts from the genome of the cell culture of *D. virilis* isolated in our experiments are indicated with a curly brace. The first two characters in the names of the experimentally obtained numts indicate the type of experiment in which the nucleotide sequences were obtained. Nucleotide sequences were submitted to GenBank under accession numbers JX560766–JX560769 and KF669862–KF669864. Nucleotide sequences of mitochondrial genes of the corresponding species of *Drosophila* of the *virilis* group were submitted to GenBank with accession numbers KX399463, FJ536196, FJ536199, FJ536203, and FJ536204. Mitochondrial sequences are marked with black circles.

tions and 3 termination codons. In addition, *D. borealis* has an unusual insertion of retrotransposon *Tv1*, located at the beginning of the *atp6* gene rather than between the *atp6* and *cox3* genes. The detected numt includes *atp6* and *cox3* sequences associated with *Tv1* in the direct orientation. The nucleotide divergence of this *atp6* numt from the *D. borealis* mitochondrial *atp6* gene is 0.14; it has 31 amino acid substitutions and 1 termination codon. The nucleotide divergence of this *cox3* numt from the *D. borealis* mitochondrial *cox3* gene is 0.13; it has 11 amino acid substitutions and 2 termination codons. All the detected *atp6* and *cox3* numts are associated with retrotransposon *Tv1* only in males (see Supplement 2), which points to their location on the Y chromosome. It can be assumed that the Y chromosome is the preferred place of the preservation of numts, whereas in other parts of the genome these sequences are rapidly lost.

Phylogenetic analysis reveals characteristic differences in the time of the emergence of numts and insertions of *Tv1* (Figures 5 and 6). Figure 5 shows the phylogenetic reconstruction

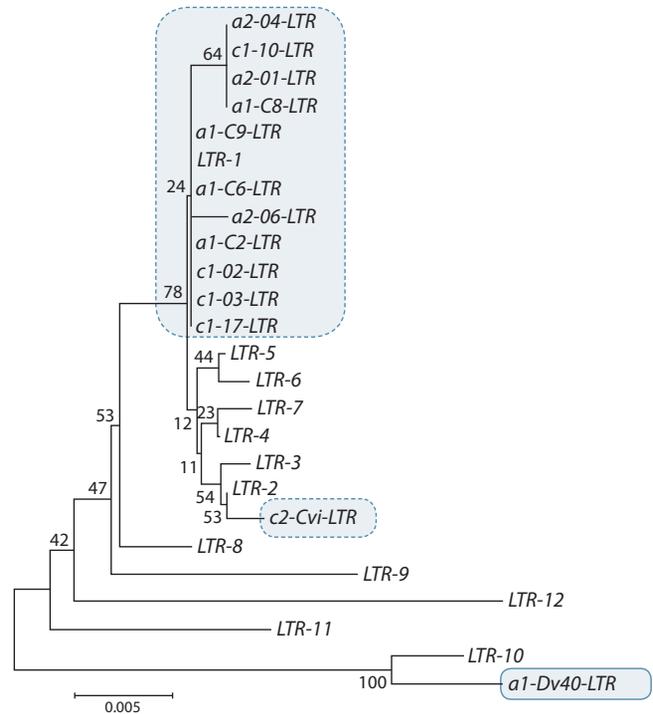


Fig. 4. Reconstruction of the phylogenetic tree of *Tv1* LTR sequences associated with *atp6* numts.

LTMs from insertions into the numts of the cell culture are enclosed with a dashed line, and the LTR associated with the numt from the fly genome is boxed. The nucleotide sequences of LTR *Tv1* were obtained by *in silico* analysis of the complete genome of *D. virilis* line TSC # 15010-1051.87 (GenBank accession number: AANI00000000.1). The schematic representation and GenBank accession numbers of the nucleotide sequences of PCR fragments containing *Tv1* LTRs are presented in Supplement 3.

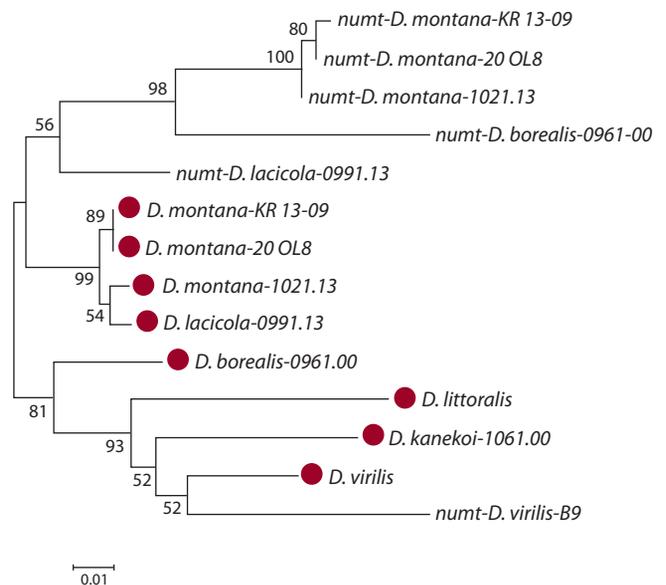


Fig. 5. Reconstruction of the phylogenetic tree of *atp6* numts associated with insertions of *Tv1* in the genomes of flies of the *virilis* group.

The GenBank accession numbers of the numt sequences are given in Supplement 3. Nucleotide sequences of mitochondrial genes of the corresponding *Drosophila* lines were submitted to GenBank under accession numbers KX399453–KX399459. The sequences of the *atp6* genes of *D. virilis* and *D. littoralis* are taken from the complete mitochondrial genomes of these species, GenBank accession numbers BK006340 and FJ447340. Mitochondrial genes are marked with black circles.

tion of the divergence of *atp6* numts in *Drosophila* of the *virilis* group. In all examined cases, the time of divergence between numts and the modern forms of the mitochondrial genes is about several million years. The ages of insertions of retrotransposon *Tv1* can be estimated by comparing different copies of LTRs associated either with the *atp6* or *cox3* numts in a particular line of flies. The analysis is illustrated in Figure 6. If we assume the rate of fixation of nucleotide substitutions to be 0.016 substitutions per site for one million years, the typical value for noncoding *Drosophila* sequences (Bowen, McDonald, 2001), the age of *Tv1* insertions into the numt of *D. virilis* is estimated to be 1.5 million years. A similar situation is observed in *D. borealis* and *D. laticola*. The opposite is found in *D. montana*. Insertions with nearly identical 5' and 3' LTRs are found in the 1021.13, 20 OL8 and KR 13-09 fly lines. The age of this *Tv1* insertion is about 300000 years, and this insertion is absent from line 1021.19, which has another insertion of *Tv1*.

It is important to note that there is no coincidence between the ages of numts and of the associated insertion of *Tv1* in *D. montana*. Young copies of *Tv1* are associated with the ancient numt. Therefore, the transfer of these elements occurred independently and at different times. This fact points to probable differences in the molecular mechanisms of the appearance of numt-*Tv1* associations in somatic cells of the cell culture and germline cells.

Conclusions

We investigated the variability of *atp6* and *cox3* numts associated with site-specific insertions of retrotransposon *Tv1* in *Drosophila* of the *virilis* group and *D. virilis* permanent cell culture. The method of numt detection was based on the ability of retrotransposon *Tv1* to transpose into the microsatellite (AT)_n sequence and on the presence of this microsatellite in the spacer region between the mitochondrial genes *atp6* and *cox3* in the mitochondrial genomes of *Drosophila* of the *virilis* group. In the *D. virilis* cell line, we found new events of mitochondrial DNA transfer to the nucleus and new *Tv1* insertions. Most of the new insertions of retrotransposon *Tv1* in the cell culture occur in the newly emerged numts. As a result, the ages of

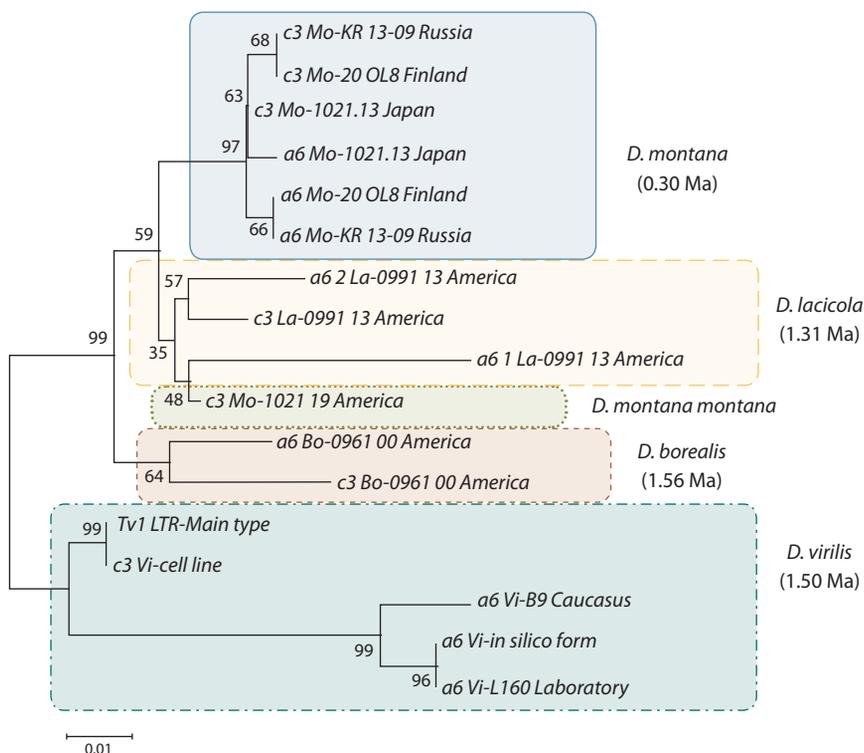


Fig. 6. Reconstruction of the phylogenetic tree of LTRs of retrotransposons *Tv1* associated with *atp6* and *cox3* numts in *Drosophila* of the *virilis* group.

The first two characters in the name of a sequence indicate the type of experiment in which the LTR sequence was obtained. The next two letters indicate the species of *Drosophila*: Mo for *D. montana*, Bo for *D. borealis*, La for *D. laticola*, and Vi for *D. virilis*. The next letters indicate the *Drosophila* line name. The bootstrap support values are listed at the nodes of the phylogram. Trees are drawn in scale. The lengths of branches correspond to the frequencies of nucleotide substitutions per site. Estimation of the age of *Tv1* insertions is provided by the formula $T = d/2k$, where T is age, Ma; d , nucleotide divergence; $k = 0.016$ (Bowen, McDonald, 2001). The LTR sequences of *Tv1* and the associated sequences of numts were submitted to GenBank under accession numbers KX399470–KX399482.

retrotransposon insertions and numt insertions in the cell line are the same. The opposite situation was found in *Drosophila* species of the *virilis* group. Insertions of *Tv1* occur in ancient numts in the genomes of flies. As a result, the ages of retrotransposon insertions and numts are different. The *atp6* and *cox3* numts, which are associated with site-specific insertions of retrotransposon *Tv1*, are species-specific in *Drosophila* of the *virilis* group.

Acknowledgements

The work was supported by project AAAA-A16-116111610180-3 “Study of variability of autonomous genetic elements of insects and development of markers of genome instability”, contract 0112-2016-0001.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andrianov B., Goryacheva I., Muge N., Sorokina S., Gorelova T., Mitrofanov V. Comparative analysis of the mitochondrial genomes in *Drosophila virilis* species group (Diptera: Drosophilidae). Trends Evol. Biol. 2010;2:e4. DOI 10.4081/eb.2010.e4.
- Andrianov B.V., Zakharyev V.M., Reznik N.L., Gorelova T.V., Evgen'ev M.B. Gypsy group retrotransposon *Tv1* from *Drosophila virilis*. Gene. 1999;239:193-199.
- Bensasson D., Zhang D.-X., Hartl D.L., Hewitt G.M. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. Trends Ecol. Evol. 2001;16(6):314-321.
- Bowen N.J., McDonald J.F. *Drosophila* euchromatic LTR retrotransposons are much younger than the host species in which they reside. Genome Res. 2001;11(9):1527-1540. DOI 10.1101/gr.164201.

- Braude-Zolotarjova T.Ya., Kakpakov V.T., Schuppe N.G. Male diploid embryotic cell line of *Drosophila virilis*. In vitro. 1986;22:481-484.
- Gunbin K., Peshkin L., Popadin K., Annis S., Ackermann R.R., Khrapko K. Integration of mtDNA pseudogenes into the nuclear genome coincides with speciation of the human genus. A hypothesis. Mitochondrion. 2017;34:20-23. DOI 10.1016/j.mito.2016.12.001.
- Hazkani-Covo E., Martin W.F. Quantifying the number of independent organelle DNA insertions in genome evolution and human health. Genome Biol. Evol. 2017;9(5):1190-1203. DOI 10.1093/gbe/evx078.
- Hazkani-Covo E., Sorek R., Graur D. Evolutionary dynamics of large numts in the human genome: rarity of independent insertions and abundance of post-insertion duplications. J. Mol. Evol. 2003;56:169-174. DOI 10.1007/s-00239-002-2390-5.
- Hazkani-Covo E., Zeller R.M., Martin W. Molecular poltergeists: mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genomes. PLoS Genet. 2010;6(2):e1000834. DOI 10.1371/journal.pgen.1000834.
- Lopez J.V., Yuhki N., Masuda R., Modi W., O'Brien S.J. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. J. Mol. Evol. 1994;39:174-190.
- Mirol P.M., Routtu J., Hoikkala A., Butlin R.K. Signals of demographic expansion in *Drosophila virilis*. BMC Evol. Biol. 2008;8:59. DOI 10.1186/1471-2148-8-59.
- Pamilo P., Viljakainen L., Vihavainen A. Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. Mol. Biol. Evol. 2007;24(6):1340-1346. DOI 10.1093/molbev/msm055.
- Richly E., Leister D. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. Mol. Biol. Evol. 2004;21(6):1081-1084. DOI 10.1093/molbev/msh110.
- Rogers H.H., Griffiths-Jones S. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genomes of *Drosophila*. PLoS One. 2012;7(3):e32593. DOI 10.1371/journal.pone.0032593.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. N. Y., 1989.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Tsuji J., Frith M.C., Tomii K., Horton P. Mammalian NUMT insertion is non-random. Nucleic Acids Res. 2012;40:9073-9088. DOI 10.1093/nar/gks424.

ORCID ID

B.V. Andrianov orcid.org/0000-0002-0064-4696

D.A. Romanov orcid.org/0000-0003-3340-9278

T.V. Gorelova orcid.org/0000-0003-3777-0626



Реконструкция структуры генофонда казахов по данным об их родорасселении

М.К. Жабагин^{1, 2}✉, О.П. Балановский^{3, 4, 5}✉, Ж.М. Сабитов⁶, А.З. Темиргалиев, А.Т. Агджоян^{3, 4}, С.М. Кошель⁷,
Е.М. Раманкулов¹, Е.В. Балановская^{4, 5}

¹ Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан

² National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан

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

⁴ Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

⁵ Биобанк Северной Евразии, Москва, Россия

⁶ Евразийский Национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан

⁷ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Использование для изучения генофонда квазигенетических маркеров – признаков небологической природы (фамилия, род), но четко наследующихся в поколениях, – одно из направлений в популяционной генетике человека. Если для популяций Западной Европы, европейской части России и Кавказа в роли квазигенетических маркеров выступают фамилии, то для популяций Центральной Азии эффективным квазигенетическим маркером является родовая принадлежность. В ряде исследований было показано, что для центральноазиатских популяций, в особенности казахов, во многих родах прослеживается происхождение большинства членов рода от общего биологического предка. В настоящей работе представлен анализ большого массива данных о 50 казахских родах у ~4.2 млн человек в начале XX века в сравнении с разнообразием Y-хромосомы в современных казахских популяциях. Анализ состоял из трех блоков: описание разнообразия квазигенетических маркеров стандартным методом изонимии; сравнение популяций по частотам квазигенетических маркеров; сравнение квазигенетических и генетических данных. Построено 50 карт частоты представленности каждого рода на территории Казахстана и ряда смежных территорий. Показано, что эти карты частот квазигенетических маркеров оказываются скоррелированы с картами генетических расстояний. О связи генетических и квазигенетических расстояний свидетельствует и тест Мантеля: обнаружена достоверная корреляция между матрицами географических и квазигенетических расстояний ($r = 0.60$; $p < 0.05$). Анализ межпопуляционной изменчивости выявляет наибольшее межгрупповое разнообразие между географическими территориями, соответствующими социально-территориальным объединениям казахского ханства – жузам, нежели другим историческим территориальным объединениям (феодальные государства, улусы, области), существовавшим на территории Казахстана в предшествующие и современную эпохи. С этими результатами согласуются графики главных компонент и многомерного шкалирования, на которых географические популяции объединяются в три кластера, соответствующие социально-территориальным объединениям – трем жузам. Это указывает на то, что окончательное структурирование казахского генофонда могло произойти в эпоху существования казахского ханства.

Ключевые слова: генофонд; геногеография; квазигенетические маркеры; казахи; родорасселение.

Reconstructing the genetic structure of the Kazakh from clan distribution data

M.K. Zhabagin^{1, 2}✉, O.P. Balanovsky^{3, 4, 5}✉,
Zh.M. Sabitov⁶, A.Z. Temirgaliyev, A.T. Agdzhoyan^{3, 4},
S.M. Koshel⁷, E.M. Ramankulov¹, E.V. Balanovska^{4, 5}

¹ National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan

² National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan

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

⁴ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

⁵ Biobank of North Eurasia, Moscow, Russia

⁶ L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

⁷ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Applying quasigenetic markers – non-biological traits which are nevertheless inherited in generations – is one of the research fields within human population genetics. For the West European, East European, and Caucasus populations, surnames are typical quasigenetic markers. For Central Asian populations, particularly Kazakh, the clan affiliation serves as a good marker: a set of papers demonstrated that many clans include mainly persons which biologically descend from a recent common ancestor. In this study, we analyzed a large (~4.2 million persons) dataset on quasigenetic markers – the geographic distribution of 50 Kazakh clans at the beginning of the 20th century, and compared the dataset with the direct data of the Y-chromosomal diversity in modern Kazakh populations. The analysis included three steps: the isonymy method, which is standard for quasigenetic markers, comparing frequencies of quasigenetic markers, and comparing the quasigenetic and genetic datasets. We constructed 50 maps of frequency of the distribution of each clan and revealed that these maps correlate with the maps of genetic distances. The Mantel test also demonstrated a significant correlation between geographic and quasigenetic distances ($r = 0.60$; $p < 0.05$). The analysis of inter-population variability revealed the largest diversity between geographic territories corresponding to the social-territorial groups of the Kazakh Khanate (zhuzes) rather than to other historical groups that existed on the territory of Kazakhstan in preceding and modern epochs. The same is evidenced by the principal components and multidimensional scaling plots, which grouped geographic populations into three clusters corresponding to three zhuzes. This indicates that

the final structuring of the Kazakh gene pool might have occurred during the Kazakh Khanate period.

Key words: gene pool; gene geography; quasigenetic markers; Kazakh; clan.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Жабагин М.К., Балановский О.П., Сабитов Ж.М., Темиргалиев А.З., Агджоян А.Т., Кошель С.М., Раманкулов Е.М., Балановская Е.В. Реконструкция структуры генофонда казахов по данным об их родорасселении. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):895-904. DOI 10.18699/VJ18.431

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zhabagin M.K., Balanovsky O.P., Sabitov Zh.M., Temirgaliyev A.Z., Agdzhoyan A.T., Koshel S.M., Ramankulov E.M., Balanovska E.V. Reconstructing the genetic structure of the Kazakh from clan distribution data. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):895-904. DOI 10.18699/VJ18.431 (in Russian)

В популяционной генетике человека, в отличие от изучения генофондов других видов, широко используются не только данные по фенотипическому разнообразию и ДНК-полиморфизму, но и квазигенетические маркеры – признаки негенетической природы (Ревазов и др., 1986), которые, тем не менее, передаются непрерывно в поколениях благодаря культурным традициям. Наиболее эффективными среди квазигенетических маркеров являются фамилии, наследующиеся в основном по однородительскому типу – отцовской генеалогической линии. Изучение фамильного фонда проведено для популяций Западной Европы (King et al., 2006; McEvoy, Bradley, 2006; King, Jobling, 2009; Martínez-González et al., 2012; Solé-Morata et al., 2015; Martínez-Cadenas et al., 2016), европейской части России (Балановская и др., 2011) и Кавказа (Балановская и др., 2000). По сравнению с ДНК-маркерами квазигенетические маркеры имеют свои достоинства: они селективно нейтральны, и данные могут быть собраны не для небольших выборок, а для тотальной популяции (Балановская, Балановский, 2007). Установленное соответствие между квазигенетическими и генетическими маркерами позволяет использовать квазигенетические маркеры для оценки инбридинга (Cavalli-Sforza, Bodmer, 1971). Поэтому к настоящему моменту с помощью антропоники (данные о фамилиях, родах и т. п.) изучена генетическая структура многих популяций мира: Парагвая (Dipierri et al., 2011), Боливии (Rodriguez-Larralde et al., 2011), Чили (Barral et al., 2012), Албании (Mikerezi et al., 2013), Гондураса (Herrera et al., 2014), Аргентины (Dipierri et al., 2017), Восточной Европы (Scapoli et al., 2007), России (Балановская и др., 2005; Сорокина и др., 2007; Почешкова и др., 2008; Ельчинова и др., 2009; Tarskaia et al., 2009; Кучер и др., 2010; Лавряшина и др., 2011; Ульянова и др., 2014). Использование фамилий в сочетании с геногеографическим подходом позволяет наглядно увидеть изменчивость генофонда с помощью карт (Балановский и др., 2001).

Близким к фамилиям является понятие патрилинейного рода – группы людей, возводящих свое происхождение к общему предку. Однако это понятие прежде всего социальное: генеалогическая цепочка рода в одних случаях может соответствовать биологическому родству, а в других отличаться. В ситуациях, когда такое соответствие наблюдается, принадлежность к роду наследуется в поколениях так же, как и Y-хромосома – от отца к сыну. Последние исследования населения Центральной Азии по изучению связи Y-хромосомы и родовых групп преимущественно для казахов (Chaix et al., 2004; Bíró et al., 2009; Abilev et al., 2012; Жабагин и др., 2014; Balanovsky et al., 2015;

Balaresque et al., 2015; Жабагин и др., 2016; Zhabagin et al., 2017) выявили, что большинство родов действительно состоит в основном из людей, принадлежащих к общему биологическому предку по мужской линии. Поэтому род в популяциях Центральной Азии может рассматриваться как эффективный квазигенетический маркер – не менее, если не более, эффективный, чем фамилии в Европе.

Опираясь на эти твердо установленные факты тесной связи родовой принадлежности локальных казахских популяций и их генофондов по маркерам Y-хромосомы, мы предприняли следующий шаг и проанализировали обширные данные о расселении казахских родов и частоте их представленности в разных регионах Казахстана. Эти данные были, во-первых, проанализированы стандартными методами, используемыми для квазигенетических маркеров, и, во-вторых, сопоставлены с прямыми генетическими данными о распределении гаплогрупп Y-хромосомы в казахских популяциях. Кроме того, на основе исторической информации о принадлежности географических ареалов расселения казахских популяций к территориальным объединениям, существовавшим в историческом прошлом на территории Казахстана, была оценена межпопуляционная изменчивость для каждого из таких исторических объединений (феодалные государства, улусы, жузы, области) и определена их роль в формировании современной архитектуры генофонда казахов.

Материалы и методы

Материалом для исследования квазигенетических маркеров послужил свод статистических сведений по расселению казахских родов «Материалы по киргизскому (казахскому) землепользованию...» (~4.2 млн человек) (Тасилова, 2017), основанный на данных переписи населения Российской империи об особенностях хозяйства и землепользования в конце XIX и начала XX века, собранных под руководством Ф. Щербина, В. Кузнецова, П. Скрыплева, П. Хворостанского, В. Переплетчикова (Темиргалиев, 2010). Ни для более ранних (в связи с отсутствием систематических переписей), ни для более поздних периодов (в связи с отсутствием в последующих переписях вопроса о родовой принадлежности) не имеется столь же подробных и достоверных данных о численности представителей каждого рода в каждом из регионов. Настоящей работой мы вводим эти уникальные данные в более активный научный оборот, представив их в виде электронных таблиц и карт расселения родов (Приложения 1–3, размещены на сайте www.генофонд.рф). Всего изучено расселение 50 казахских родов. Проанализированы частоты родов в

33 популяциях (уездах), относящихся к восьми историческим областям Центральной Азии Российской империи а также частоты родов в шести губерниях, пограничных с центральноазиатскими областями Российской империи (рис. 1). Для сравнения использовалась база данных частот гаплогрупп Y-хромосомы в современных популяциях казахов (районы).

Анализ данных состоял из описания разнообразия квазигенетических маркеров стандартным методом изонимии; сравнения популяций по частотам квазигенетических маркеров; сравнения квазигенетических и генетических данных.

При описании разнообразия наименования всех 50 родов рассматривались в качестве аллелей нейтрального мультиаллельного локуса, наследующихся по одnorodительскому типу. На основе данных о частотах родов в популяциях с помощью программы Excel были рассчитаны такие параметры, как:

– случайная изонимия (I_r): $I_r = \sum q_i^2$, где q_i – частота i -го рода в популяции;

– случайный инбридинг (f_r): $f_r = 1/4 I_r$, соответствующий F_{ST} Райта (Crow, Mange, 1965), в том числе с вычетом вкладов более высоких уровней популяционной системы (Балановская и др., 2000) по формуле:

$$f_{r(\text{район-область})}^* = f_{r(\text{район})} - f_{r(\text{область})}$$

– показатель разнообразия (α): $\alpha = 1/I_r$ (Fisher, 1943; Barta et al., 1996);

– индекс миграции (v): $v = \alpha/(N + \alpha)$, где N – размер популяции (Karlin, McGregor, 1967; Zei et al., 1983; Piazza et al., 1985);

– энтропия распределения (H): $H = -\sum q_i \log_2 q_i$ (Barta et al., 1987, 1989) и показатель избыточности (R): $R = 100 \times (\log_2 q_i - H) \log_2 q_i$.

Расчет генетических расстояний между популяциями (по частотам квазигенетических маркеров) проводился согласно (Nei, 1987) в программе DJgenetic (Balanovsky et al., 2008). Генетические взаимоотношения между популяциями визуализировались в программе Statistica 8 (StatSoft, Tulsa, OK, США) методом многомерного шкалирования и в пространстве главных компонент. Корреляционный тест Мантеля рассчитан в программном пакете Arlequin 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010), при этом статистическая значимость параметров была протестирована с помощью 1000 непараметрических перестановок. Расчет географических расстояний между уездами проводился по их географическим координатам с помощью программы DistGeo (Balanovsky et al., 2011). Геногеографические карты были созданы с помощью программы GeneGeo (Balanovsky et al., 2011; Koshel, 2012).

Результаты и обсуждение

Характеристика популяционного разнообразия по квазигенетическим маркерам

По обширному своду данных «Материалы по киргизскому (казахскому) землепользованию...» (Тасилова, 2017) были подсчитаны частоты родов (Приложение 1¹), рассматри-

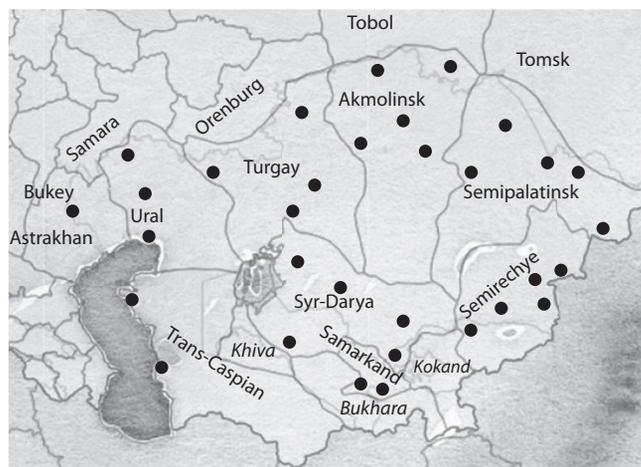


Fig. 1. Map of the Central Asian part of the Russian Empire at the end of the 19th – beginning of the 20th century (from Harvard World Map: <http://worldmap.harvard.edu/maps/russianempire> with modifications).

Oblasts and governorates are indicated by text blocks, and uyezd centers are shown as dots (Appendix 2).

ваемых далее в качестве квазигенетических маркеров, в популяциях казахов начала XX века (см. рис. 1).

Подробные характеристики разнообразия частот родов приведены в Приложении 2 (www.генофонд.рф). Здесь отметим только, что анализ инбридинга выполнен как для популяций (уездов, нижний административный уровень), так и для объединенных областных популяций (верхний административный уровень). При рассмотрении областных популяций самые высокие показатели изонимии и инбридинга (f_r^* до 0.156) отмечены на юго-западе (в Закаспийской области, которая также характеризуется наименьшим числом родов) и на северо-востоке (в Семипалатинской области). Напротив, самые низкие показатели инбридинга (f_r^* , от 0.003 до 0.018) отмечаются на северо-западе Казахстана (Уральская область) и на смежных территориях России, в Зауралье и нижнем Поволжье (регионы Оренбургская, Самарская, Астраханская, Буковская Орда). Вероятно, эти наблюдения отображают следы исторического заселения казахами Заволжья в связи с образованием Буковской Орды в XVIII веке и ростом роли Оренбурга как административного центра Центральной Азии.

Результаты расчета инбридинга (f_r) на нижнем административном уровне (уездные популяции) картографированы на рис. 2 в пределах современной территории Казахстана (исходные значения представлены в Приложении 2). Значения варьируют на целый порядок: от $f_r = 0.024$ для популяции KAZ_29 (Перовский уезд) до $f_r = 0.227$ для популяции KAZ_25 (Красноводский уезд). Паттерн случайного инбридинга как на уровне уездов, так и при анализе областей выявляет высокие значения на юго-западе, но также показывает, что вторая область максимумов на северо-востоке является географически более обширной и захватывает часть центральных районов Казахстана.

Для Центральной Азии, по данным других исследований, использовавших метод изонимии на основе ин-

¹ Приложения 1–3 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx15.pdf>



Fig. 2. Random inbreeding distribution predicted from data on quasigenetic markers.

The color scale illustrates the values of a character: purple for maximum values to white for minimum ones. The right upper corner of the legend shows statistical parameters of the numerical model of the character: K, the number of reference sites; N, the number of map grid nodes; min, minimum; max, maximum; avg, average value; std, standard deviation. Correlation coefficients: Rlat, with latitude; Rlon, with longitude.

формации о родовой принадлежности, в сельских популяциях установлен высокий уровень инбридинга и в Туркмении, и в Узбекистане (Бочков и др., 1984), причем в этих же популяциях отмечается и высокая отягощенность наследственной патологией. Поэтому обнаруженный нами максимальный инбридинг в данном исследовании в пределах юго-западных и северо-восточных казахских популяций позволяет прогнозировать высокий генетический груз в этих регионах Казахстана, и, соответственно, указывает на перспективность их прямого генетико-эпидемиологического обследования.

Сравнение карт распространения родов и генетических данных

По данным Приложения 1 была построена серия из 50 карт распространения отдельных родов (Приложение 3, www.генофонд.рф). На рис. 3 представлены примеры таких карт (для родов Кыпшак, Байулы, Найман, Дулат). Являясь лишь одним из результатов нашего исследования, представленные карты имеют первостепенную новизну для этнографов и историков, поскольку подобные карты родорасселения последний раз реконструировались в научных работах полувековой давности (Востров, Муканов, 1968), а новые карты, основанные на четких алгоритмах расчета и визуализации, созданы впервые.

Эти карты родорасселения крайне полезны в исследованиях структуры генофонда казахов. На рис. 4 показана тесная связь между распространением квазигенетиче-

ского маркера (расселением рода Аргын), частоты отдельного генетического маркера (гаплогруппы *G1-M285* Y-хромосомы) и характеристикой генофонда Каркаралинского района Казахстана (где доля представителей рода Аргын особенно высока) по совокупности генетических маркеров. Практически полное совпадение этих карт иллюстрирует и подтверждает то, что данные о расселении родов могут быть эффективны для прогноза генофонда в популяциях, где прямые генетические данные пока не получены. Такое совпадение карт позволяет сделать еще один важный вывод. Поскольку карты родорасселения получены на материалах начала XX века, а генетические данные представляют современное население, это служит косвенным аргументом, что население большинства регионов сохраняло генетическую преемственность с конца XIX до начала XXI века.

Роль исторических популяционных объединений в формировании структуры казахского генофонда

Межпопуляционная изменчивость по всей совокупности (39 популяций, включающих 33 уездные популяции и 6 сопредельных губерний) достигает высоких значений $F_{ST} = 0.35$. Для количественной оценки связи межпопуляционной изменчивости и географических расстояний проведен тест Мантеля. Между 33 уездами были определены географические расстояния. Между этими же уездами на основе частот родов были рассчитаны квазигенетические расстояния аналогично генетическим расстояниям Нея.

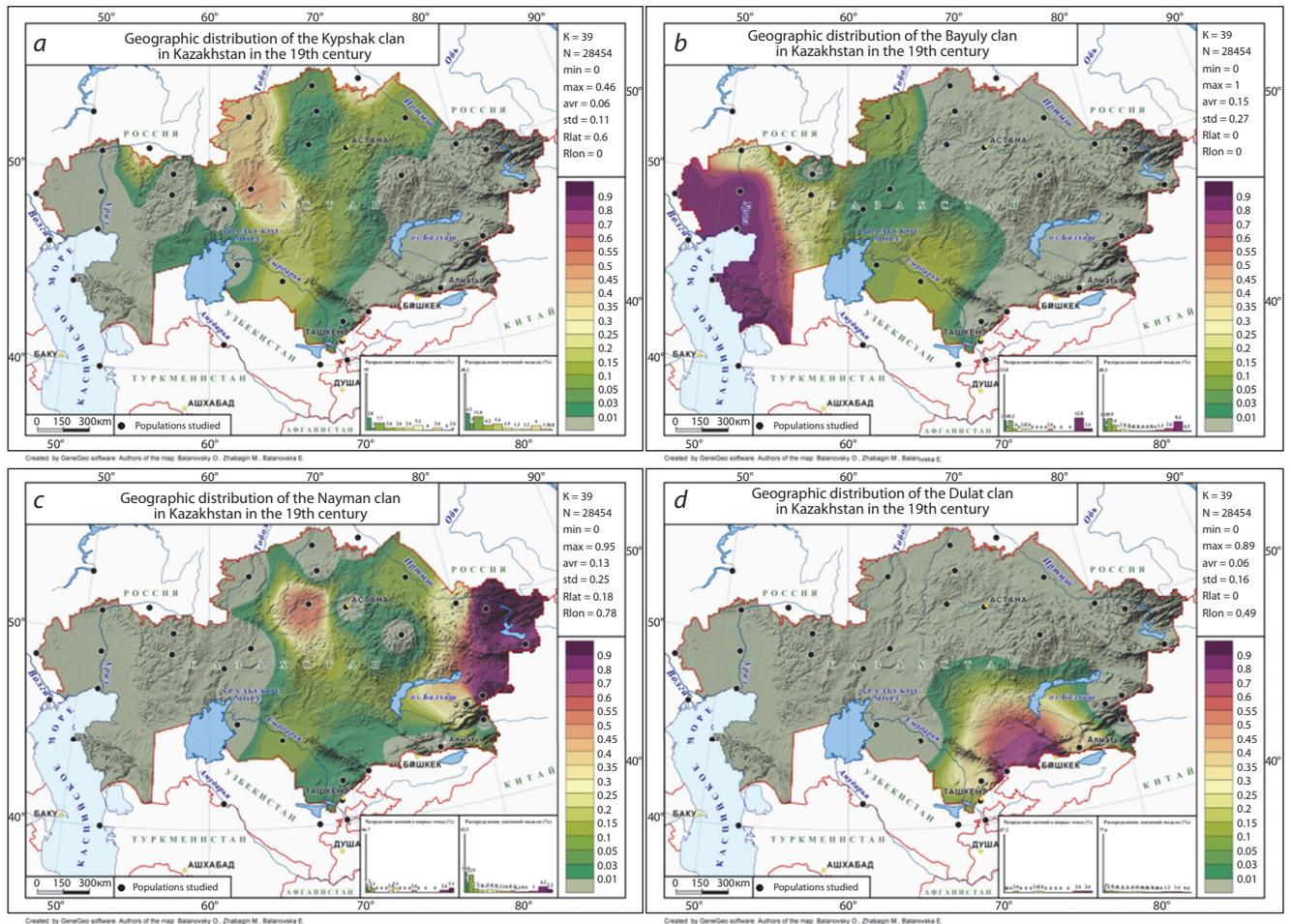


Fig. 3. Geographic distribution of some Kazakh clans: (a) Kypshak; (b) Bayuly; (c) Nayman; (d) Dulat.

Dots indicate Kazakh populations studied. The color scale illustrates the proportions of a clan in the population from purple (100%) to light-green (1%). Other panels of the legend show statistical parameters of mapping.

Сопоставление полученных двух матриц – географических и квазигенетических расстояний – демонстрирует достоверную высокую корреляцию между ними: $r = 0.60$ ($p < 0.05$).

Этот результат указывает на низкую миграционную активность казахского населения и позволяет перейти к анализу роли различных исторических социально-территориальных объединений. Для реализации этой цели проведен анализ AMOVA (таблица), популяции были сгруппированы согласно данным об исторических образованиях на территории Казахстана.

Первая группировка популяций («государственная») отражает три государственных образования в эпоху раннего феодализма (750–1050 гг.): Кимакское государство, Карлукское государство, Огузское государство. Предполагается, что они могли выступить основополагающим фактором формирования структуры генофонда современных казахов.

Вторая группировка популяций («улусы») – территориально-административное наследие империи Чингисхана – улусы Джучи, Угэдея и Чагатай, существовавшие на территории расселения исследуемых популяций с XIII по XV век. Длительный период существования та-

кого территориального деления Монгольской империи и смена сложившихся раннефеодальных взаимосвязей могли стереть сформировавшуюся изначальную структуру («государственную») и заложить другую основу («улусы») для структурирования генофонда.

Третья группировка популяций («жузы») – социально-территориальное подразделение казахского ханства (1465–1847) – Старший, Средний, Младший жузы, существующие поныне. Вероятно, именно социально-территориальные отношения, сложившиеся в казахском ханстве, выступили в качестве нового основного фактора в структурировании генофонда.

Четвертая группировка популяций («губернии») отражает территориально-административное деление Российской империи в Центральной Азии: Степное генерал-губернаторство, Туркестанское генерал-губернаторство и Зауральская киргизская степь (известна также как Оренбургское ведомство или Казахи Оренбургского ведомства). Несомненно, одной из целей колониального территориально-административного деления был перевод кочевников к оседлости. Это могло также выступить значимым фактором в дальнейшем переструктурировании генофонда.

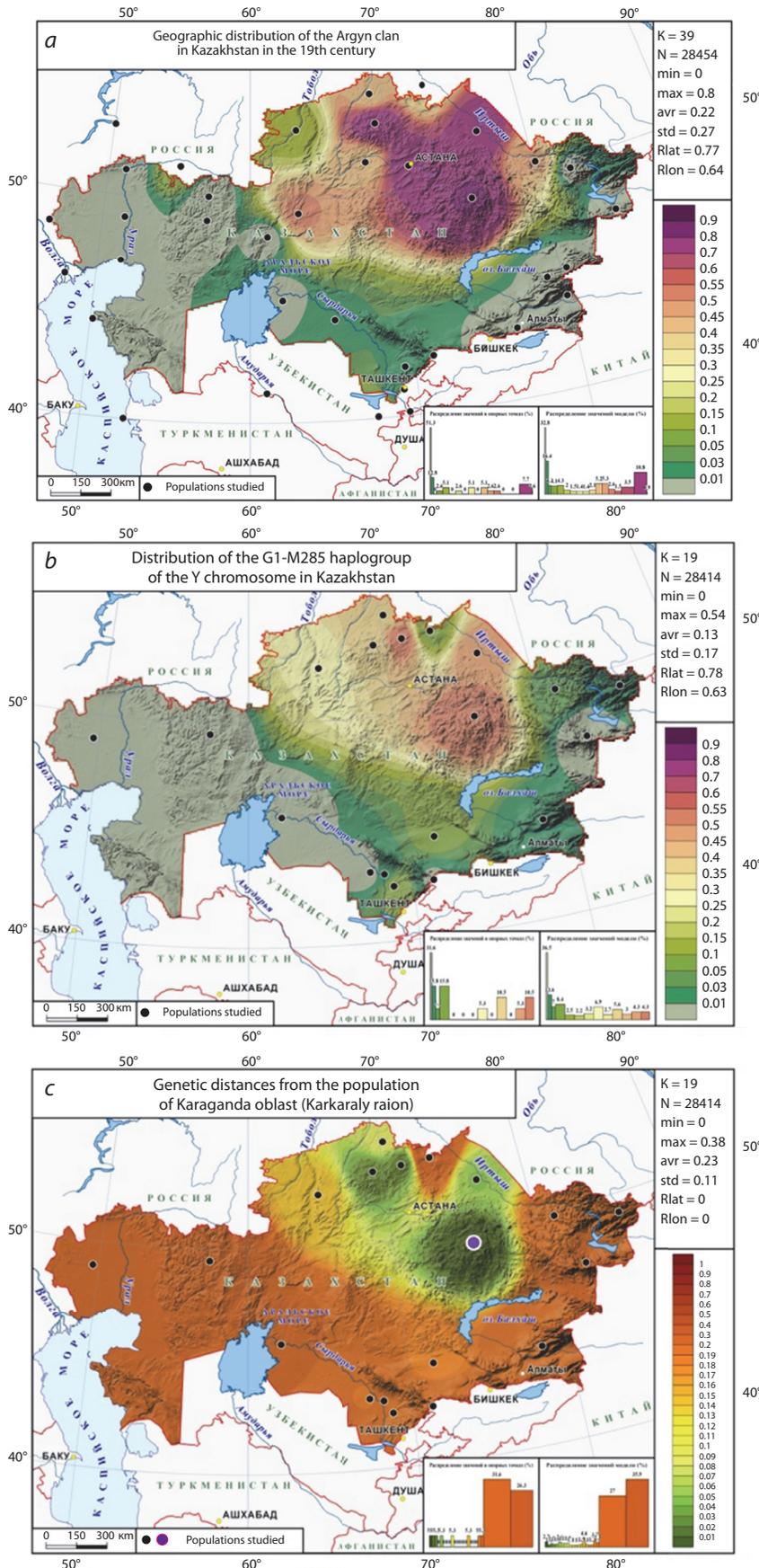


Fig. 4. Gene geography of the Argyn clan: (A) geographic distribution of the clan, the shares of Argyn people in the total populations of regions being mapped; (B) frequency distribution of haplogroup G1; (C) genetic distances from the Karkaraly raion of Kazakhstan.

Пятая группировка («современная») отражает современное распределение популяций между границами государств (Казахстана, России и стран Средней Азии).

Наименьшая межгрупповая изменчивость (3.6 %) была выявлена именно при пятой («современной») группировке (см. таблицу). Это указывает на то, что между современными казахскими популяциями различных государств нет существенных различий при допущении, что большая часть современных популяций является потомками населения тех же уездов.

Максимальное значение межгрупповой изменчивости (12.3 %) получено при объединении популяций, согласно социально-территориальному подразделению времен казахского ханства (жузы), существовавшему не менее 550 лет тому назад. Такой результат свидетельствует о том, что окончательное структурирование казахского генофонда произошло во время казахского ханства.

Результаты группировки популяций по более ранним географическим подразделениям указывают на значимое наследие Монгольской империи («улусы», 10.7 %) и позволяют предположить, что уже в эпоху Монгольской империи (Золотая Орда) начинает формироваться пространственная структура современного генофонда казахов.

Полученные результаты склоняют чашу весов в пользу гипотезы Т.И. Султанова, указывающей, что жузы возникли после распада Золотой Орды (Кляшторный, Султанов, 1992; Сабитов, 2014), нежели в сторону альтернативной гипотезы (Аманжолов, 1959), постулирующей, что казахи подразделились на жузы еще в X–XII веках, до объединения Чингисханом тюрков и монголов в одну империю.

Результаты анализа AMOVA подтверждаются и другими методами. Так, при анализе главных компонент на верхнем (областном) уровне административного деления географические популяции объединяются в три кластера, соответствующие социально-территориальным объединениям – трем жузам казахов: α -кластер отражает старший жуз; β -кластер – средний; γ -кластер – младший жуз (рис. 5).

Анализ на нижнем уровне административного деления (уезды) методом

The proportion of interpopulation variation (F_{ST}) among Kazakh populations grouped according to five different historical models of the territorial structure

Basis of division	Groups	Number of populations	Percentage of variation (%)	
			among populations within groups	among groups
Modern states	Kazakhstan	27	33.07	3.58
	Russia	5		
	Central Asian States	7		
Administrative subdivision of the Russian Empire	Steppe Governorate General	17	29.40	7.07
	Turkestan Governorate General	10		
	Transural Kirghiz steppe	12		
Socioterritorial division of the Kazakh Khanate	Senior zhuz	10	25.21	12.26
	Middle zhuz	16		
	Junior zhuz	13		
Administrative division of the Mongolian Empire heritage	Ulus of Jochi	25	27.16	10.72
	Ulus of Chagatai	7		
	Ulus of Ögedei	7		
Division in the epoch of early feudalism	Kimak Khanate	23	29.99	6.78
	Oguz Yabghu State	6		
	Karluk Yabghu	10		



Fig. 5. The principal component analysis plot of regional Kazakh populations from the dataset on quasigenetic markers.

многомерного шкалирования демонстрирует также отчетливые различия между взаимоотношениями уездов: определяются те же самые кластеры (рис. 6). В пределах β-кластера обнаруживается сближение юго-восточных популяций KAZ_8, KAZ6, KAZ_3, KAZ_4 (Семипалатинской и Семиреченской областей) и связь с KAZ_32

(Самаркандской области), вероятно, связанное с миграцией казахов в Самарканд (История народов Узбекистана, 1947). Примечательно, что наблюдается также четкое разделение между популяциями вдоль Сырдарьи – низовые (KAZ_28, KAZ_29, KAZ_31) и верховые (KAZ_26, KAZ_27, KAZ_30) уезды Сырдарьинской области.

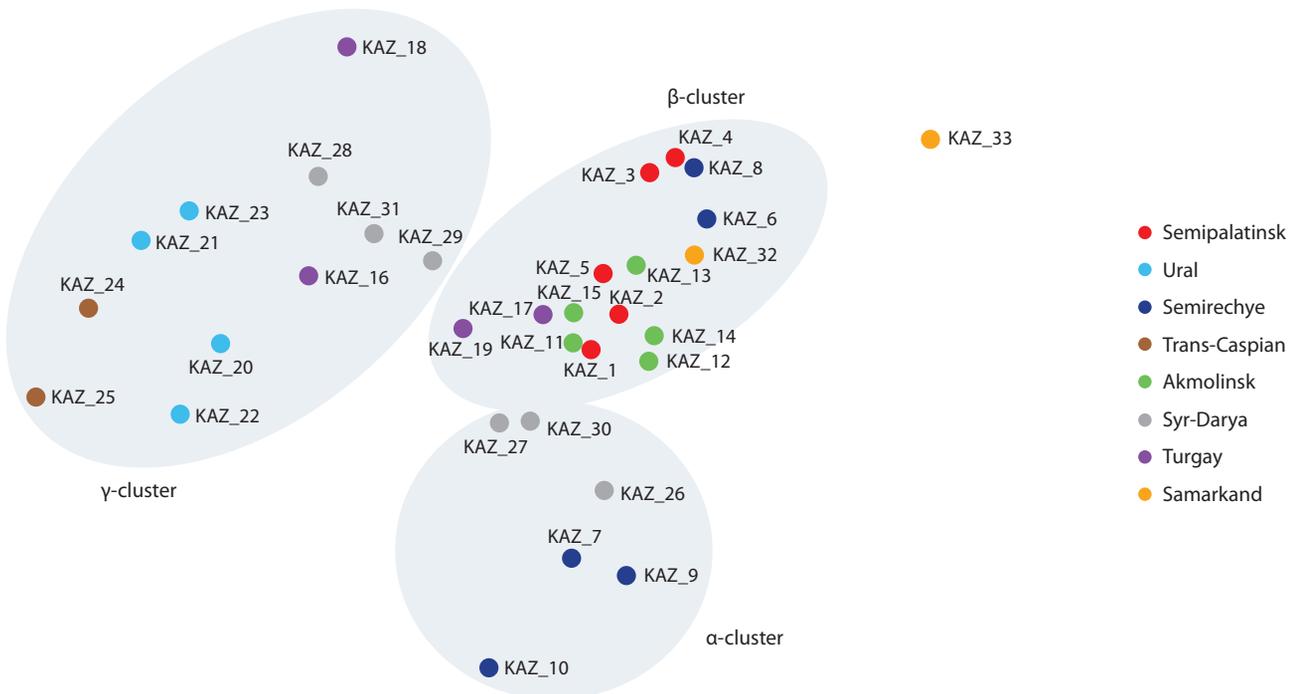


Fig. 6. Location of Kazakh subpopulations of lower administrative units (uyezds) in the multidimensional scaling plot according to quasigenetic markers (stress value 0.18, alienation coefficient 0.19).

Colored circles indicate to what oblasts uyezds belong. The designations of uyezd populations are shown in Appendix 1 (www.генофонд.рф).

Таким образом, особенность архитектуры казахской популяции – ее родоплеменная структура – позволила нам использовать рода в качестве квазигенетических маркеров, впервые ввести в научный оборот большой массив данных о родах у казахов и выявить сходство паттернов изменчивости квазигенетических маркеров и прямых генетических данных о полиморфизме Y-хромосомы. Изучение структуры генофонда казахов на основе геногеографического подхода и метода изонимии обнаружило более высокий уровень инбридинга в популяциях юго-запада и северо-востока. Высокие межпопуляционные различия проявляются больше всего между регионами, относившимися к разным социально-государственным образованиям в позднемонгольский период и период Казахского ханства, и поэтому могли сформироваться в эти эпохи.

Acknowledgement

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (№ AP05134955), в рамках темы Государственного задания ФАНО России для Медико-генетического научного центра и Государственного задания ФАНО России для ИОГен РАН (тема АААА-А16-116111610171-1) и при финансовой поддержке РФФИ по научному проекту № 17-304-50005 «мол_нр».

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Аманжолов С.А. Вопросы диалектологии и истории казахского языка. Алматы, 1959. [Amanzholov S.A. The Questions of Dia-

lectology and the History of the Kazakh Language. Almaty, 1959. (in Russian)]

Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на Русской равнине. М.: Луч, 2007. [Balanovska E.V., Balanovsky O.P. The Russian Gene Pool on the East European Plain. Moscow: Luch Publ., 2007. (in Russian)]

Балановская Е.В., Почешхова Э.А., Балановский О.П., Гинтер Е.К. Геногеографический анализ подразделенности популяции: II. География случайного инбридинга (по частотам фамилий у адыгов). Генетика. 2000;36(8):1126-1139. [Balanovskaya E.V., Balanovskii O.P., Ginter E.K., Pocheshkhova E.A. Gene-geographic analysis of a subdivided population. II. Geography of random inbreeding based on surname frequencies in Adygs. Rus. J. Genetics. 2000;36(8):936-948.]

Балановская Е.В., Романов А.Г., Балановский О.П. Однофамильцы или родственники? Подходы к изучению связи между гаплогруппами Y-хромосомы и фамилиями. Молекуляр. биология. 2011;45(3):473-485. [Balanovska E.V., Romanov A.G., Balanovsky O.P. Namesakes or relatives? Approaches to investigating the relationship between Y-chromosomal haplogroups and surnames. Molekulyarnaya Biologiya = Molecular Biology (Moscow). 2011;45(3):430-441. DOI 10.1134/S0026893311030022.]

Балановская Е.В., Соловьева Д.С., Балановский О.П., Чурнов М.И., Сорокина И.Н., Евсеева И.В., Аболмасов Н.Н., Почешхова Э.А., Серегин Ю.А., Пшеничнов А.С. «Фамильные портреты» пяти русских регионов. Мед. генетика. 2005;1:2-10. [Balanovska E.V., Solovyeva D.S., Balanovsky O.P., Churnov M.I., Sorokina I.N., Evseeva I.V., Abolmasov N.N., Pocheshkova E.A., Sereyogin Y.A., Pshenichnov A.S. "Family portraits" of five regions of Russia. Meditsinskaya Genetika = Medical Genetics. 2005;1:2-10. (in Russian)]

Балановский О.П., Бужилова А.П., Балановская Е.В. Русский генофонд. Геногеография фамилий. Генетика. 2001;37(7):974-990. [Balanovsky O.P., Buzhilova A.P., Balanovskaya E.V. The Russian gene pool: gene geography of surnames. Rus. J. Genet. 2001;37(7):807-822. DOI 10.1023/A:1016755111586.]

- Бочков Н.П., Захаров А.Ф., Иванов А.И. Медицинская генетика. М.: Медицина, 1984. [Bochkov N.P., Zakharov A.F., Ivanov A.I. Medical Genetics. Moscow: Meditsina Publ., 1984. (in Russian)]
- Востров В.Б., Муканов М.С. Родоплеменной состав и расселение казахов (конец XIX – начало XX в.). Алма-Ата, 1968. [Vostrov V.B., Mukanov M.S. The Tribal Structure and Settlement of the Kazakhs (late XIX – early XX). Alma-Ata, 1968. (in Russian)]
- Ельчинова Г.И., Тереховская И.Г., Осетрова А.А., Порядина О.А., Зинченко Р.А. Распределение фамилий и случайный инбридинг в Кировской области. Генетика. 2009;45(10):1411-1419. [El'chinova G.I., Terekhovskaya I.G., Osetrova A.A., Poryadina O.A., Zinchenko R.A. Surname distribution and random inbreeding in Kirov oblast. Rus. J. Genet. 2009;45(10):1247-1255. DOI 10.1134/S1022795409100135.]
- Жабагин М.К., Дибирова Х.Д., Фролова С.А., Сабитов Ж.М., Юсупов Ю.М., Утевская О.М., Тарлыков П.В., Тажигулова И.М., Балаганская О.А., Нимадава П., Захаров И.А., Балановский О.П. Связь изменчивости Y-хромосомы и родовой структуры: генофонд степной аристократии и духовенства казахов. Вестн. Моск. ун-та. Сер. XXIII. Антропология. 2014;1:96-101. [Zhabagin M.K., Dibirova Kh.D., Frolova S.A., Sabitov Z.M., Yusupov Y.M., Utevskaia O.M., Tarlykov P.V., Tazhigulova I.M., Balaganskaya O.A., Nimadava P., Zakharov I.A., Balanovsky O.P. The relation between Y chromosome variation and the clan structure: the gene pool of the steppe aristocracy and the steppe clergy of the Kazakhs. Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seria XXIII. Antropologia = Vestnik of Moscow University. Ser. XXIII. Anthropology. 2014;1:96-101. (in Russian)]
- Жабагин М.К., Сабитов Ж.М., Агджоян А.А., Юсупов Ю.М., Богуну Ю.В., Лаврышина М.Б., Схалюха Р.А., Балаганская О.А., Тажигулова И.М., Акильжанова А.Р., Жумадилов Ж.Ш., Балановский О.П., Балановская Е.В. Генезис крупнейшей родоплеменной группы казахов – аргынов – в контексте популяционной генетики. Вестн. Моск. ун-та. Сер. XXIII. Антропология. 2016; 4:59-68. [Zhabagin M.K., Sabitov Zh.M., Agdzhoyan A.A., Yusupov Y.M., Bogunov Y.V., Lavryashina M.B., Tazhigulova I.M., Akil'zhanova A.R., Zhumadilov Zh.Sh., Balanovsky O.P., Balanovska E.V. Genesis of Argyns, the largest tribal-clan group of Kazakhs, in the context of population genetics. Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seria XXIII. Antropologia = Bulletin of Moscow University. Ser. XXIII. Anthropology. 2016;4:59-68. (in Russian)]
- История народов Узбекистана. Ташкент, 1947. [History of the Peoples of Uzbekistan. Tashkent, 1947. (in Russian)]
- Кляшторный С.Г., Султанов Т.И. Казахстан: летопись трех тысячелетий. Алматы, 1992. [Klyashstornyy S.G., Sultanov T.I. Kazakhstan: Record of Three Millennia. Almaty, 1992. (in Russian)]
- Кучер А.Н., Данилова А.Л., Конева Л.А., Ноговицина А.Н. Структура браков в якутских популяциях: миграционные процессы. Генетика. 2010;46(5):692-699. [Kucher A.N., Danilova A.L., Koneva L.A., Nogovitsina A.N. Marriage structure of Yakut populations: ethnic composition and isonymy inbreeding. Russ. J. Genet. 2010;46(3):408-416. DOI 10.1134/S1022795410030142.]
- Лаврышина М.Б., Ульянова М.В., Толочко Т.А., Балаганская О.А., Романов А.Г., Балановская Е.В. Шорцы: сходство и различие территориальных групп по данным фонда фамилий и аутомных ДНК маркеров. Вестн. Моск. ун-та. Сер. XXIII. Антропология. 2011;2:66-77. [Lavryashina M.B., Ul'yanova M.V., Tolochko T.A., Balaganskaya O.A., Romanov A.G., Balanovska E.V. The Shors: similarities and differences among territorial groups according to the surname range and autosomal DNA markers. Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seria XXIII. Antropologia = Bulletin of Moscow University. Ser. XXIII. Anthropology. 2011;2:66-77. (in Russian)]
- Почешхова Э.А., Балановская Е.В., Серегин Ю.А., Голубцов В.И., Балановский О.П. Динамика генофонда во времени по данным о фамилиях и родословных. Мед. генетика. 2008;7(8):25-29. [Pocheshkhova E.A., Balanovska E.V., Seregin Yu.A., Golub-tsov V.I., Balanovsky O.P. Temporal dynamics of gene pool reconstructed from genealogical and surname data. Meditsinskaya Genetika = Medical Genetics. 2008;7(8):25-29. (in Russian)]
- Резавов А.А., Парадеева Г.М., Русакова Г.И. Пригодность русских фамилий в качестве «квазигенетического» маркера. Генетика. 1986;22(4):699-703. [Revazov A.A., Paradeeva G.M., Rusakova G.I. Possibility of using Russian family names as a quasi-genetic marker. Genetika. 1986;22(4):699-703. (in Russian)]
- Сабитов Ж.М. Казахские жузы и клановая система Золотой Орды. Вестн. Евраз. нац. ун-та им. Л.Н. Гумилева. 2014;3(100):201-207. [Sabitov Zh.M. Kazakh zhuzes and the Golden Horde clan system. Vestnik Evraziyskogo Natsionalnogo Universiteta im. L.N. Gumileva = Bulletin of L.N. Gumilyov Eurasian National University. 2014;3(100):201-207. (in Russian)]
- Сорокина И.Н., Балановская Е.В., Чурносков М.И. Генофонд населения Белгородской области. I. Дифференциация всех районных популяций по данным антропонимии. Генетика. 2007;43(6):841-849. [Sorokina I.N., Balanovska E.V., Churnosov M.I. The gene pool of the Belgorod oblast population. I. Differentiation of all district populations based on anthroponymic data. Russ. J. Genet. 2007; 43(6):697-704. DOI 10.1134/S1022795407060142.]
- Тасилова Н. «Материалы по киргизскому (казахскому) землепользованию...» – как источник по истории Казахстана (конец XIX в. – начало XX в.). Алматы, 2017. [Tasilova N. "Materials on Kyrgyz (Kazakh) Land Use ..." – as a Source on the History of Kazakhstan (late XIX century – early XX century). Almaty, 2017. (in Russian)]
- Темиргалиев А. Волости, уезды... Казахи: Со схематической картой низовых административно-территориальных делений проживания казахов в 1897–1915 гг. Алматы, 2010. [Temirgaliev A. Volosts, uyezds... Kazakhs: with a Schematic Map of Lower Administrative and Territorial Divisions of the Kazakhs' Residence in 1897–1915. Almaty, 2010. (in Russian)]
- Ульянова М.В., Лаврышина М.Б., Николаев В.В., Октябрьская И.В., Дружинин В.Г. Коренное население северных районов Алтая: отражение демографических процессов XIX – начала XXI века в динамике фамильного состава. Археология, этнография и антропология Евразии. 2014;3(59):128-140. [Ul'yanova M.V., Lavryashina M.B., Nikolaev V.V., Oktyabr'skaya I.V., Druzhinin V.G. Native populations of the northern Altai: demographic processes of the late 19th – early 21st century as reflected in surname dynamics. Arkheologiya, etnografiya i antropologiya Evrazii = Archaeology, Ethnology, and Anthropology of Eurasia. 2014;42(3): 128-140. DOI 10.1016/j.aae.2015.04.015. (in Russian)]
- Abilev S., Malyarchuk B., Derenko M., Wozniak M., Grzybowski T., Zakharov I. The Y-chromosome C3* star-cluster attributed to Genghis Khan's descendants is present at high frequency in the Kerey clan from Kazakhstan. Hum. Biol. 2012;84(1):79-89. DOI 10.3378/027.084.0106.
- Balanovsky O., Dibirova K., Dybo A., Mudrak O., Frolova S., Pocheshkhova E., Haber M., Platt D., Schurr T., Haak W., Kuznetsova M., Radzhabov M., Balaganskaya O., Romanov A., Zakharova T., Soria Hernanz D.F., Zalloua P., Koshel S., Ruhlen M., Renfrew C., Wells R.S., Tyler-Smith C., Balanovska E., Genographic C. Parallel evolution of genes and languages in the Caucasus region. Mol. Biol. Evol. 2011;28(10):2905-2920. DOI 10.1093/molbev/msr126.
- Balanovsky O., Rootsi S., Pshenichnov A., Kivisild T., Churnosov M., Evseeva I., Pocheshkhova E., Boldyreva M., Yankovsky N., Balanovska E., Villems R. Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context. Am. J. Hum. Genet. 2008;82(1):236-250. DOI 10.1016/j.ajhg.2007.09.019.
- Balanovsky O., Zhabagin M., Agdzhoyan A., Chukhryaeva M., Zaporozhchenko V., Utevska O., Highnam G., Sabitov Z., Greenspan E., Dibirova K., Skhalyakho R., Kuznetsova M., Koshel S., Yusupov Y., Nymadawa P., Zhumadilov Z., Pocheshkhova E., Haber M., Zalloua P.A., Yepiskoposyan L., Dybo A., Tyler-Smith C., Balanovska E. Deep phylogenetic analysis of haplogroup G1 provides estimates of SNP and STR mutation rates on the human Y-chromosome

- and reveals migrations of Iranic speakers. *PLoS One*. 2015;10(4): e0122968. DOI 10.1371/journal.pone.0122968.
- Balaresque P., Poulet N., Cussat-Blanc S., Gerard P., Quintana-Murci L., Heyer E., Jobling M.A. Y-chromosome descent clusters and male differential reproductive success: young lineage expansions dominate Asian pastoral nomadic populations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015;23(10):1413-1422. DOI 10.1038/ejhg.2014.285.
- Barrai I., Barbujani G., Beretta M., Maestri I., Russo A., Formica G., Pinto-Cisternas J. Surnames in Ferrara: distribution, isonymy and levels of inbreeding. *Ann. Hum. Biol.* 1987;14(5):415-423.
- Barrai I., Formica G., Barale R., Beretta M. Isonymy and migration distance. *Ann. Hum. Genet.* 1989;53(3):249-262.
- Barrai I., Rodriguez-Larralde A., Dipierri J., Alfaro E., Acevedo N., Mamolini E., Sandri M., Carrieri A., Scapoli C. Surnames in Chile: a study of the population of Chile through isonymy. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2012;147(3):380-388. DOI 10.1002/ajpa.22000.
- Barrai I., Scapoli C., Beretta M., Nesti C., Mamolini E., Rodriguez-Larralde A. Isonymy and the genetic structure of Switzerland. I. The distributions of surnames. *Ann. Hum. Biol.* 1996;23(6):431-455.
- Bíró A.Z., Zalán A., Völgyi A., Pamjav H. A Y-chromosomal comparison of the Madjars (Kazakhstan) and the Magyars (Hungary). *Am. J. Phys. Anthropol.* 2009;139(3):305-310. DOI 10.1002/ajpa.20984.
- Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. *The genetics of human populations*. San Francisco: W.H. Freeman and Co; 1971. XVI; 965.
- Chaix R., Austerlitz F., Khégay T., Jacquesson S., Hammer M.F., Heyer E., Quintana-Murci L. The genetic or mythical ancestry of descent groups: Lessons from the Y chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 2004;75(6):1113-1116. DOI 10.1086/425938.
- Crow J.F., Mange A.P. Measurement of inbreeding from the frequency of marriages between persons of the same surname. *Eugen. Quart.* 1965;12(4):199-203. DOI 10.1080/19485565.1965.9987630.
- Dipierri J., Rodríguez-Larralde A., Alfaro E., Scapoli C., Mamolini E., Salvatorelli G., Caramori G., De Lorenzi S., Sandri M., Carrieri A., Barrai I. A study of the population of Paraguay through isonymy. *Ann. Hum. Genet.* 2011;75(6):678-687. DOI 10.1111/j.1469-1809.2011.00676.x.
- Dipierri J.E., Rodríguez-Larralde A., Barrai I., Redomero E.G., Alonso-Rodríguez C., Alfaro E.L. Consanguinity by random isonymy and socioeconomic development in Argentina: a population study. *J. Biosoc. Sci.* 2017;49(3):322-333. DOI 10.1017/S0021932016000444.
- Excoffier L., Lischer H.E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* 2010;10(3):564-567. DOI 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x. PubMed PMID: 21565059.
- Fisher R.A. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of animal population. *J. Anim. Ecol.* 1943;12(1):42-58. DOI 10.2307/1411.
- Herrera Paz E.F., Scapoli C., Mamolini E., Sandri M., Carrieri A., Rodriguez-Larralde A., Barrai I. Surnames in Honduras: A study of the population of Honduras through isonymy. *Ann. Hum. Genet.* 2014;78(3):165-177. DOI 10.1111/ahg.12057.
- Karlin S., McGregor J. The number of mutant forms maintained in a population. *Proc. 5th Berkeley Symp. Math., Stat. Prob.* 1967;4: 415-438.
- King T.E., Ballereau S.J., Schürer K.E., Jobling M.A. Genetic signatures of coancestry within surnames. *Curr. Biol.* 2006;16(4):384-388. DOI 10.1016/j.cub.2005.12.048.
- King T.E., Jobling M.A. Founders, drift, and infidelity: the relationship between Y chromosome diversity and patrilineal surnames. *Mol. Biol. Evol.* 2009;26(5):1093-1102. Epub 2009/02/09. DOI 10.1093/molbev/msp022.
- Koshel S.M. *Geoinformation technologies in genogeography*. Eds. I.K. Lure, V.I. Kravtsova. Modern Geographic Cartography. Moscow, 2012;158-166.
- Martínez-Cadenas C., Blanco-Verea A., Hernando B., Busby G.B., Brion M., Carracedo A., Salas A., Capelli C. The relationship between surname frequency and Y chromosome variation in Spain. *Eur. J. Hum. Genet.* 2016;24(1):120-128. Epub 2015/04/22. DOI 10.1038/ejhg.2015.75.
- Martínez-González L.J., Martínez-Espín E., Álvarez J.C., Albar-daner F., Rickards O., Martínez-Labarga C., Calafell F., Lorente J.A. Surname and Y chromosome in Southern Europe: a case study with Colom/Colombo. *Eur. J. Hum. Genet.* 2012;20(2):211-216. DOI 10.1038/ejhg.2011.162.
- McEvoy B., Bradley D.G. Y-chromosomes and the extent of patrilineal ancestry in Irish surnames. *Hum. Genet.* 2006;119(1-2):212-219. DOI 10.1007/s00439-005-0131-8.
- Mikerezi I., Xhina E., Scapoli C., Barbujani G., Mamolini E., Sandri M., Carrieri A., Rodriguez-Larralde A., Barrai I. Surnames in Albania: a study of the population of Albania through isonymy. *Ann. Hum. Genet.* 2013;77(3):232-243. DOI 10.1111/ahg.12015.
- Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 1987.
- Piazza A., Mayr W.R., Contu L., Amoroso A., Borelli I., Curtioni E.S., Marcello C., Moroni A., Olivetti E., Richiardi P. Genetic and population structure of four Sardinian villages. *Ann. Hum. Genet.* 1985; 49(1):47-63.
- Rodriguez-Larralde A., Dipierri J., Gomez E.A., Scapoli C., Mamolini E., Salvatorelli G., De Lorenzi S., Carrieri A., Barrai I. Surnames in Bolivia: a study of the population of Bolivia through isonymy. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2011;144(2):177-184. Epub 2010/08/25. DOI 10.1002/ajpa.21379. PubMed PMID: 20740661.
- Scapoli C., Mamolini E., Carrieri A., Rodriguez-Larralde A., Barrai I. Surnames in Western Europe: a comparison of the subcontinental populations through isonymy. *Theor. Popul. Biol.* 2007;71(1):37-48. DOI 10.1016/j.tpb.2006.06.010.
- Solé-Morata N., Bertranpetit J., Comas D., Calafell F. Y-chromosome diversity in Catalan surname samples: insights into surname origin and frequency. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015;23(11):1549-1557. Epub 2015/02/18. DOI 10.1038/ejhg.2015.14.
- Tarskaia L., El'chinova G.I., Scapoli C., Mamolini E., Carrieri A., Rodriguez-Larralde A., Barrai I. Surnames in Siberia: a study of the population of Yakutia through isonymy. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2009;138(2):190-198. DOI 10.1002/ajpa.20918.
- Zei G., Guglielmino C.R., Siri E., Moroni A., Cavalli-Sforza L.L. Surnames as neutral alleles: observations in Sardinia. *Hum. Biol.* 1983; 55(2):357-365.
- Zhabagin M., Balanovska E., Sabitov Z., Kuznetsova M., Agdzhoyan A., Balaganskaya O., Chukhryaeva M., Markina N., Romanov A., Skhalyakho R., Zaporozhchenko V., Saroyants L., Dalimova D., Davletchurin D., Turdikulova S., Yusupov Y., Tachigulova I., Akil-zhanova A., Tyler-Smith C., Balanovsky O. The connection of the genetic, cultural and geographic landscapes of Transoxiana. *Sci. Rep.* 2017;7. DOI 10.1038/s41598-017-03176-z.

ORCID ID

M.K. Zhabagin orcid.org/0000-0003-3414-0610
O.P. Balanovsky orcid.org/0000-0003-4218-6889
Zh.M. Sabitov orcid.org/0000-0001-7186-156X
A.Z. Temirgaliyev orcid.org/0000-0002-6082-9668
A.T. Agdzhoyan orcid.org/0000-0002-8776-2934
S.M. Koshel orcid.org/0000-0002-4540-2922
E.M. Ramankulov orcid.org/0000-0001-6791-4497
E.V. Balanovska orcid.org/0000-0002-3882-8300