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

2018 • 22 • 8

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii

Founded in 1997
Published 8 times annually

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

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

СОДЕРЖАНИЕ • 2018 • 22 • 8

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

CONTENTS • 2018 • 22 • 8

Уважаемые коллеги, дорогие читатели! Предлагаем вашему вниманию последний в уходящем году выпуск «Вавиловского журнала генетики и селекции».

Открывает номер рубрика «Генофонд и селекция животных», которая включает три оригинальных исследования. Первые два подводят итоги многолетних работ по селекции и разведению свиней. Проанализированы система и методы племенной работы в свиноводстве в Российской Федерации, показаны теоретические и экспериментальные основы создания новых пород животных, не уступающих по продуктивности мировому уровню. В последней статье рассмотрены вопросы влияния эколого-климатических условий на спермопродукцию и разнообразие морфологических аномалий половых клеток у быков-производителей различных пород зарубежной селекции и отечественной черно-пестрой породы.

Далее следуют рубрики «Генофонд и селекция растений» и «Селекция растений на иммунитет». Предметом обсуждения нескольких статей стала пшеница. В работе, посвященной изучению адаптивной реакции сортов яровой твердой пшеницы, происходящей из селекционных центров России и Казахстана, результаты интерпретируются с точки зрения поиска перспективных для селекции генотипов и характеристики их адаптивных свойств, связанных с формированием урожайности. В другой статье приведены данные по созданию изогенных линий мягкой пшеницы, содержащих различные аллели *VRN-1* локусов, которые определяют чувствительность к яровизации. В экспериментальной статье представлены результаты исследования генетического разнообразия коллекции сортов мягкой пшеницы различного происхождения к возбудителю пиренофороза – заболеванию, которое быстро прогрессирует в последнее время во всех странах, где возделывается пшеница.

В двух обзорных статьях обсуждаются вопросы производства и селекционного улучшения перспективных для возделывания в Российской Федерации зернобобовых культур, таких как маш и урд, и селекционно-генетические факторы развития стеблевой ржавчины пшеницы. Приведены сведения о расовом составе и методах детекции гриба, результаты разработки молекулярных маркеров для диагностики генов устойчивости к возбудителю болезни.

Рубрика «Медицинская генетика» включает экспериментальное исследование и две обзорные статьи, в одной из которых затронуты вопросы генетической детерминации и патофизиологии низкорениновой артериальной гипертонии. В другой статье на основе анализа экспериментальных данных исследуются механизмы взаимодействия материнского организма с эмбрионами и новорожденными. Роль артериальной гипертензии в развитии аневризмы сосудов головного мозга рассмотрена в оригинальном исследовании. На примере жителей Волго-Уральского региона России авторы установили ассоциации полиморфных вариантов гена из семейства факторов роста эндотелия сосудов с симптомами данного заболевания.

Раздел «Клеточная биология» состоит из четырех статей, три из которых представляют собой экспериментальные исследования. В обзоре освещены проблемы использования современных технологий редактирования геномов при помощи CRISPR/Cas9 в приложении к плюрипотентным клеткам человека. Использование системы CRISPR/Cas9 для редактирования растений на примере ячменя описано в одной из экспериментальных статей данного раздела. Целью другого оригинального исследования является разработка условий для получения индуцированных плюрипотентных клеток фибробластов ластоногих – представителей каноидной (Caniformia) ветви Хищных с консервативными геномами.

В рубрике «Биоинформатика и системная биология» читатель может ознакомиться с литературными данными, описывающими структуру и комплекс генов, регулирующих щетиночный узор на голове и теле имаго *Drosophila melanogaster*. Эффективность современных биоинформатических методов продемонстрирована в работе по созданию базы данных генов, ассоциированных с патогенезом лейкоза у крупного рогатого скота.

Раздел «Физиологическая генетика» включает результаты оригинальных исследований, посвященных изучению функциональной активности нейронов, ответственных за запоминание информации, и влияния физической активности на процессы замещения нейронов, утраченных в процессе жизнедеятельности.

В оригинальном исследовании заключительного раздела «Популяционная генетика» представлены результаты, полученные на модельном объекте *D. melanogaster*, которые моделируют процессы адаптации насекомых на популяционном уровне в ответ на стрессирующее воздействие.

Академик В.К. Шумный

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):912-921
DOI 10.18699/VJ18.433

Пути совершенствования генофонда свиней Российской Федерации

В.А. Бекенёв

Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

Проанализирована система племенной работы в свиноводстве нашей страны. Приведены научные и организационные факторы, определяющие улучшение породных и продуктивных качеств свиней. На основе обобщения многолетних экспериментальных данных, полученных автором в процессе создания новых селекционных достижений, обобщения практики селекционной работы, использования научных результатов мировой науки по генетике и селекции животных разработаны предложения по новой системе оценки, повышения генетического потенциала продуктивности животных. В частности, сделан критический анализ существующей инструкции по бонитировке свиней, линейного разведения, не отвечающего критериям реальности в систематике биологических объектов. Экспериментально обоснован положительный эффект разведения свиней в замкнутом режиме в виде «линии-популяции» с использованием таких генетических маркёров, как эритроцитарные антигены, эритроцитарные ферменты, липопротеины, позволяющих интенсифицировать селекционный процесс. При бонитировке свиней и разработке планов племенной работы со стадом предложено для оценки животных и прогнозирования продуктивности использовать селекционно-генетические параметры: коэффициенты наследуемости, фенотипические и генетические корреляции, селекционный дифференциал, селекционный эффект и др. Разработана система непрерывной балльной оценки каждого селекционируемого признака в отличие от интервальной классной, используемой в нашей стране в настоящее время. Предложена модель селекционного индекса, учитывающая селекционную и экономическую значимость каждого из его компонентов. Показаны теоретические пути и осуществлено экспериментальное доказательство сравнительно быстрого преобразования разводимых в России пород животных до продуктивности мирового уровня, в противовес постоянному импорту племенных животных.

Ключевые слова: свинья; порода; селекция; генофонд; наследуемость; оценка.

Ways to improve the gene pool of pigs of the Russian Federation

V.A. Bekenev

Siberian Federal Scientific Center of Agro-BioTechnologies, RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

An analysis of the system of breeding work in the pig industry of our country has been carried out. The scientific and organizational factors that determine the improvement of breed and productive qualities of pigs have been analyzed. On the basis of many years of experimental data, selection practices obtained in the process of creating new breeding achievements, and using the scientific results of the world science on genetics and animal breeding, proposals have been developed for a new system for assessing and improving the genetic potential of animal productivity based on modern achievements in genetics. In particular, a critical analysis was performed on the existing instructions for boning pigs, linear breeding, which does not meet the criteria of reality in the systematization of biological objects. The positive effect of breeding pigs in a closed mode in the form of a "line-population", using such genetic markers as erythrocyte antigens, erythrocyte enzymes, lipoproteins, allowing intensification of the selection process, has been experimentally proved. When hogging pigs and developing breeding plans with a herd, it was proposed to use such selection and genetic parameters as heritability factors, phenotypic and genetic correlations, selective differential, selective effect, etc. for assessment of animals and prognostication of productivity. A system of continuous scoring of each selectable feature was developed, in contrast to the interval to the classes used in our country at the present time. A model of the selection index, taking into account the selection and economic significance of each of its components, has been proposed. Theoretical paths have been shown towards and experimental proof given to a relatively rapid transformation of breeds of animals bred in Russia to world-class productivity, as opposed to the constant import of breeding animals.

Key words: pig; breed; selection; gene pool; heritability; estimation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Бекенёв В.А. Пути совершенствования генофонда свиней Российской Федерации. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):912-921. DOI 10.18699/VJ18.433

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Bekenev V.A. Ways to improve the gene pool of pigs of the Russian Federation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):912-921. DOI 10.18699/VJ18.433 (in Russian)

Received April 20, 2018
Revised October 23, 2018
Accepted October 29, 2018

e-mail: bekenev@ngs.ru

Одним из главных факторов создания конкурентоспособного производства сельскохозяйственной продукции является улучшение генетического потенциала продуктивности животных и растений. Научные разработки, особенно по генетике и селекции, представляющие собой интеллектуальную собственность, становятся ключевым фактором для инновационного развития сельскохозяйственного производства. Система племенной работы в животноводстве должна быть организована так, чтобы в полной мере использовались современные научные методы селекции животных, инновационные технологии, позволяющие революционизировать сельскохозяйственное производство.

В нашей стране в течение XX в. выведены десятки пород и типов сельскохозяйственных животных разных видов. Первая культурная порода животных в Сибири – сибирская северная порода свиней – была выведена М.О. Симоном (1951), который, вплотную занимаясь свиноводством, оценил трудности акклиматизации крупной белой (английской) породы свиней в Сибири и наряду с акклиматизацией животных этой породы создал новую высокопродуктивную породу – сибирскую северную. Выведением новых пород достигалось не только повышение продуктивности, сохранялись также приспособительные качества животных к природным условиям Сибири, что позволило создать в России твердую племенную основу для дальнейшего совершенствования промышленного животноводства. Однако новые породы, как правило, не превосходили зарубежные по продуктивности и в течение последующей селекции снова отставали от их уровня. В результате наша страна постоянно импортирует животных разных пород из-за рубежа для «прилития крови» или воспроизводительного скрещивания, с целью повышения продуктивности своих пород, и завозит гибридов (птицеводство, свиноводство) для промышленного разведения. Особенно это проявляется в последние годы, когда осуществляется массовый импорт молочного и мясного скота, свиней, птицы. Такое состояние отечественного племенного животноводства может быть обусловлено, с одной стороны, недостаточным вниманием к чистопородному разведению – кропотливому труду, рассчитанному на десятилетия, призванному к совершенствованию генетического потенциала животных, и использованием устаревших теоретических подходов к вопросам селекции, а с другой – организационными факторами.

Организационные факторы по созданию, сохранению и использованию генетических ресурсов животных, выведению новых пород, типов, гибридов определяются Гражданским кодексом РФ (2004). Однако правовая охрана селекционных достижений в стране оказалась крайне недостаточной в отношении как редких пород, так и высокопродуктивных новых типов собственной селекции. Проводится массовый завоз племенных животных из других стран, где главными заказчиками и двигателями селекционного прогресса являются породные ассоциации, которые действуют в содружестве с селекционной наукой, при финансовой поддержке государства. При этом во главе угла находится совершенствование генетического потенциала животных.

Цель настоящей работы заключается в анализе системы племенной работы, научных и организационных факторов, определяющих улучшение породных и продуктивных качеств свиней в нашей стране, и в предложении методов повышения генетического потенциала продуктивности животных, создании новых селекционных достижений на основе многолетних экспериментальных материалов, полученных сотрудниками Сибирского научно-исследовательского и проектно-технологического института животноводства.

Материалы и методы

Работа выполнена на многолетнем материале племенных заводов Сибири в процессе создания трех типов свиней крупной белой породы – «Новосибирского» и «Ачинского» (Бекенёв и др., 1993, 2001а), «Катуньского» (Сахно, Кулигин, 2004), с учетом исследований по оценке ремонтного молодняка, отбору и подбору на основе индексной селекции, оценки производителей по качеству потомства при выведении чистогорской породы (Гришкова и др., 2008, 2015). Использованы материалы оценки племенных качеств свиней нескольких племенных хозяйств Сибири, на основе которых разработаны предложения для новой системы бонитировки животных, включающие коэффициенты наследуемости, селекционные индексы, генетические маркёры, геномную селекцию, а также непрерывную балльную оценку, экономическую значимость признаков и др.

Откормочные и мясные качества молодняка свиней за 4–5 поколений селекции представлены как среднее± стандартная ошибка среднего. Для попарного сравнения использовали критерий Стьюдента. Для всех случаев величина $p < 0.05$ считалась статистически значимой.

Результаты и обсуждение

Главными критериями селекции животных являются отбор и подбор, который проводится на основе комплексной оценки (бонитировка) их племенных и продуктивных качеств по собственной продуктивности и качеству потомства. Нормативным документом для оценки племенных и продуктивных качеств свиней в нашей стране является «Порядок и условия проведения бонитировки племенных свиней» (2009) с внесенными в него изменениями (Приказы Минсельхоза России № 431 от 17.11.2011 и № 540 от 30.10.2015).

При этом племенная ценность каждого животного рассчитывается практически без учета показателей продуктивности его родственников и без определения воздействия окружающей среды, как это предусмотрено, например, системой BLUP, используемой в большинстве стран с развитым животноводством для прогнозирования генетических качеств животных (Henderson, 1975). В системе селекции животных в течение многих лет упор делается на линейное разведение. При этом под линией, как правило, подразумевается группа животных, объединенных одной и той же кличкой родоначальника по мужской стороне родословной. Согласно принятой систематике, в ведущей породе свиней – крупной белой – выделение животных в линии ведут по мужской стороне родословной, а в семей-

Table 1. The fattening and meat qualities of young pigs during 4–5 generations of selection (control fattening)

Evaluation year	Number of estimated animals, boars/progeny	Age of reaching 100 kg live weight, days	Average daily gain, g	Feed expenditure, kg feed units per 1 kg gain	Body length, cm	Back fat thickness at 6–7 dorsal vertebra, mm	Mass of the back third of the half-carcass, kg
1978	16/197	199 ± 2.50	668 ± 10	4.12 ± 0.07	93.5 ± 0.37	33.2 ± 0.56	10.3 ± 0.06
1985	28/352	182 ± 1.49	768 ± 10	3.68 ± 0.06	94.2 ± 0.36	31.6 ± 0.48	10.3 ± 0.07
1986	27/295	186 ± 1.25	746 ± 06	3.90 ± 0.04	94.3 ± 0.21	31.0 ± 0.29	10.7 ± 0.07
1987	28/365	178 ± 1.27	778 ± 11	3.86 ± 0.05	95.2 ± 0.30	30.0 ± 0.32	10.6 ± 0.04
1988	28/368	173 ± 0.94	826 ± 10	3.65 ± 0.04	95.1 ± 0.21	34.3 ± 2.19	10.5 ± 0.04
1989	27/360	168 ± 0.86	855 ± 13	3.60 ± 0.06	95.5 ± 0.28	35.6 ± 0.40	10.4 ± 0.04
1990	20/273	169 ± 1.54	864 ± 12	3.53 ± 0.04	96.3 ± 0.35	31.7 ± 0.05	10.5 ± 0.06
1991	23/284	171 ± 0.80	841 ± 10	3.60 ± 0.04	94.0 ± 0.23	34.3 ± 0.55	10.8 ± 0.11
1992	21/269	172 ± 1.54	859 ± 12	3.64 ± 0.06	93.6 ± 0.18	32.2 ± 0.42	10.2 ± 0.08

ства – по женской. Такой подход используют в племенной работе со стадами различные племенные хозяйства в течение многих поколений: по генеалогическому принципу заносят животных в Госплемкнигу, проводят отбор и подбор, анализируют сочетаемость животных. Между тем система подразделения на линии и семейства, когда животных одного семейства относят к разным линиям, а линия включает животных разных семейств, не отвечает критериям реальности в систематике биологических объектов (Любищев, 1982).

В специально поставленном эксперименте нами проведено сравнение двух ведущих генеалогических линий свиней крупной белой породы (Самсон и Драчун) и трех самых крупных семейств (Волшебница, Гвоздика и Реклама) в двух племенных заводах – «Катунь» Алтайского края и «Большевик» Новосибирской области. Оказалось, что многоплодие, молочность свиноматок, численность поросят и масса гнезда при отъеме практически не зависят от принадлежности к той или иной линии или семейству. Разница между линиями и между семействами в одном и том же стаде оказалась значительно меньше, чем между ними в разных стадах. Отсутствие специфичности этих генеалогических линий подтвердилось и при анализе их по частоте встречаемости эритроцитарных антигенов крови. То есть разные линии оказались более сходными между собой по продуктивности и генотипическим признакам, чем представители одних и тех же линий в разных стадах. Такое представление о линии как о генетически дискретной популяции мешает объективному отбору особей для ремонта стада, поскольку численность лучших животных неодинаково распределена между линиями. Следовательно, лучшая консолидация наследственных качеств в потомстве может быть обеспечена не столько внутрилинейным подбором, сколько подбором по признакам продуктивности или по генетическим маркёрам. Погоня за обязательным сохранением структуры стада по линиям, несмотря на пониженную продуктивность животных в некоторых из них, ведет к уменьшению селекционного дифференциала и снижению селекционного эффекта. Расчеты показывают, что структурной единицей породы должна быть линия-популяция, имеющая численность, достаточную для разведения «в себе», без вынужденного инбридинга в течение трех-четырех поколений, т. е. имеющая 80–100 основных свиноматок. В такой линии-популяции легче отобрать самых лучших особей и тем самым повысить селекционный дифференциал.

Четкое представление понятий о структурных единицах породы позволит интенсифицировать селекционный процесс, усилить эффективность межлинейных и межпородных спариваний в промышленном животноводстве.

Многолетние эксперименты, проведенные нами по селекции свиней крупной белой породы, в которых основной структурной единицей породы была линия-популяция, подтвердили высокую эффективность такой селекции. При этом молодняк для ремонта стада отбирали от лучших по продуктивности (особенно по скороспелости) родителей, невзирая на принадлежность к той или иной генеалогической линии. Подбор пар для спаривания осуществлялся по принципу «лучшее с лучшим дает лучшее», использовавшимся при выведении различных пород выдающимися селекционерами. Гомогенный подбор по генеалогическим линиям носил второстепенный характер, в основном для лучшей ориентировки в стаде. При отборе и подборе учитывали также состав эритроцитарных антигенов, эритроцитарных ферментов, липопротеинов. Работу выполняли по одним и тем же принципам на двух стадах одного и того же племенного хозяйства, причем никакого ввода свиней из одной из фермы в другую и, тем более, из других племенных хозяйств в течение 12 лет не допускалось. То есть осуществлялась селекция в замкнутых изолированных популяциях.

Весь ремонтный молодняк оценивался по собственной продуктивности, хряки и матки – методом контрольного откорма потомства на стандартном комбикорме. Особое внимание уделялось обеспечению животных всеми питательными веществами, особенно протеином, лизином, макро- и микроэлементами, витаминами. Так, из табл. 1 видно, что показатели скороспелости, среднесуточного прироста, оплаты корма значительно улучшились.

Если в начале работы скороспелость молодняка составляла 199 дней, а через 4 года – 182 дня ($p < 0.001$), то через 12 лет, или четыре поколения, этот показатель достиг 169 дней, улучшившись на 30 дней ($p < 0.001$). Среднесуточный прирост животных увеличился почти на

200 г ($p < 0.001$) и составил 864 г, т. е. превзошел практически все стада этой породы в стране и достиг уровня стран с развитым свиноводством. Среднесуточный прирост потомства хряка Самсона 7021 достиг 1018 г, затраты корма – 3.18 корм. ед., а скороспелость потомства хряка Самсона 7295 составила 156.8 дня, что являлось рекордом для племенного завода «Большевик» Новосибирской области. Использование указанных принципов селекции (т. е. традиционных методов, но подбора не по генеалогическим линиям, а по показателям продуктивности, независимо от принадлежности к той или иной генеалогической линии, а отбора – преимущественно по скороспелости) позволило впервые в Сибири создать новое селекционное достижение – тип свиней крупной белой породы «Новосибирский». При этом фактический эффект селекции по скорости роста оказался почти в два раза выше расчетного. Аналогичные результаты получены при разведении свиней в замкнутой цепи и селекции по ограниченному числу продуктивных признаков в Белоруссии (Шейко, 1999). Считаем, что ускорение селекционного процесса произошло в результате быстрой концентрации желательных генов, вызванной систематической оценкой племенных качеств, выявлением лучших генотипов, подбором по принципу «лучшее с лучшим», с минимальным учетом принадлежности к тем или иным генеалогическим линиям.

При создании этого типа свиней широко использовались самые современные методы популяционной и иммуногенетики, что обеспечивалось тесным сотрудничеством с учеными Института цитологии и генетики СО РАН И.Г. Гореловым, В.Н. Тихоновым, Г.В. Орловой, В.И. Ермолаевым, М.А. Савиной, С.В. Никитиным и др.

Животные типа «Новосибирский» всего за 4–5 поколений селекции показали результаты продуктивности мирового уровня. Высокая скороспелость животных этого типа подтверждалась на дважды проводившемся интенсивном откорме на ВВЦ (Москва), где они выходили на первое-третье место среди животных других племенных заводов. Таким образом, на основании теоретических разработок и проведения многочисленных опытов экспериментально доказано сравнительно быстрое преобразование разводимых в России пород животных до продуктивности мирового уровня. Экстерьер свиней крупной белой породы Новосибирского и Ачинского типов представлен на рис. 1 и 2.

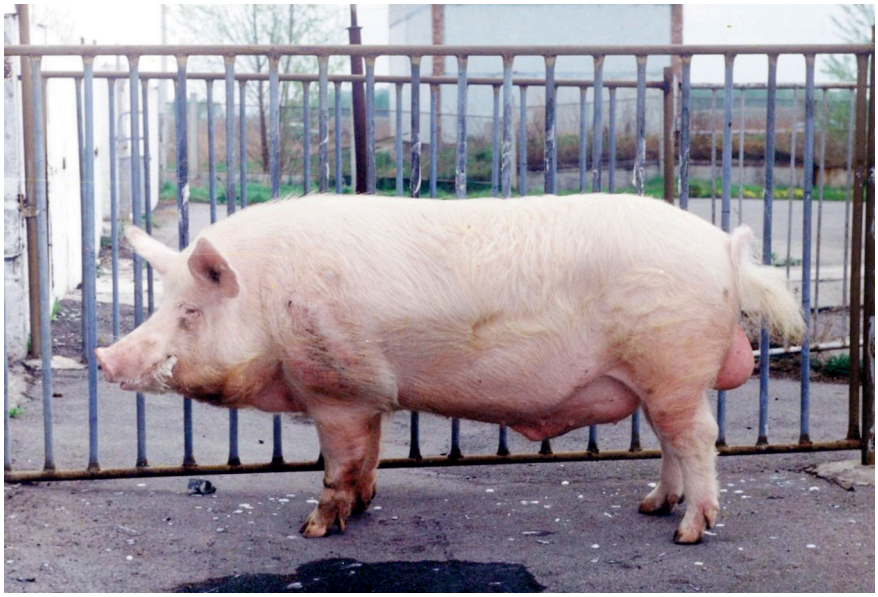


Fig. 1. Novosibirsk type boar of the Large White breed.

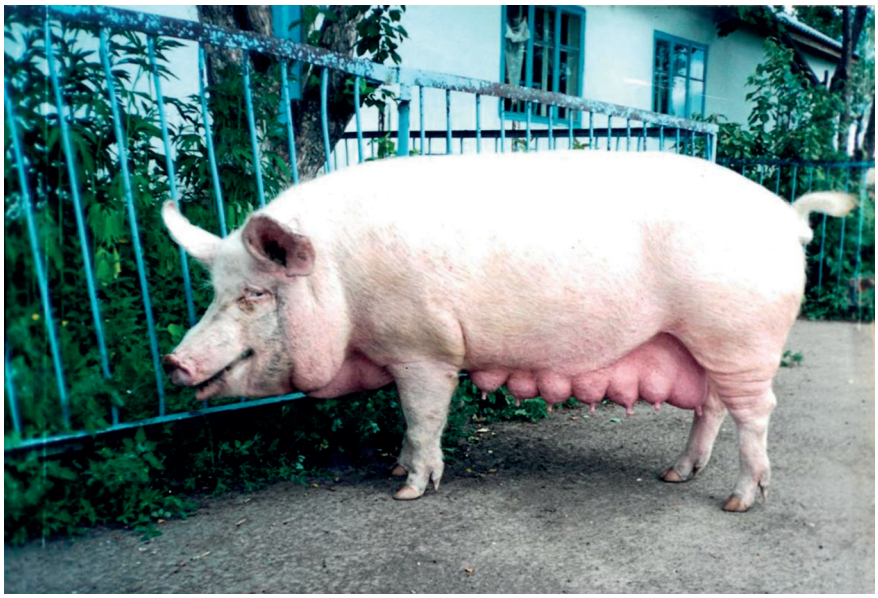


Fig. 2. Sow of the Achinskiy type of the Large White breed.

В настоящее время в ООО «Сапфир» Болотнинского района Новосибирской области на базе указанных типов свиней крупной белой породы, хорошо приспособленных к сибирским условиям и к промышленной технологии, путем использования хряков породы йоркшир канадской селекции созданы новые селекционные группы животных, обладающих лучшим качеством туш, с более тонким слоем подкожного сала (16–17 мм прижизненно).

Успешное использование принципов селекционной работы со стадом, принятых при создании новых типов, позволяет предлагать улучшенные методы бонитировки племенных животных, по-другому составлять планы племенной работы.

В действующей инструкции по бонитировке свиней (2009, 2015 гг.) племенная ценность (суммарный класс) свиноматки определяется по средней величине баллов, сложившихся из признаков собственной продуктивности: возраста достижения живой массы 100 кг (скороспелость), затрат корма на 1 кг прироста, толщины шпика в двух точках, глубины мышцы, длины туловища, экстерьера, многоплодия, количества поросят и массы гнезда в 30-дневном возрасте, и признаков продуктивности всех ее потомков: возраста достижения живой массы 100 кг, толщины шпика в двух точках, глубины мышцы, затрат корма на 1 кг прироста. Всем этим признакам придается одинаковая ценность в пределах 4-балльной шкалы. Однако из приведенных признаков только два – многоплодие и молочность – являются главными для оценки свиноматки. Они в наиболее полной мере характеризуют ее продуктивность. Признаки скороспелости и толщины шпика характеризуют интенсивность роста животного в раннем возрасте, а также его конституциональные особенности, что в дальнейшем может оказать влияние на его воспроизводительные, откормочные и мясные качества. Включение их в селекционный индекс свиноматки следует с меньшим весовым коэффициентом. Остальные признаки являются второстепенными. Наследуемость и экономическая значимость указанных признаков в настоящее время вообще не учитываются. То есть существующая система бонитировки свиней олицетворяет селекцию по комплексу признаков, поэтому оценка животных осуществляется по средней величине 13–15 признаков хряков и маток, а выдающиеся по отдельным показателям продуктивности особи остаются за пределами отобранных, что, естественно, замедляет темпы селекции. Следовательно, система отбора свиней в нашей стране, основанная на неточном определении племенной ценности каждого конкретного животного, может только усреднять признаки стада, породы, но не улучшать их.

Поэтому для получения наибольшего селекционного эффекта необходимо построение селекционного индекса с расчетом весового коэффициента каждого из признаков в общей оценке, который зависит от наследуемости, генетических корреляций и относительной экономической значимости (Hazel, Lush, 1942; Hazel, 1943; Меттлер, Грегг, 1972; Шталь и др., 1973; Гинзбург, Никоро, 1982; Löbke et al., 1986; Mabry et al., 1987). Результатом оценки по индексам является получение наибольшего селекционного эффекта. Использование селекционного индекса позволяет повышать точность оценки племенных качеств на 15–30 % и широко применять современную вычислительную технику (Fritzshe, 1984). При этом в селекционный индекс включают как можно меньше признаков, имеющих между собой слабую коррелятивную связь.

Одни исследователи предлагают селекционные индексы строить отдельно для материнских и отцовских линий (Ладан и др., 1985; Степанов и др., 1985), причем в индексы для отцовских линий включают признаки: скороспелость, затраты корма, мясность, а для материнских – массу гнезда при отъеме. Другие в индекс для линии свиней, специализированной по воспроизводительным качествам, включают такие признаки, как многоплодие, количество просят при отъеме, среднесуточный прирост поросят от рождения до отъема, а в индекс откормочной линии – среднесуточный прирост, толщину шпика и длину туловища (Никитченко, 1987). Третьи используют селекционный индекс, в который включают многоплодие, молочность, возраст достижения массы 104 кг и толщину сала (Schinckel, 1986). В США, например, разработаны специальные тесты и создана программа генетического улучшения племенных качеств свиней с включением экономически важных признаков (Baas et al., 2003).

Простая и наглядная система оценки свиней разработана в Университете штата Вирджиния, США (Wood, 1989). Селекционные индексы для свиней разных половозрастных групп вычислены на основе селекционно-генетических параметров и экономического значения таких признаков, как многоплодие, масса гнезда в 21 день, скороспелость, толщина шпика, конверсия корма. В них учтены показатели экономической значимости селекционируемых признаков.

При выведении типа Новосибирский нами совместно с вычислительным центром Россельхозакадемии разработана модель, аналогичная BLUP, на основе данных первичного зоотехнического учета конкретных стад крупной белой породы из четырех лучших племенных заводов Сибири путем вычисления весовых коэффициентов каждого признака по Д. Фолконеру (1985) и по методике C. Wood (1989). Модель позволяет наиболее точно определять племенную ценность животных с помощью многофакторного регрессионного и дисперсионного анализов, где учтены данные всех возможных родственников, фенотипические и генетические корреляции между селекционными признаками (Бекенёв и др., 2004). Эти исследования показали, что многоплодие и молочность у свиней крупной белой породы никак не коррелируют с живой массой, длиной туловища, экстерьером, поэтому последние не имеет смысла включать в комплексный класс (селекционный индекс). Несколько по-иному надо смотреть на признаки скороспелости и толщины шпика, так как они характеризуют конституциональные особенности и способность животного к росту в раннем возрасте, что в дальнейшем определяет его воспроизводительные качества и влияет на откормочные и мясные характеристики. Эти признаки следует включать в суммарный класс матки, но все же с меньшим весовым коэффициентом, чем многоплодие и молочность. Сделан расчет экономической значимости признаков на основании фактических показателей себестоимости и рыночных цен на свинину в одном из племенных хозяйств и выявлена зависимость величины селекционного индекса от значимости его компонентов. Так, себестоимость поросенка при рождении оказалась равна 80 руб., 1 кг живой массы поросенка при отъеме – 20 руб. Увеличение возраста достижения живой массы 100 кг на один день повышает себестоимость на 5 руб., а увеличение толщины шпика на 1 мм – на 0.3 руб. в расчете на 1 кг живой массы (Бекенёв и др., 2001б). В отличие от интервальной классной оценки племенных качеств свиней, используемой в нашей стране в настоящее время, нами разработана система непрерывной балльной оценки каждого селекционируемого признака (Бекенёв и др., 2010). В нее для свиноматки включены наиболее важные признаки продуктивности: многоплодие, масса гнезда при

Table 2. The scoring scale for numbers of born alive piglets in one farrow

Numbers of born-alive piglets in one farrow	First-farrow sows, score	Sows with two or more farrows, score									
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
18	190	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189
17	180	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179
16	170	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169
15	160	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159
14	150	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149
13	140	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
12	130	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129
11	120	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
10	110	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
9	100	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
8	90	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89
7	80	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
6	70										
5	60										
4	50										
3	40										
2	30										
1	20										

отъеме, возраст достижения живой массы 100 кг и толщина шпика в этом возрасте. Для каждого из признаков разработаны специальные шкалы, в которых показатель продуктивности соответствует определенному баллу. Так, шкала для оценки многоплодия свиноматок выглядит следующим образом (табл. 2).

Свиноматки с многоплодием (с учетом аварийных опоросов) 10 поросят (первоопороски – 9) оцениваются 100 баллами, 11 (10) – 110 баллами, 12 (11) – 120, … 18 (17) – 180 баллами. На рис. 3 показана свиноматка, у которой в первом опоросе родилось 11 поросят. По предложенной шкале она может быть оценена по многоплодию 120 баллами.

Аналогично оцениваются животные по толщине шпика, массе гнезда в 30-дневном возрасте, возрасту достижения живой массы 100 кг. Причем таблицы сделаны с учетом непрерывности за каждый день возраста, каждый миллиметр шпика, каждого поросенка и за каждый килограмм молочности. Чем больше баллов набирает животное, тем выше его ранг не только среди сверстников или стада, но и среди всех стад и пород страны и всего мира.

Fig. 3. First-farrow sow.

При непрерывной балльной оценке легче выявлять животных – лидеров по тому или иному признаку продуктивности, она наиболее точна. Так, например, согласно действующей инструкции по бонитировке, свиноматку с многоплодием 12 поросят относят к одному и тому же классу «элита», что и свиноматку с многоплодием 15 и более поросят, тогда как по предлагаемому методу первая из них получит 120, а вторая – 150 баллов, т. е. значительно более высокую оценку. Хрячков крупной белой породы со скороспелостью (возраст достижения живой массы 100 кг) 160 и 130 дней относят к одному

Table 3. Prediction of back fat thickness improvement in breeding (M = 28.6 mm, σ = 3.0, h^2 = 0.27)

Threshold of selection with regard to back fat thickness, mm	Percentage of selected animals	Back fat thickness in the selected group, mm	Intensity of selection	Selection differential, mm	The response to the selection, mm		Back fat thickness in offspring, mm
					in a generation	in a year	
27.4	0.34	25.4	1.08	3.2	0.87	0.35	27.7
27.9	0.41	25.7	0.95	2.9	0.77	0.30	27.8
28.1	0.44	25.9	0.89	2.7	0.72	0.29	27.9
28.4	0.47	26.0	0.85	2.6	0.69	0.28	27.9
28.6	0.50	26.2	0.80	2.4	0.65	0.26	27.9
29.0	0.55	26.4	0.72	2.2	0.58	0.23	28.0

классу – элите, а по предлагаемому способу первый из них будет иметь по этому признаку 120 баллов, а второй – 140.

В комплексной оценке к каждому из этих показателей вводится весовой коэффициент, рассчитанный в зависимости от генетических особенностей животного и экономических факторов. Для определения суммарного класса свиноматок предлагаем следующую формулу: КО = (2МН + 3М + В + Ш) : 7. Здесь КО – комплексная оценка (суммарный класс), выраженная в баллах; МН – многоплодие; М – молочность; В – возраст достижения живой массы 100 кг; Ш – толщина шпика; 2 и 3 – весовые коэффициенты признаков (Бекенёв и др., 2010). Приведенные весовые коэффициенты предлагаем принять как базовые. Для их более точного расчета следует использовать селекционно-генетические параметры, такие как: фенотипические и генотипические корреляции, коэффициенты наследуемости, а также показатели экономической значимости включенных в индекс признаков, которые для каждого стада могут быть различными (Бекенёв и др., 2004). Методы расчета весовых коэффициентов приведены в разных источниках (Wood, 1989; Степанов, Михайлов, 1996).

Расчеты показали, что в свиноводстве коэффициенты наследуемости для воспроизводительных признаков лучше всего определять методами удвоения коэффициентов корреляции: мать–дочь, для признаков откормочных и мясных качеств – методом дисперсионного анализа двухфакторных иерархических комплексов с привлечением данных полусибсов по отцам.

Предлагаемый способ позволяет проводить объективную и универсальную оценку свиней разных пород и специализации по одним и тем же критериям, по главным, а не второстепенным признакам продуктивности. Так можно ранжировать и сравнивать животных всех пород в стране и во всем мире. Не потребуется для бонитировки разделять животных разных пород по совершенно необоснованным причинам на три категории, как принято у нас в настоящее время. Ответ стада на отбор может быть предсказан при неизменных генетических свойствах популяции. Завоз животных из другого, неродственного стада, например для «прилития крови», которым «грешат» многие зоотехники, якобы для сохранения большей гетерозиготности и получения гетерозиса, сразу нарушает все прогнозы, поскольку разнообразие стада и коэффициент наследуемости (h^2) увеличиваются. Но этот прием может быть использован при значительном уменьшении изменчивости признаков стада, исчерпании резервов наследственной изменчивости. Охват расчетами нескольких стад даже одного типа, в целях увеличения численности и получения статистически достоверных результатов, также не имеет смысла, поскольку селекция в этих стадах ведется неодинаково, в одних стадах животные более однородны, чем в других, а собственники животных имеют разные представления о качестве животных, целях разведения. Для того чтобы расчеты селекционного эффекта работали, что очень важно при составлении планов племенной работы, селекцию следует проводить на большом поголовье, в замкнутой популяции и в течение длительного времени. Это лучше всего осуществлять, когда все племенные животные породы находятся пусть в разных хозяйствах, но под единым контролем, подвергаются селекции в одном направлении. Такая система может лучше всего работать только в одном случае – когда они объединены в единую ассоциацию по породному принципу (Мадисон, 2010). В действующих в настоящее время «Правилах в области племенного животноводства» предусмотрены разнообразные виды организаций по племенному животноводству, но при этом в репродукторах должно быть не менее 100 голов свиноматок. Это значит, что все мелкие, в том числе личные подсобные, хозяйства отсекаются от совершенствования племенного поголовья и вытекающих отсюда последствий. Предлагаемые принципы оценки племенных качеств животных следует использовать и при разработке планов племенной работы со стадом, с породой.

В табл. 3 показан пример расчета селекционного эффекта по толщине шпика, который входил во все планы племенной работы со стадами свиней при создании типа свиней крупной белой породы «Новосибирский».

Расчеты показывают, что при толщине шпика по стаду равной 28.6 мм, коэффициенте наследуемости (h^2) равном 0.27 в племенное ядро для получения ремонтного молодняка следует отбирать хряков и маток с толщиной шпика потомства меньше, чем 27.4 мм (граница отбора), при этом придется использовать треть (0.34) оцененных животных стада. Селекционный дифференциал в этом случае будет равен 3.2 мм, толщина шпика отобранных животных – 25.4 мм, ответ на селекцию за поколение – 0.87 мм, толщина шпика полученного потомства – 27.7 мм, а интенсивность селекции составит 1.08 (Меркурьева, 1970). При границе отбора по толщине шпика, например,

26 мм эффект можно и увеличить, однако животных с толщиной шпика менее 26 мм может не хватить для ремонта собственного стада при естественной случке. При искусственном осеменении численность хряков в стаде значительно сокращается, следовательно, можно повысить и давление отбора. Низкий коэффициент наследуемости толщины шпика в стаде не позволяет осуществлять ускоренную селекцию на понижение этого показателя, поэтому для решения задачи приходится прибегать к скрещиванию с другими породами.

Таким образом, при селекции по ограниченному числу признаков, например только по скороспелости, можно достаточно быстро этот признак улучшить. Однако количество животных стада, одновременно удовлетворяющих критериям (границам отбора), значительно меньше, чем количество животных, удовлетворяющих каждому признаку в отдельности (многоплодие, молочность, затраты корма), так как признаки наследуются независимо друг от друга. При этом вероятность появления в стаде особей, одновременно отвечающих всем параметрам, равна произведению их долей в общем количестве. Например, если отобрать по 33 % животных по скороспелости, 33 % – по многоплодию, 33 % – по молочности, то численность животных, удовлетворяющих всем критериям, составит $1/3 \times 1/3 \times 1/3 = 1/27$, или 3.7 %. Поэтому наиболее эффективна селекция по меньшему числу признаков.

Следовательно, чем выше коэффициенты наследуемости селекционируемых признаков и их селекционные дифференциалы и чем меньше интервалы между поколениями, тем выше селекционный эффект. Увеличение эффективности селекции возможно при уменьшении доли отобранных животных, если таковые с лучшей скороспелостью имеются в стаде и их численность достаточна для воспроизводства. Большую эффективность селекции можно достичь при более высоком коэффициенте наследуемости. Расчет селекционного эффекта не всегда может быть объективным, он зависит от многих факторов, например, от таких, как отрезок времени, за который производился расчет коэффициента наследуемости, величина выборки, система разведения (кроссирование, инбридинг), объединение выборок разных хозяйств, ферм и т. д.

Следует учитывать, что селекция свиней с помощью статистических методов недостаточно эффективна из-за низкой наследуемости признаков, относительно позднего проявления признака, проявления признака только под действием определенных факторов, наличия скрытых носителей нежелательных признаков, болезней и др.

Современный уровень развития науки позволяет управлять селекцией не только через наиболее точную оценку племенной ценности статистическими методами, но и на геномном уровне. Так, в настоящее время особое значение приобретают гены, ответственные за нормальную плодовитость (*ESR* и *PRLR*) и наличие внутримышечного жира (*H-FABP* и *A-FABP*). Учитывая высокую заболеваемость и отход молодняка до 30 % из-за кишечной инфекции, диагностика генов рецепторов *K88AB*, *K88AC*, а также *ECF18R* позволит вести селекцию на устойчивость к антигену К88 кишечной палочки и диарее и целенаправленно создавать популяции свиней, устойчивых к определенным заболеваниям. Имеются гены-кандидаты, связанные с репродуктивными особенностями и характеристиками строения ног свиней, определяющие долговечность свиноматки (Serenius, Stalder, 2006; Sironen et al., 2010). Найдены определенные генетические маркёры, позволяющие улучшать показатели молочной продуктивности свиноматок, которые связаны с репродуктивными качествами и продолжительностью жизни свиноматок. Это липопротеины, альфамакроглобулины, иммуноглобулины, гены, контролирующие жирные кислоты, связанные с белком (*FABP-H* и *FABP-D*), гены рианодинового рецептора (*RYR1*), эстрогенного рецептора (*ESR*), лептина (*LEP*) и др. (Rempel et al., 2010; Onteru et al., 2011; Thekkoot et al., 2016). Революционизирующим становятся поиск и использование в селекции маркёров ядерной и митохондриальной ДНК (микросателлиты и др.) (Flint, Woolliams, 2008).

Можно полагать, что селекционная работа, направленная на увеличение продуктивности, продолжительности жизни и хозяйственного использования животных, будет еще эффективнее при геномной селекции, являющейся развитием маркёрной селекции, при которой используются десятки тысяч генетических маркёров, равномерно покрывающих весь геном. При геномной селекции происходит анализ генома с использованием чипов (матриц) сразу по большому количеству однонуклеотидных маркёров, покрывающих весь геном и связанных с локусами количественных признаков (QTL), что позволяет определять генотипы с желательным проявлением продуктивных признаков, оценивать племенные качества животного. Геномная селекция позволяет расшифровывать генотип свиней уже при рождении и отбирать для разведения лучших животных, что увеличивает точность и надежность оценки племенных свиней, значительно ускоряет селекционный процесс. Во многих странах уже начался новый этап определения племенной ценности животных – по уровню геномного индекса.

Ускорению селекции способствует широкое распространение новейших технологий репродукции, таких как пересадка эмбрионов, обмен племенным материалом между разными странами. При этом необходимо сохранять генетическое разнообразие, особенно пород, находящихся под угрозой исчезновения, поскольку вместе с ними могут быть безвозвратно утеряны генетические структуры, о значении которых мы пока плохо знаем и которые могут быть востребованы в дальнейшем. Подходит время для использования клонирования, а также пересадки генов даже между разными видами, по получению трансгенных животных, что открывает необозримые просторы для преобразования животноводства.

Таким образом, для дальнейшего улучшения генетического потенциала продуктивности свиней в нашей стране необходимо переходить на новые теоретические позиции, основанные на современных достижениях науки. Следует усовершенствовать методы селекции, направив их на широкое использование селекционно-генетических параметров, селекционных индексов, усовершенствованные методы определения племенной ценности, применение маркёрной и геномной селекции.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

Список литературы / References

Бекенёв В.А., Гришина Е.Ф., Фролова В.И., Крючковский А.Г., Мазанова Г.И., Морева З.И., Юдина Г.П. Селекционное достижение в животноводстве – тип свиней крупной белой породы «Новосибирский». Патент № 1032, заявка № 9353386. Заявл. 01.01.1993.
[Bekenev V.A., Grishina E.F., Frolova V.I., Kryuchkovsky A.G., Mazanova G.I., Moreva Z.I., Yudina G.P. Breeding achievement in animal husbandry: the Novosibirsk type of Large White pigs. Patent No. 1032. Application No. 9353386 of 01.01.1993. (in Russian)]

Бекенёв В.А., Башкирова Н.М., Белозерова И.П., Дударев В.А., Мантикова В.Г. Селекционное достижение в животноводстве – тип свиней крупной белой породы «Ачинский». Патент № 1994, заявка № 9811316. Заявл. 17.07.2001. 2001а.
[Bekenev V.A., Bashkirova N.M., Belozerova I.P., Dudarev V.A., Mantikova V.G. Breeding achievement in animal husbandry: the Achinskiy type of Large White pigs. Patent No. 1994. Application No. 9811316 of 17.07.2001. 2001a. (in Russian)]

Бекенёв В.А. Фролова В.И., Афонина Т.Г., Харченко П.Г. Экономические значения селекционируемых признаков в свиноводстве. Современные технологии производства продуктов животноводства в Сибири. Новосибирск: СО РАСХН. СибНИПТИЖ, 2001б;51-57.
[Bekenev V.A., Frolova V.I., Afonina T.G., Kharchenko P.G. Economic values of target traits in pig breeding. In: Modern Technologies for Animal Production in Siberia. Novosibirsk: SibNIPTIZH, 2001b;51-57. (in Russian)]

Бекенёв В.А., Матасова Ю.А., Пыхалов В.С., Чешкова А.Ф., Красноруцкая О.Г., Фролова В.И. Совершенствование популяционно-генетических методов оценки племенных качеств свиней. Современные технологии производства продуктов животноводства. Новосибирск: СО РАСХН. СибНИПТИЖ, 2004;117-129.
[Bekenev V.A., Matasova Yu.A., Pykhalov V.S., Cheshkova A.F., Krasnorutskaya O.G., Frolova V.I. Improving population-genetic methods for assessing the breeding qualities of pigs. In: Modern Technologies for Animal Production in Siberia. Novosibirsk, SibNIPTIZH, 2004;117-129. (in Russian)]

Бекенёв В.А., Фролова В.И., Пильников В.Г., Боцан И.В. Способ оценки племенных качеств свиней. Патент № 2384058, RU. Заявка № 2008117728. Заявл. 04.05.2008. Зарегистр. 20.03.2010.
[Bekenev V.A., Frolova V.I., Pilnikov V.G., Botsan I.V. The way to assess the breeding qualities of pigs. Patent No. 2384058, RU. Application No. 2008117728 of May 4, 2008. Registered on March 20, 2010. (in Russian)]

Гинзбург Э.Х., Никоро З.С. Разложение дисперсии и проблемы селекции. Новосибирск: Наука, 1982.
[Ginzburg E.H., Nikoro Z.S. Variance Decomposition and Breeding Problems. Novosibirsk: Nauka Publ., 1982. (in Russian)]

Гражданский кодекс Российской Федерации. Ч. 4. Новосибирск, 2004;141-158.
[Civil Code of the Russian Federation. Pt. 4. Novosibirsk, 2004;141-158. (in Russian)]

Гришкова А.П., Аришин А.А., Овчинникова Л.А., Гончаренко Г.М. Генотипические особенности свиней мясного направления продуктивности. Современные наукоемкие технологии. 2008; 3:38.
[Grishkova A.P., Arishin A.A., Ovchinnikova L.A., Goncharenko G.M. Genotypic features of meat pigs. Sovremennye Naukoemkie Tehnologii = Modern High Technologies. 2008;3:38. (in Russian)]

Гришкова А.П., Аришин А.А., Чалова Н.А., Волков В.А., Гришков В.А., Третьякова Н.Л. Селекционно-генетические основы промышленной технологии производства свинины. Кемерово: Кузбассвузиздат, 2015.
[Grishkova A.P., Arishin A.A., Chalova N.A., Volkov V.A., Grishkov V.A., Tretyakova N.L. The Breeding and Genetic Basis of the Technology for Industrial Pork Production. Kemerovo: Kuzbassvuzizdat Publ., 2015. (in Russian)]

Ладан П.Е., Коваленко В.А., Степанов В.И. Селекционные приемы и методы, повышающие эффективность племенной работы в специализированных линиях. Теория и методы индивидуального производства свинины. Л.: Агропромиздат, 1985;39-46.
[Ladan P.E., Kovalenko V.A., Stepanov V.I. Breeding techniques and methods that increase the efficiency of breeding in specialized lines. In: Theory and Methods of Individual Production of Pork. Leningrad: Agropromizdat Publ., 1985;39-46. (in Russian)]

Любищев А.А. Проблемы формы, систематики и эволюции организмов. М.: Наука, 1982.
[Lyubishchev A.A. Problems of Form, Systematics, and Evolution of Organisms. Moscow: Nauka Publ., 1982. (in Russian)]

Мадисон В. Отечественное разведение скота: былое и думы. Животноводство России. 2010;10:6-8.
[Madison V. Cattle husbandry in Russia: the past and thoughts. Zhivotnovodstvo Rossii = Livestock Russia. 2010;10:6-8. (in Russian)]

Меркурьева Е.К. Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 1970;393-400.
[Merkurieva E.K. Biometrics in the Breeding and Genetics of Farm Animals. Moscow: Kolos Publ., 1970;393-400. (in Russian)]

Меттлер Л., Грегг Т. Генетика популяций и эволюция. М.: Мир, 1972;15.
[Mettler L., Gregg T. Genetics of Populations and Evolution. New York, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1969. (Russ. ed.: Mettler L., Gregg T. Genetics of Populations and Evolution. Moscow: Mir Publ., 1972;15.)]

Никитченко И.Н. Гетерозис в свиноводстве. Л.: Агропромиздат, 1987.
[Nikitchenko I.N. Heterosis in Pig Breeding. Leningrad: Agropromizdat Publ., 1987. (in Russian)]

Порядок и условия проведения бонитировки племенных свиней. М., 2009.
[The Procedure and Conditions for the Appraisal of Breeding Pigs. Moscow, 2009. (in Russian)]

Приказы Минсельхоза России № 431 от 17.11.2011 г., № 540 от 30.10.2015 г.
[Orders of the Ministry of Agriculture of Russia No. 431 of 17.11.2011, No. 540 of 10.30.2015. (in Russian)]

Сахно Б.Н., Кулигин С.И. Применение селекционных индексов при селекции свиней. Вестн. Алт. гос. аграр. ун-та. 2004;3: 330-331.
[Sakhno B.N., Kuligin S.I. The use of breeding indices in pig breeding. Vestnik Altaiskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agrarian University. 2004; 3:330-331. (in Russian)]

Симон М.О. Сибирская северная порода свиней. Государственная племенная книга свиней сибирской северной породы и сибирской пестрой породной группы. Новосибирск, 1951;1:13-41.
[Simon M.O. Siberian Northern breed of pigs. In: State Herdbook of Pigs of the Siberian Northern Breed and the Siberian Motley Breed Group. Novosibirsk, 1951;1:13-41. (in Russian)]

Степанов В.И., Коваленко В.А., Михайлов Н.В. К вопросу разработки систем селекции свиней методами зависимых уровней браковки. Тез. Всесоюз. науч.-техн. совещ. «Проблемы увеличения производства свинины». М., 1985;15-18.
[Stepanov V.I., Kovalenko V.A., Mikhailov N.V. On the development of pig breeding systems by methods of dependent levels of culling. In: Abstracts of the All-Union Scientific and Technical Meetings “Problems of Increasing Pork Production”. Moscow, 1985;15-18. (in Russian)]

Степанов В.И., Михайлов Н.В. Практикум по свиноводству. М.: Агропромиздат, 1986;153-159.
[Stepanov V.I., Mikhailov N.V. Practical Course on Pig Breeding. Moscow: Agropromizdat Publ., 1986;153-159. (in Russian)]

Фолконер Д.С. Введение в генетику количественных признаков. М.: Агропромиздат, 1985.

[Falconer D.S. Introduction to Quantitative Genetic. New York: Ronald Press Co, 1960. (Russ. ed.: Folkoner D.S. Introduction to Quantitative Genetic. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985.)]

Шейко И. Хозяйственно-биологические особенности свиней при разведении их в замкнутой цепи. Свиноводство. 1999;3:7-10. [Sheyko I. Economic and biological features of pigs bred in a closed circuit. Svinovodstvo = Pig Husbandry. 1999;3:7-10. (in Russian)]

Шталь В., Раш Д., Шилер Р., Вахал Я. Популяционная генетика для животноводов-селекционеров. М.: Колос, 1973. [Stahl V., Rush D., Schieler R., Vakhal J. Population Genetics for Livestock Breeders. Moscow: Kolos Publ., 1973. (in Russian)]

Baas T.J., Goodwin R.N., Christian L.L., Johnson R.K., Robison O.W., Mabry J.W., Clark K., Tokach M., Henry S., Berger P.J. Design and standards for genetic evaluation of swine seedstock populations. J. Anim. Sci. 2003;81:2409-2418.

Flint A.P., Woolliams J.A. Precision animal breeding. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2008;363(1491):573-590.

Fritzshe J. Die Weiterentwicklung des Systems der Bewerting fur zuchtschweine durch Einfuhrung von Selektionsindizes. Tierzucht. 1984;38(3):118-120.

Hazel L.N. The genetic basis for constructing selection indexes. Genetics. 1943;28(9):476-490.

Hazel L.N., Lush I.L. The efficiency of three methods of selection. J. Heredity. 1942;33:393-399.

Henderson C.R. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. Biometrics. 1975;31:423-447. DOI 10.2307/2529430.

Löbke A., Willeke H., Pirchner F. Beziehung zwischen Reproduktionsleistung und Wachstum und Ruckenspeck-dicke. 37 Jahrestagung der EVT. Budapest-Ungarn, 1986;1-4.

Mabry J.W., Harris D., Stewart T. A comparison of RAM and Shortcut BLUP for Estimating Breeding Value using central boar test station data. Record of Pork. 1987;25-32.

Onteru S.K., Fan B., Nikkilä M.T., Garrick D.J., Stalder K.J., Rothschild M.F. Whole-genome association analyses for lifetime reproductive traits in the pig. J. Anim. Sci. 2011;89(4):988-995. DOI 10.2527/jas.2010-3236.

Rempel L.A., Nonneman D.J., Wise T.H., Erkens T., Peelman L.J., Rohrer G.A. Association analyses of candidate single nucleotide polymorphisms on reproductive traits in swine. J. Anim. Sci. 2010; 88(1):1-15. DOI 10.2527/jas.2009-1985.

Schinckel A. Use EBV's improve swine performance. Pigs. 1986; 22(2):26-29.

Serenius T., Stalder K.J. Selection for sow longevity. J. Anim. Sci. 2006;84(Suppl.13):E166-E171.

Sironen A.I., Uimari P., Serenius T., Mote B., Rothschild M., Vilkki J. Effect of polymorphisms in candidate genes on reproduction traits in Finnish pig populations. J. Anim. Sci. 2010;88(3):821-827.

Thekkoot D.M., Young J.M., Rothschild M.F., Dekkers J.C.M. Genomewide association analysis of sow lactation performance traits in lines of Yorkshire pigs divergently selected for residual feed intake during grow–finish phase. J. Anim. Sci. 2016;94(6):2317-2331. DOI 10.2527/jas.2015-0258.

Wood C.M. Guidelines for Inform Swine Improvements Programs. Virginia Polytechnic Institute & State University Blacksburg, 1989.

ORCID ID

V.A. Bekenev orcid.org/0000-0003-4663-2217

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):922-930
DOI 10.18699/VJ18.434

Разведение и селекция мини-свиней ИЦиГ СО РАН

С.В. Никитин[1] ✉, С.П. Князев[2] ✉, К.С. Шатохин[3], В.И. Запорожец[1], В.И. Ермолаев[1]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский государственный аграрный университет, кафедра разведения, кормления и частной зоотехнии, Новосибирск, Россия
[3] Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологии Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

Рассмотрены методы, использованные при разведении и селекции мини-свиней Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН, приведено теоретическое обоснование этих методов и обозначены цели, для которых они применяются. Показана генеалогическая структура стада и вклад инбридинга в генетическое сходство современных представителей генеалогических линий и семейств с родоначальниками селекционной группы. Описано фенотипическое разнообразие мини-свиней ИЦиГ по окраскам, весовым категориям, типам роста и особенностям телосложения. Перечислены меры, поддерживающие генетическое разнообразие в стаде мини-свиней ИЦиГ. Показана возможность использования индексов сходства, рассчитанных по «долям крови» родоначальников, для подбора родительских пар и оценки генетической консолидации стада. При этом средний индекс сходства между самцами и самками, рассчитанный по долям крови родоначальников, у мини-свиней ИЦиГ близок к предельному значению. Указано, что эффективная оценка генетического потенциала мини-свиней по интенсивности роста и конечным размерам особи возможна только при условии обильного и полноценного кормления племенного молодняка. Предложена временная шкала оценки роста живой массы мини-свиней ИЦиГ для трех выделяемых в селекционной группе весовых категорий. Рассмотрены типы роста и развития мини-свиней, наблюдаемые в селекционной группе ИЦиГ, и выделен тип, присущий особям, относящимся к мелкой весовой категории. По данным литературы обоснована минимальная живая масса новорожденного поросёнка в стаде мини-свиней ИЦиГ. Рассчитаны значения оптимального многоплодия для трех весовых категорий свиноматок мини-свиней ИЦиГ.

Ключевые слова: мини-свиньи; разведение; селекция; систематический инбридинг на родоначальников; генетическое разнообразие; индекс сходства; доля крови; потенциал роста; весовая категория; тип роста; масса новорожденного поросёнка; многоплодие.

Breeding and selection of mini-pigs in the ICG SB RAS

S.V. Nikitin[1] ✉, S.P. Knyazev[2] ✉, K.S. Shatokhin[3], V.I. Zaporozhets[1], V.I. Ermolaev[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State Agrarian University, Department of breeding, feeding and partial zootechny, Novosibirsk, Russia
[3] Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

The article considers methods used for breeding and selection of mini-pigs in the ICG, SB RAS, the theoretical justification of these methods and the purposes for which they are used. We showed the genealogical structure of the herd and the contribution of inbreeding to the genetic similarity of modern representatives of genealogical lines and families with the founders of the breeding group. We characterized the phenotypic diversity of the ICG mini-pigs in colours, weight categories, types of growth and features of constitution. We listed measures supporting genetic diversity in the herd of the ICG mini-pigs. We explained the possibility of using similarity indices calculated by using portions of the ancestors' blood (genome) for the selection of parental pairs and the evaluation of genetic consolidation of the herd. We showed that the average index of similarity between males and females, calculated by using portions of the ancestors' blood, in the ICG mini-pigs is close to the limit value. It turned out that effective evaluation of the genetic potential of mini-pigs in growth rate and final size of individuals is only possible under the condition of a rich and full feeding of young animals. The time scale of estimation of growth of live weight of the ICG mini-pigs for three weight categories allocated in the selection group is presented. The types of growth and development of mini-pigs observed in the ICG breeding group and the type inherent to individuals in the small weight category are considered. We justified the minimum live weight of a newborn piglet in the herd of the ICG mini-pigs. Values of optimal multiple pregnancy for the three categories of ICG mini-pig sows were calculated.

Key words: mini-pigs; breeding; selection; inbreeding; genetic diversity; similarity index; thorought-bredness; weight category; weight of a newborn piglets; quantity of piglets in nest.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Никитин С.В., Князев С.П., Шатохин К.С., Запорожец В.И., Ермолаев В.И. Разведение и селекция мини-свиней ИЦиГ СО РАН. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):922-930. DOI 10.18699/VJ18.434

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Nikitin S.V., Knyazev S.P., Shatokhin K.S., Zaporozhets V.I., Ermolaev V.I. Breeding and selection of mini-pigs in the ICG SB RAS. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):922-930. DOI 10.18699/VJ18.434 (in Russian)

Received May 20, 2018
Revised September 5, 2018
Accepted October 5, 2018

✉ e-mail: nsv1956@mail.ru; knyser@rambler.ru; true_genetic@mail.ru

В настоящее время существует ряд селекционных групп лабораторных мини-свиней, живая масса которых варьирует от 30 до 130 кг (Тихонов, 2010; Simianer, Köhn, 2010; Rozkot et al., 2015; Stricker-Krongrad et al., 2016; Станкова и др., 2017). Мини-свиньи образуют весьма разнородную по происхождению, экстерьеру и живой массе совокупность (Стриовски, 2008; Тихонов, 2010), объединяющими факторами которой, кроме малых размеров, являются происхождение каждой группы от небольшого числа особей, малочисленность этих групп и, как следствие, систематический инбридинг на родоначальников. Мини-свиньи Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН – типичные представители данной совокупности. Они происходят от 12 родоначальников и существуют в виде малочисленной группы родственных особей (Nikitin et al., 2014). Верхняя граница живой массы взрослых мини-свиней ИЦиГ составляет для хряков 120 кг, для свиноматок – 70 кг (Nikitin et al., 2014).

Селекция и разведение мини-свиней и продуктивных пород основаны на одних и тех же принципах, но векторы искусственного отбора разнонаправлены. У мини-свиней этот вектор направлен на уменьшение живой массы и линейных размеров взрослых особей (Тихонов, 2010; Simianer, Köhn, 2010; Станкова и др., 2017), у продуктивных пород – на максимизацию интенсивности роста и, соответственно, конечных размеров (Кудрявцев, 1948; Кабанов, 1983; Петухов и др., 2010; Бекенёв, 2012). Вектор искусственного отбора и малочисленность селекционных групп мини-свиней определяют круг задач, которые необходимо решать в процессе селекции и разведения. Настоящая статья посвящена тем решениям, которые были приняты в процессе разведения и селекции мини-свиней ИЦиГ, а также причинам, побудившим к принятию этих решений.

Материал и методы

Селекционная группа мини-свиней ИЦиГ ведет свое происхождение от трех хряков светлогорских мини-свиней, двух хряков ландрасской породы, двух хряков вьетнамской породы и пяти свиноматок крупной белой породы. Численность основного стада мини-свиней ИЦиГ в разные годы составляла от 30 до 40 голов, на 1 января 2018 г. – 34 особи (9 хряков и 25 свиноматок). В стаде присутствуют четыре генеалогические линии хряков, связанных последовательными отношениями отец–сын, и три семейства свиноматок, связанных последовательными отношениями мать–дочь (рис. 1).

Для всех племенных особей мини-свиней ИЦиГ рассчитывают «долю крови» каждого из основателей стада, так как этот показатель отражает количественный вклад аллелофонда родоначальника в аллелофонд потомка – иными словами, генетическое сходство потомка с родоначальником. Вклад инбридинга в формирование генетического сходства потомков с родоначальниками линий и семейств рассчитывали по формуле $ВИ = \frac{Ф - О}{Ф} = \times 100\ \%$, где $ВИ$ – вклад инбридинга; $Ф$ – фактическая доля крови родоначальника (родоначальницы); $О$ – доля крови родоначальника, ожидаемая в отсутствие инбридинга. Фактическую долю крови особи рассчитывали как среднее между долями крови родоначальника у ее родителей; долю крови, ожидаемую при отсутствии инбридинга, рассчитывали по формуле $O = 1/2^n$, где n – порядковый номер генерации.

При подборе родительских пар применяют индекс сходства r, обычно используемый для оценки сходства популяций или других совокупностей по частотам аллелей, генотипов, фенотипов, морф и т. д.: $r = \sum\sqrt{p_i q_i}$, где p_i – частота i-го аллеля в первой совокупности; q_i – частота i-го аллеля во второй совокупности (Животовский, 1991). Однако, как следует из самой формулы, она не специфична для популяционных исследований, а просто количественно оценивает сходство любой пары последовательностей типа $\begin{cases} p_1 + p_2 + p_3 + \ldots + p_n = 1 \\ q_1 + q_2 + q_3 + \ldots + q_h = 1 \end{cases}$ по их частотным характеристикам. Следовательно, приняв, что p_i и q_i – это доли крови i-го родоначальника у первой и, соответственно, второй особи, рассчитываем индекс r, который в данном случае является оценкой их генетического (генеалогического) сходства. Рассчитываемый по долям крови индекс сходства равен нулю для пары особей, не имеющих общих предков, одной второй – для полусибсов и единице – для сибсов. Этот индекс показывает сходство по идентичности происхождения частей аллелофонда у пары особей, но не касается содержания этих частей. Поэтому, несмотря на единый источник происхождения – общего предка, содержание идентичных по происхождению частей аллелофонда у разных особей может быть разным, соответственно генетическое и фенотипическое разнообразие селекционной группы может сохраняться стабильно высоким.

При создании шкалы стандартных значений роста живой массы мини-свиней ИЦиГ использовали формулу $AM_n = \frac{AM_{12}}{OM_{12}} \times OM_n$, где AM_n – масса особи в возрасте n месяцев, кг; AM_{12} – масса годовалой особи, кг; OM_{12} – относительная масса годовалой особи (в %) от массы в возрасте 36 месяцев; OM_n – относительная масса особи в возрасте n месяцев.

Оптимальное многоплодие для мини-свиней ИЦиГ рассчитывали следующим образом. Сначала определили отношение массы помёта при рождении к массе свиноматки у крупных пород, которое составило $LF = \frac{1.25 \times 11}{163} =$ $= 0.084$, где 1.25 – средняя масса новорожденного поросёнка, кг; 11 – среднее многоплодие свиноматки; 163 – средняя масса свиноматки, кг. Затем рассчитали оптимальное многоплодие для мини-свиней ИЦиГ по формуле $LS = \frac{MF \times LF}{0.7}$, где LS – число новорожденных в помёте, MF – масса свиноматки, кг; 0.7 – желательная масса новорожденного поросёнка, кг.

Результаты и обсуждение

Селекция мини-свиней представляет собой комплекс мероприятий, в котором на первом месте должно находиться кормление растущего молодняка. Давно известно, что обильное кормление в молодом возрасте увеличивает размеры и изменяет экстерьер животных, скудное же кормление, напротив, уменьшает размеры и сдвигает экстерьер породных животных в сторону неулучшенной формы (Кулешов, 1947). Мини-свиней оценивают по живой массе

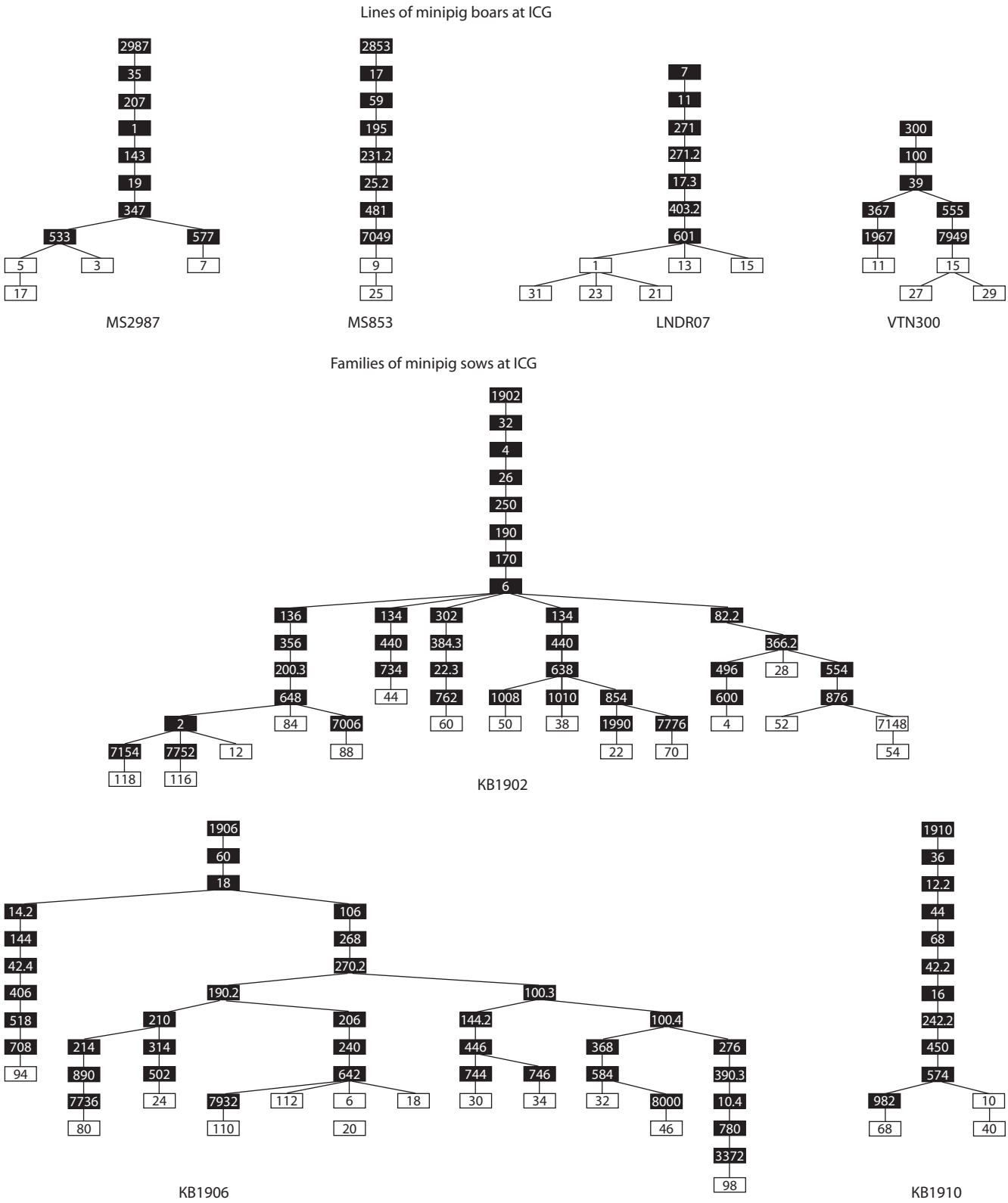


Fig. 1. Genealogical tree of the minipig breeding group of the Institute of Cytology and Genetics.
Discontinued animals are shown in black. In the last rows, one individual of each litter is shown.

(Тихонов, 2010; Станкова и др., 2017), отсюда возникает соблазн, ограничив рацион растущего молодняка, получить мелких животных за минимальное время при минимальных затратах (Bollen et al., 2005). Однако подобная псевдоселекция не позволяет особи реализовать свой, обусловленный генетически потенциал роста, соответственно его невозможно оценить, а раз нет возможности для оценки признака, по которому ведется отбор, о какой,

собственно, селекции может идти речь. Выращенные на скудном рационе животные, будучи внешне мини-свиньями, могут ими не быть генетически, поэтому в питомнике мини-свиней ИЦиГ для оценки потенциала роста животных практикуют кормление растущего молодняка вволю.

Особое внимание при селекции мини-свиней ИЦиГ уделяют сохранению генетического сходства с исходными мелкими формами – светлогорскими мини-свиньями и вьетнамской породой. Генеалогическая структура стада включает две линии (MC2853, MC2987), происходящие от светлогорских мини-хряков, одну (ЛНДР07) – от хряка породы ландрас, одну (BTH300) – от хряка вьетнамской породы и три семейства (КБ1902, КБ1906, КБ1910), происходящие от трех свиноматок крупной белой породы (см. рис. 1).

Генетическое сходство родоначальников стада с их нынешними потомками, в отсутствие родственных скрещиваний, при разделяющем их числе генераций может быть только формальным. Однако численность репродуктивного ядра невелика, как следствие, родственные скрещивания неизбежны, поэтому генетическое сходство потомков с родоначальниками линий и семейств существенно выше, чем это ожидается при отсутствии инбридинга на отдаленных предков (табл. 1).

Как это и предполагалось, расчеты показали превышение фактической доли крови родоначальников над ожидаемой в отсутствие инбридинга. В целом вклад инбридинга, как целенаправленного, так и обусловленного ограниченной численностью селекционной группы, многократно превосходит вклад прямых неинбредных последовательностей отец–сын и мать–дочь (см. табл. 1).

Благодаря плановому инбридингу было сохранено высокое генетическое сходство с родоначальниками линий MC2853 и MC2987. Для этого использовали скрещивания родителей с потомками и скрещивания полусибсов. Плановый инбридинг очень ограниченно и только на начальном этапе применяли при формировании линии BTH300. Связано это с рядом свойственных вьетнамской породе, но нежелательных для лабораторных мини-свиней признаков, таких как склонность к патологическому ожирению, толстая грубая, собирающаяся в складки ороговевшая кожа, провисшая спина, пугливость и материнская агрессия по отношению к человеку. В линии ЛНДР07 и семействах свиноматок КБ1902, КБ1906 и КБ1910, происходящих от свиней крупных европейских заводских пород, плановый инбридинг на родоначальников не использовали.

При подборе родительских пар и для оценки консолидации селекционной группы рассчитывали индексы сходства самцов и самок репродуктивного ядра на основании доли крови родоначальников (табл. 2).

В настоящее время в репродуктивном ядре стада мини-свиней ИЦиГ индекс сходства между самцами и самками по доле крови родоначальников составляет от 0.908 до 1.000 при среднем значении 0.980 ± 0.0011. Последнее близко к предельной для индекса сходства величине (единице), но статистически значимо отличается от нее (критерий Стьюдента – 17.75, при числе степеней свободы 373; $p < 0.001$).

Table 1. Mean shares of ancestry in the ICG minipig herd

Line/ family	Mean share of ancestry		Inbreeding contribution, %
	actual	expected without inbreeding	
MS2987	0.3360	0.0034	98.99
MS2853	0.2238	0.0029	98.70
VTN300	0.1689	0.0234	86.15
LNDP07	0.0410	0.0059	85.61
KB1902	0.0052	0.0002	96.15
KB1906	0.0375	0.0008	97.87
KB1910	0.0706	0.0006	99.15

Несмотря на то что среднее значение индекса сходства близко к единице, в стаде широко представлен полиморфизм по генетическим маркерам (Шатохин и др., 2014а, б), вариантам окраски (Никитин и др., 2016, 2017) и морфологическим признакам (Nikitin et al., 2014; Шатохин и др., 2016). Это обусловлено специальными мерами, к которым относятся:

- относительно большое количество хряков-производителей (не менее двух-трех в каждой из четырех линий);
- поддержание разнообразия морфологических признаков;
- использование разнообразия окрасок как простого визуального индикатора генетического разнообразия.

Близкие к единице значения индекса сходства между самцами и самками в стаде мини-свиней ИЦиГ показывают, что использование в этих оценках доли крови родоначальников стада становится малоэффективным. Однако эта малоэффективность касается только одного из направлений подбора – формирования пар из генеалогически наиболее удаленных особей, но не касается прочих аспектов этого селекционного мероприятия. Использование доли крови родоначальников является, по определению, временной мерой – в закрытой популяции ограниченной численности индекс генеалогического сходства стремится к единице. Поэтому по достижении этой величины просто меняют точку отсчета. Родоначальников стада, которые выполняли роль генерации P_0, заменяют на самцов и самок любой из более поздних генераций, после чего индекс генеалогического сходства будет рассчитываться по долям крови особей, относящихся к новой генерации P_0.

Разнообразие мини-свиней ИЦиГ по вариантам окраски представлено пятью основными мастями, контролируемыми аллелями локусов *KIT*, *MC*1*R* и геном *Spotted*. В выборке 2018 г. из 78 особей 35.90 % имеют черно-пеструю масть, 24.36 % – масть дикого типа, 17.95 % – черную, 15.38 % – чисто-белую и 6.41 % – белую с пятнами. В соответствии с наиболее распространенной моделью детерминации масти свиней (Andersson, Plastow, 2011; Fontanesi, Russo, 2013), локус *KIT* представлен двумя аллелями *I* и *t*, которые формируют три генотипа – *I*/*I*, *I*/*i* и *i*/*i*, а локус *MC*1*R* – тремя аллелями E^D, E^+ и E^P, форми-

Table 2. Similarity indices with regard to the share of ancestry in males and females of the reproduction part of the ICG minipig herd in 2018*

Female No.	Male No.										
	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
4	0.991	0.988	0.988	0.955	0.985	0.997	0.998	0.983	0.993	0.989	0.933
6	0.980	0.980	0.987	0.959	0.990	0.959	0.961	0.979	0.979	0.974	0.908
14	0.975	0.997	0.993	0.958	0.993	0.966	0.971	0.999	0.992	0.995	0.922
20	0.995	0.994	0.999	0.968	0.999	0.984	0.987	0.992	0.996	0.991	0.929
22	0.996	0.996	0.998	0.965	0.997	0.994	0.996	0.993	1.000	0.996	0.934
24	0.986	0.999	0.999	0.965	0.998	0.977	0.981	0.999	0.997	0.996	0.928
26	0.987	1.000	0.999	0.964	0.998	0.981	0.986	0.999	0.998	0.999	0.931
28	0.997	0.975	0.982	0.954	0.982	0.998	0.996	0.967	0.986	0.974	0.925
34	0.993	0.997	0.997	0.963	0.995	0.993	0.995	0.994	0.999	0.997	0.935
36	0.991	0.997	0.999	0.967	1.000	0.981	0.984	0.996	0.997	0.994	0.928
38	0.996	0.995	0.998	0.965	0.997	0.992	0.993	0.992	0.998	0.995	0.932
42	0.985	0.999	0.977	0.964	0.998	0.977	0.980	0.999	0.996	0.998	0.927
44	0.997	0.990	0.968	0.961	0.992	0.997	0.997	0.985	0.996	0.991	0.931
46	0.990	0.999	0.978	0.966	0.999	0.983	0.986	0.999	0.999	0.998	0.931
52	0.993	0.999	1.000	0.967	1.000	0.986	0.989	0.996	0.999	0.996	0.932
54	0.995	0.998	0.976	0.966	0.998	0.991	0.993	0.995	1.000	0.997	0.934
56	0.985	0.999	0.977	0.964	0.998	0.977	0.980	0.999	0.996	0.998	0.927
58	0.991	1.000	0.978	0.966	0.999	0.984	0.988	0.998	0.999	0.998	0.932
66	0.987	0.997	0.973	0.960	0.994	0.986	0.989	0.996	0.997	0.999	0.932
68	0.996	0.985	0.964	0.957	0.988	0.999	0.987	0.980	0.993	0.987	0.930
72	0.987	0.997	0.973	0.960	0.994	0.986	0.989	0.996	0.997	0.999	0.932
76	0.980	0.998	0.975	0.960	0.995	0.982	0.976	0.999	0.994	0.998	0.925
78	0.957	0.993	0.973	0.964	0.996	0.995	0.996	0.988	0.998	0.991	0.933
80	0.982	0.979	0.958	0.996	0.983	0.976	0.978	0.976	0.983	0.977	0.981
82	0.985	0.999	0.975	0.961	0.995	0.982	0.985	0.998	0.997	1.000	0.930
84	0.980	0.998	0.975	0.960	0.995	0.982	0.976	0.999	0.994	0.998	0.925
86	0.962	0.967	0.980	0.998	0.966	0.957	0.960	0.965	0.968	0.965	0.993
92	0.985	0.999	0.975	0.961	0.995	0.982	0.985	0.998	0.997	1.000	0.930
96	0.999	0.990	0.970	0.965	0.995	0.996	0.997	0.986	0.996	0.989	0.932
102	0.999	0.990	0.970	0.965	0.995	0.996	0.997	0.986	0.996	0.989	0.932
104	0.961	0.967	0.946	0.998	0.967	0.956	0.959	0.965	0.968	0.965	0.991
106	0.999	0.990	0.970	0.965	0.995	0.996	0.997	0.986	0.996	0.989	0.932
108	0.930	0.931	0.909	0.989	0.930	0.930	0.934	0.928	0.934	0.930	1.000
124	0.983	0.999	0.976	0.962	0.984	0.975	0.978	0.999	0.995	0.998	0.926

* One individual of each litter is shown.

рующими шесть генотипов – E^D/E^D, E^D/E^+, E^D/E^p, E^+/E^+, E^+/E^p и E^p/E^p (Никитин и др., 2016). Из трех аллелей гена *Spotted* в стаде мини-свиней ИЦиГ выявлены два – *Sp* и *sp*, на что указывает присутствие белых особей без пятен и с пятнами (Nikitin, Lobkov, 1996). В целом только эти три локуса способны формировать 54 генотипа, что очень много при малой численности поголовья мини-свиней ИЦиГ. Однако разнообразие окрасок этим не ограничивается, присутствуют варианты пегостей с разной генетической детерминацией, а также варианты окраски дикого типа и черно-пестрой масти (Шатохин и др., 2013; Nikitin et al., 2014; Никитин и др., 2016, 2017), поэтому разнообразие генотипов может оказаться еще более высоким.

У мелких пород свиней можно выделить два основных типа роста: 1) азиатский тип, присущий коренным породам Юго-Восточной Азии, для которого характерны раннее наступление половой зрелости и раннее окончание роста; 2) европейский тип, свойственный примитивным европейским породам, которые имеют продолжительный период роста при низкой его интенсивности.

Среди мини-свиней ИЦиГ присутствуют особи с признаками как азиатского, так и европейского типов. Особи

Fig. 2. Stud boar No.9 of line MC2853, small weight grade (live weight in the one-year age 15 kg), which combines features of the Asian and European growth and development patterns.

Courtesy of S.P. Knyazev.

Fig. 3. Seven-week piglets. In the front, a boar of the small weight grade, behind, a sow of the medium grade.

Courtesy of S.P. Knyazev.

с выраженным азиатским типом похожи растянутым цилиндрическим туловищем и выпуклой мускулатурой на свиней мясных пород. Особи, близкие к европейскому типу, своим компактным телосложением, высоконогостью, плоским тощим окороком сходны со свиньями примитивных пастбищных пород.

В связи с участившимися случаями рождения мелких особей, сочетающих тугорослость с ранним окончанием развития (рис. 2), в 2014 г. было принято решение о делении мини-свиней ИЦиГ по живой массе свиноматок в возрасте одного года на три весовые категории: мелкие – 25–35 кг или меньше, средние – 35.1–70 кг, крупные – 70.1–90 кг или больше. В настоящее время все весовые категории представлены здоровыми, нормально развитыми, пропорционально сложенными, способными к воспроизводству животными. Интересно отметить, что поросят мелкой категории можно, хотя и не с полной уверенностью, выявить уже в возрасте семи-восьми недель (рис. 3). На начало 2018 г. поголовье свиноматок было представлено 14 особями мелкой категории, 51 особью средней и 4 особями крупной категории. Таким образом, самой многочисленной является наиболее востребованная для медицинских экспериментов средняя весовая категория мини-свиней ИЦиГ. Мини-свиньи двух других категорий используются ограниченно для селекционных и генетических исследований.

Для оценки роста мини-свиней ИЦиГ и отнесения их к той или иной весовой категории были приняты временные стандарты живой массы особей от 2 до 36 месяцев, основой для которых послужили значения, приведенные для свиней второго класса первой группы пород в «Инструкции по бонитировке свиней» от 1976 г. На основании этих величин были построены динамики роста живой массы самок и самцов крупных пород, а затем абсолютные величины переведены в относительные (табл. 3), которые использовали для расчета ожидаемых динамик роста мини-свиней ИЦиГ трех разных весовых категорий (табл. 4).

У домашних свиней присутствует диморфизм по росту живой массы (см. табл. 3). Так как деление мини-свиней ИЦиГ на весовые категории опирается на данные о живой массе самок в возрасте одного года, соответствующие категориям массы годовалых самцов были рассчитаны по отношению массы самок к массе самцов у свиней второго класса первой группы пород в возрасте 12 мес., равному 158 : 148 = 1.068 (см. табл. 3). Далее по динамикам роста относительных значений (см. табл. 3) и граничным значениям живой массы годовалых мини-свиней ИЦиГ разных весовых категорий рассчитали стандартные значения живой массы в килограммах для всех возрастов (см. табл. 4).

Принятые весовые категории мини-свиней ИЦиГ, как и стандарты живой массы, являются временными селекционными ориентирами. В дальнейшем, по мере накопления данных, будут уточняться и корректироваться как шкала стандартных значений роста живой массы, так и границы весовых категорий. Тем не менее эта временная шкала роста живой массы (см. табл. 4) показывает, что до достижения особью двухлетнего возраста возможна только предварительная оценка, окончательную оценку следует проводить после двух лет.

При селекции животных, вне зависимости от того, по какому признаку ведут отбор, необходимо отслеживать изменения жизнеспособности и фертильности (Иогансон и др., 1970), ведь если не из кого будет выбирать, то о каком отборе вообще может идти речь. В связи с этим у мини-свиней ИЦиГ как представителей мелкой формы домашней свиньи селекционную значимость приобрела крупноплодность (масса новорожденного поросёнка). Крупноплодность положительно связана с массой при отъеме и, соответственно, с массой в более зрелом возрасте (Кабанов, 1983), поэтому идея отбирать у мини-свиней на племя самых мелких при рождении поросят некоторым селекционерам кажется весьма привлекательной. Однако крупноплодность положительно связана и с сохранностью поросят в подсосный период. Без создания

Table 3. Live weight growth in pigs of the second grade in the first group of breeds, kg and % of the weight in the age of 36 months, assessed in accordance with the Guideline for pig judgement (1976)

Age, months	Females		Males		Age, months	Females		Males	
	kg	%	kg	%		kg	%	kg	%
2	18	8.00	16	6.40	15	175	77.78	193	77.20
3	30	13.33	26	10.40	16	180	80.00	203	81.20
4	43	19.11	37	14.80	17	185	82.22	210	84.00
5	56	24.89	50	20.00	18	190	84.44	217	86.80
6	72	32.00	64	25.60	19	194	86.22	224	89.60
7	88	39.11	78	31.20	20	198	88.00	229	91.60
8	102	45.33	94	37.60	21	202	89.78	234	93.60
9	116	51.56	108	43.20	22	206	91.56	239	95.60
10	130	57.78	122	48.80	23	210	93.33	242	96.80
11	144	64.00	134	53.60	24	214	95.11	245	98.00
12	158	70.22	148	59.20	30	220	97.78	248	99.20
13	168	74.67	168	67.20	36 and older	225	100.00	250	100.00
14	170	75.56	181	72.40					

Table 4. Standard live weight growth in ICG minipigs

Age, months	Live weight, kg					
	Small		Medium		Large	
	females	males	females	males	females	males
2	2.8–4.0	2.5–3.5	4.01–8.0	3.51–7.1	8.01–10.3	7.11–9.1
3	4.7–6.6	4.1–5.8	6.61–13.3	5.81–11.5	13.31–17.1	11.51–14.8
4	6.8–9.5	5.9–8.2	9.51–19.1	8.21–16.4	19.11–24.5	16.41–21.1
5	8.9–12.4	7.9–11.1	12.41–24.8	11.11–22.2	24.81–31.9	22.21–28.5
6	11.4–15.9	10.1–14.2	15.91–31.9	14.21–28.4	31.91–41.0	28.41–36.5
7	14–19	12–17	19.1–39	17.1–35	39.1–50	35.1–44
8	16–23	15–21	23.1–45	21.1–42	45.1–58	42.1–54
9	18–26	17–24	26.1–51	24.1–48	51.1–66	48.1–62
10	21–29	19–27	29.1–58	27.1–54	58.1–74	54.1–69
11	23–32	21–30	32.1–64	30.1–59	64.1–82	59.1–76
12	25–35	23–33	35.1–70	33.1–66	70.1–90	66.1–84
13	27–37	27–37	37.1–74	37.1–74	74.1–96	74.1–96
14	27–38	29–40	38.1–75	40.1–80	75.1–97	80.1–103
15	28–39	31–43	39.1–78	43.1–86	78.1–100	86.1–110
16	28–40	32–45	40.1–80	45.1–90	80.1–103	90.1–116
17	29–41	33–47	41.1–82	47.1–93	82.1–105	93.1–120
18	30–42	34–48	42.1–84	48.1–96	84.1–108	96.1–124
19	31–43	35–50	43.1–86	50.1–99	86.1–111	99.1–128
20	31–44	36–51	44.1–88	51.1–101	88.1–113	101.1–130
21	32–45	37–52	45.1–89	52.1–104	89.1–115	104.1–133
22	33–46	38–53	46.1–91	53.1–106	91.1–117	106.1–136
23	33–47	38–54	47.1–93	54.1–107	93.1–120	107.1–138
24	34–47	39–54	47.1–95	54.1–109	95.1–122	109.1–140
30	35–49	39–55	49.1–97	55.1–110	97.1–125	110.1–141
36 and older	36–50	40–55	50.1–100	55.1–111	100.1–128	111.1–142

Table 5. Optimum prolificacy in ICG minipig sows of three weight grades

Sow weight on day 5 after farrow, kg	Optimum prolificacy
25–35	3–4
35–70	4–8
70–90	8–11

специальных условий из поросят с массой при рождении менее 600 г до отъема доживает не более 2 % (Кабанов, 1983; Понд, Хаупт, 1983). Так как у мини-свиней возможно моногенное наследование массы новорожденной особи менее 600 г (Никитин, Князев, 2015), отбор по этому признаку может стать эффективным способом снижения ранней постнатальной жизнеспособности. По этой причине у мини-свиней ИЦиГ новорожденные с массой менее 600 г выбраковываются. Средняя масса деловых поросят (особей, переживших первые пять дней после рождения) составляет 777 г, их сохранность в подсосный период равна 85 %.

Избыточное многоплодие может быть причиной низкой сохранности поросят в подсосный период. Если свиноматка, способная выкормить до отъема только пять потомков, родит и будет выкармливать десять, то в лучшем случае к отъему выживет только пять истощенных и отставших в росте поросят, в худшем – погибнут все. Поэтому на основании данных из Инструкции по бонитировке свиней (1976) был произведен расчет оптимального многоплодия для мини-свиней ИЦиГ. Взяв за основу массу свиноматки 163 кг, многоплодие равное 11 потомкам при их средней массе 1.25 кг, рассчитали оптимальное многоплодие для трех весовых категорий свиноматок мини-свиней ИЦиГ при средней массе новорожденного поросёнка 700 г (табл. 5).

При рождении избыточного количества поросят, в соответствии с расчетным значением оптимального многоплодия и состоянием свиноматки, принимается решение о количестве поросят, оставляемых ей для выкармливания.

В целом опыт разведения и селекции мини-свиней ИЦиГ позволяет сформулировать следующие рекомендации:

- для адекватной оценки потенциала роста и развития мини-свиней молодняк должен выращиваться при обильном и полноценном кормлении;
- предварительную оценку размеров и живой массы племенных мини-свиней можно проводить в возрасте года, окончательную – в три года и старше;
- масса новорожденной особи, планируемой для племенного использования, должна быть не менее 600 г;
- многоплодие свиноматок должно соответствовать их живой массе;
- необходим жесткий отбор по материнским качествам;
- желательно поддерживать максимальное фенотипическое разнообразие, так как это позволяет сохранять в стаде разнообразие генетическое;
- для поддержания генетического разнообразия стада следует иметь максимально возможное количество хряков-производителей.

Заключение

В целом можно предположить, что в селекции мини-свиней главную роль играет не столько искусственный отбор, направленный на уменьшение размеров, сколько естественный отбор по приспособленности при отсутствии отбора по максимальной интенсивности роста. Этот естественный отбор направлен на оптимизацию работы адаптивных систем, ликвидацию или минимизацию негативных последствий искусственного отбора и инбридинга и, в конечном счете, на максимизацию приспособленности селекционной группы. Очевидно, в геноме домашних свиней можно условно выделить две связанные с доместикацией части – базовую и «надстройку». Базовая часть первична, она, вероятно, появилась несколько тысяч лет тому назад как ответ на изменение условий существования при одомашнивании и сохранилась до настоящего времени, в явном виде проявляясь у примитивных неприхотливых мелких пород, для которых характерна низкая, мало зависящая от условий кормления и содержания продуктивность (Кудрявцев, 1948; Петухов и др., 2010). Надстройка вторична, она появилась 250–300 лет тому назад как производное от базовой. Для формирования надстройки было необходимо обильное и полноценное кормление, а для ее сохранения – непрерывный искусственный стандартизирующий отбор. Проявлением действия надстройки стали высокопродуктивные формы домашней свиньи, которые зависят от условий внешней среды и искусственного отбора. В ненадлежащих условиях надстройка переходит в состояние нереализованной возможности, а при отсутствии стандартизирующего отбора она разрушается, оставляя после себя только базовую часть доместикационного генома.

При селекции мини-свиней искусственный отбор, направленный на уменьшение размеров, обеспечивает отсутствие отбора по признакам, поддерживаемым надстройкой. В результате происходит ее естественное разрушение и возврат к мелкой форме, детерминируемой базовой частью доместикационного генома. Мини-свиньи – искусственно выведенная мелкая форма, поэтому у них могут сохраняться фрагменты надстройки, и этим они отличаются от своих естественных аналогов – примитивных пород, у которых надстройки не было изначально. Наблюдаемые в стаде мини-свиней ИЦиГ СО РАН весовые категории, а также способность давать при интенсивном кормлении привесы, превышающие привесы примитивных неулучшенных пород (Nikitin et al., 2014), вполне могут быть результатом действия уцелевших фрагментов надстройки.

Acknowledgements

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Бекенёв В.А. Технология содержания и разведения свиней. СПб.: Лань, 2012.
[Bekenev V.A. Technology of Pig Keeping and Breeding. St. Petersburg: Lan Publ., 2012. (in Russian)]

Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991.
[Zhivotovskiy L.A. Populational Biometry. Moscow: Nauka Publ., 1991. (in Russian)]

Инструкция по бонитировке свиней. Главное управление животноводства (с Государственной инспекцией по племенному делу). М.: Колос, 1976.
[Instruction for Appraisal of Pigs. Main Department of Animal Husbandry and the State Inspectorate for Breeding. Moscow: Kolos Publ., 1976. (in Russian)]

Иогансон И., Рендель Я., Граверт О. Генетика и разведение домашних животных. М.: Колос, 1970.
[Iohanson I., Rendel J., Gravert O. Genetics and Breeding of Farm Animals. Moscow: Kolos Publ., 1970. (in Russian)]

Кабанов В.Д. Повышение продуктивности свиней. М.: Колос, 1983.
[Kabanov V.D. Increasing Pig Productivity. Moscow: Kolos Publ., 1983. (in Russian)]

Кудрявцев П.Н. Племенное дело в свиноводстве. М.: ОГИЗ; Сельхозгиз, 1948.
[Kudryavtsev P.N. Breeding Business in Pig Husbandry. Moscow: OGIZ; Selkhozgiz, 1948. (in Russian)]

Кулешов П.Н. Теоретические работы по племенному животноводству. М.: ОГИЗ; Сельхозгиз, 1947.
[Kuleshov P.N. The Theoretical Work on Herdbook Breeding. Moscow: OGIZ; Selkhozgiz, 1947. (in Russian)]

Никитин С.В., Князев С.П. Отбор и адаптация в популяциях домашних свиней. Saarbrucken. Lambert Academy Publishing (LAP), 2015.
[Nikitin S.V., Knyazev S.P. Selection and Adaptation in Domestic Pig Populations. Saarbrucken. Lambert Academy Publ., 2015. (in Russian)]

Никитин С.В., Князев С.П., Шатохин К.С., Гончаренко Г.М., Запорожец В.И., Ермолаев В.И. Ювенильные окраски мини-свиней селекции ИЦиГ СО РАН. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):638-645. DOI 10.18699/VJ17.280.
[Nikitin S.V., Knyazev S.P., Shatokhin K.S., Goncharenko G.M., Zaporozhets V.I., Ermolayev V.I. Juvenile coat colours in mini-pigs at ICG. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):638-645. DOI 10.18699/VJ17.280. (in Russian)]

Никитин С.В., Шатохин К.С., Князев С.П., Гончаренко Г.М., Запорожец В.И., Ермолаев В.И. Полиморфизм локусов масти у мини-свиней. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016; 20(5):584-595. DOI 10.18699/VJ16.180.
[Nikitin S.V., Shatokhin K.S., Knyazev S.P., Goncharenko G.M., Zaporozhets V.I., Ermolayev V.I. Polymorphic loci of coat color in mini-pigs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):584-595. DOI 10.18699/VJ16.180 (in Russian)]

Петухов В.Л., Тихонов В.Н., Желтиков А.И., Короткевич О.С., Камалдинов Е.В., Фридчер А.А. Генофонд и фенофонд сибирской северной породы и сибирской черно-пестрой породной группы свиней. Новосибирск: НГАУ, 2010.
[Petukhov V.L., Tikhonov V.N., Zheltikov A.I., Korotkevich O.S., Kamaldinov E.V., Fridcher A.A. The Gene and Phene Pools of the Siberian Northern Breed and the Siberian Black-and-White Breed Group of Pigs. Novosibirsk: NSAU Publ., 2010. (in Russian)]

Понд У.Дж., Хаупт К.А. Биология свиньи. М.: Колос, 1983.
[Pond W.G., Houpt K.A. The Biology of the Pig. Cornell University Press, Ithaca, New York, 1983. (Russ. ed.: Pond U.Dj., Khoupt K.A. The Biology of the Pig. Moscow: Kolos Publ., 1983.)]

Станкова Н.В., Савина М.А., Капанадзе Г.Д. Формирование новых линий светлогорских мини-свиней. Биомедицина. 2017;3:95-101.
[Stankova N.V., Savina M.A., Kapanadze G.D. The formation of new lines of Svetlogorsk minipigs. Biomeditsina = Biomedicine. 2017;3:95-101. (in Russian)]

Стриовски Э. Мини-пиги (декоративные свинки). Содержание и уход. М.: Аквариум-Принт, 2008.
[Striovski E. MiniPigs (Pet pigs). Maintenance and Care. Moscow: Aquarium-Print Publ., 2008. (in Russian)]

Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свиньи. Генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010.
[Tikhonov V.N. Laboratory Minipigs. Genetics and Biomedical Use. Novosibirsk: SB RAS Publ., 2010. (in Russian)]

Шатохин К.С., Деева В.С., Гончаренко Г.М., Гришина Н.Б., Горячева Т.С., Акулич Е.Г., Кононенко Е.В., Ермолаев В.И., Никитин С.В. Генетические особенности миниатюрных свиней ИЦиГ СО РАН. Вестн. НГАУ. 2014а;30(1):75-81.
[Shatokhin K.S., Deeva V.S., Goncharenko G.M., Grishina N.B., Goryacheva T.S., Akulich E.G., Kononenko E.V., Yermolayev V.I., Nikitin S.V. Genetic features of minipigs from the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk. Vestnik NGAU = Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University. 2014a;30(1):75-81. (in Russian)]

Шатохин К.С., Запорожец В.И., Гончаренко Г.М., Никитин С.В. Характеристика миниатюрных свиней по экстерьерным и поведенческим показателям. Сиб. вестн. с.-х. науки. 2013;4;31-36.
[Shatokhin K.S., Zaporozhets V.I., Goncharenko G.M., Nikitin S.V. Characterization of minipigs with regard to their exterior and behavioral traits. Sibirskiy Vestnik Selskohozyaistvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Science. 2013;4:31-36. (in Russian)]

Шатохин К.С., Князев С.П., Гончаренко Г.М., Никитин С.В. Влияние интродукции аллелей на состояние аллелофонда локусов систем групп крови в популяции миниатюрных свиней ИЦиГ СО РАН. Вестн. НГАУ. 2014б;33(4):119-124.
[Shatokhin K.S., Knyazev S.P., Goncharenko G.M., Nikitin S.V. The effect of allele introduction on the status of the allele pool of blood group system loci in the population of minipigs in the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk. Vestnik NGAU = Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University. 2014b;33(4):119-124. (in Russian)]

Шатохин К.С., Князев С.П., Ермолаев В.И., Гончаренко Г.М., Деева В.С., Запорожец В.И., Орлова К.С., Никитин С.В. Характеристика разнообразия мини-свиней ИЦиГ как биоресурса лабораторных животных. Вестн. НГАУ. 2016;41(4):67-74.
[Shatokhin K.S., Knyazev S.P., Ermolaev V.I., Goncharenko G.M., Deeva V.S., Zaporozhets V.I., Orlova K.S., Nikitin S.V. Biodiversity of ICG minipigs as laboratory bioresources. Vestnik NGAU = Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University. 2016; 41(4):67-74. (in Russian)]

Andersson L., Plastow G. Molecular genetics of coat colour variation. In: Rothschild M.F., Ruvinsky A. (Eds.). The Genetics of the Pig. 2nd ed. CAB International, 2011;38-50.

Bollen P.J.A., Madsen L.W., Meyer O., Ritskes-Hoitinga J. Growth differences of male and female Göttingen minipigs during *ad libitum* feeding: a pilot study. Lab. Anim. 2005;39(1):80-93.

Fontanezi L., Russo V. Molecular genetics of coat colour in pigs. Acta Argiculturae Slovenica, Ljubljana. 2013;4:15-20.

Nikitin S.V., Knyazev S.P., Shatokhin K.S. Miniature pigs of ICG as a model object for morphogenetic research. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2014;4(6):511-522.

Nikitin S.V., Lobkov Yu.I. A lethal allele of gene *Spotted* (grey spots) in pigs. Russ. J. Genet. 1996;32(8):973-977.

Rozkot M., Václavková E., Bělková J. Minipigs as laboratory animals – review. Res. Pig Breeding. 2015;9(2):10-14.

Simianer H., Köhn F. Genetic management of the Göttingen Minipig population. J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 2010;62:221-226.

Stricker-Krongrad A., Shoemake C.R., Pereira M.E., Gad S.C., Brocksmith D., Bouchard G.F. Miniature swine breeds in toxicology and drug safety assessments: what to expect during clinical and pathology evaluations. Toxicol. Pathol. 2016;44(3):421-427.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):931-938
DOI 10.18699/VJ18.435

Влияние породы и генеалогической линии на показатели спермопродукции и разнообразие морфологических форм сперматозоидов у быков-производителей

М.А. Клещев[1] ✉, В.Л. Петухов[2], Л.В. Осадчук[1]

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

В настоящее время значительное внимание уделяется изучению генетической регуляции процессов адаптации сельскохозяйственных животных к условиям окружающей среды. Эта проблема актуальна в связи с широким распространением в различных регионах мира высокопродуктивных пород крупного рогатого скота, созданных в Европе и Северной Америке. Однако до сих пор не изучались изменения в количестве и качестве сперматозоидов быков-производителей пород зарубежной селекции при их адаптации в эколого-климатических условиях Западной Сибири. Цель работы – исследовать особенности качества эякулята и разнообразие морфологических аномалий сперматозоидов у быков-производителей пород зарубежной и отечественной селекции в эколого-климатических условиях юга Западной Сибири. У 44 быков (племпредприятие «Барнаульское», Алтайский край) черно-пестрой, симментальской, англерской и красной датской пород оценивали объем эякулята, концентрацию и общее количество сперматозоидов в эякуляте, долю подвижных и морфологически аномальных половых клеток, определяли встречаемость различных типов аномалий строения сперматозоидов. Установлено, что средние значения концентрации сперматозоидов в эякуляте, доли подвижных и морфологически аномальных сперматозоидов в изученной выборке быков близки к таковым у быков, содержащихся в странах Европы. Межпородных различий по данным показателям не обнаружено. Однако быки группы красных пород (красной датской, англерской) и симментальской породы отличались от быков черно-пестрой породы повышенной встречаемостью аморфных и грушевидных головок сперматозоидов соответственно. При сравнительном анализе показателей качества спермы у быков разных линий черно-пестрой породы установлено, что подвижность сперматозоидов у быков линии Рефлекшн Соверинга 198998 была ниже, чем у быков линии В.Б. Айдиала 1013415. Межлинейных различий по концентрации сперматозоидов в эякуляте, доле морфологически аномальных сперматозоидов, а также встречаемости отдельных типов аномалий сперматозоидов не отмечено. Таким образом, природно-климатические условия юга Западной Сибири не оказывают негативного влияния на продукцию сперматозоидов, а также на содержание подвижных и морфологически нормальных половых клеток в эякуляте у быков. Однако повышенная встречаемость аморфных и грушевидных головок сперматозоидов у быков зарубежной селекции указывает на возможные риски развития у них субфертильности и необходимость исследования фрагментации ДНК сперматозоидов.

Ключевые слова: быки; количество сперматозоидов; подвижность сперматозоидов; морфология сперматозоидов; фертильность; окружающая среда; порода; линия.

Semen quality and diversity of morphological sperm abnormalities in bulls: breed and strain effects

M.A. Kleshchev[1] ✉, V.L. Petukhov[2], L.V. Osadchuk[1]

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

At present great attention is paid to studying genetic regulation of farm animal adaptations to environmental conditions. This problem is very important due to a wide expansion of highly productive cattle breeds created in Europe and North America. However, until the present no investigation of changing semen quality in bulls of imported breeds during their adaptations to environmental conditions of Western Siberia has been conducted. The aim of this study was to investigate semen quality peculiarities and the diversity of morphological sperm abnormalities in bulls of imported and local breeds kept in the environmental conditions of the southern part of Western Siberia. We determined sperm concentration, sperm count, and rate of sperm with progressive motility and percentage of morphologically normal spermatozoa. The rate of sperm abnormalities according to Blome's classification was determined too. It was found that the mean values of sperm concentration, sperm motility and percentage of morphologically normal spermatozoa in the bulls investigated were similar to those in bulls kept in European countries. Inter-breed differences in these parameters were not found. However, bulls of the Red Danish, Angler, and Simmental breeds had a higher percentage of misshapen sperm head and pyriform sperm head than bulls of the Black-White breed. An inter-strain difference in sperm motility in bulls of the Black-White breed was observed. It was found that bulls of Reflection Sovereign 198998 strain had lover sperm motility than bulls of Wis Burke Ideal 1013415 strain. No inter-strain differences in sperm production, percentage of morphologically normal spermatozoa and rate of main sperm abnormalities were found. Thus, it has been found that the environmental conditions of the southern part of Western Siberia do not seriously affect the sperm production, sperm motility or percentage of morphologically normal spermatozoa

Received February 2, 2018
Revised March 27, 2018
Accepted April 5, 2018

✉ e-mail: max82cll@bionet.nsc.ru

in bulls. However, the increased rate of misshapen and pyriform sperm heads in the bulls of the foreign breeds points to a need to study sperm DNA fragmentation.

Key words: bulls; sperm count; sperm motility; sperm morphology; fertility; environment; breed; strain.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Клещев М.А., Петухов В.Л., Осадчук Л.В. Влияние породы и генеалогической линии на показатели спермопродукции и разнообразие морфологических форм сперматозоидов у быков-производителей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):931-938. DOI 10.18699/VJ18.435

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kleshchev M.A., Petukhov V.L., Osadchuk L.V. Semen quality and diversity of morphological sperm abnormalities in bulls: breed and strain effects. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):931-938. DOI 10.18699/VJ18.435 (in Russian)

В настоящее время значительное внимание уделяется изучению механизмов адаптации сельскохозяйственных животных к неблагоприятным условиям окружающей среды в связи с распространением в различных регионах мира с разнообразными эколого-климатическими условиями ограниченного числа высокопродуктивных пород крупного рогатого скота, созданных в Европе и Северной Америке (Canario et al., 2013). Такая адаптация отражается на функционировании всех органов и систем, в том числе и на сперматогенной функции семенников, поскольку сперматогенез является сложным процессом, чувствительным к изменениям окружающей среды и здоровья животного (Omu, 2013). Установлено, что способность животных разных генотипов адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды не одинакова (Porto-Neto et al., 2014). Генетические различия по адаптационной способности животных, вероятно, могут быть одной из причин межпородных различий по количеству производимых сперматозоидов, их подвижности, морфологии (Menon et al., 2011), устойчивости сперматозоидов к криоконсервации (Ntemka et al., 2016), которые наблюдаются у быков производителей.

Изучение животных разных пород, перемещаемых в эколого-климатические условия, отличные от тех, где эти породы формировались, и сравнение их с животными местных пород может быть полезным для понимания генетической регуляции процессов, происходящих при адаптации репродуктивной системы к неблагоприятным условиям. Такие исследования в настоящее время проводятся в тропических и субтропических странах, где тепловой стресс приводит к снижению качества и количества сперматозоидов у быков-производителей (Koivisto et al., 2009; Menegassi et al., 2016).

Для осеменения коров в Сибири, как и во всем мире, широко используется сперма быков высокопродуктивных пород, импортируемых из стран Западной Европы (Ильин, 2012). Однако территория Западной Сибири отличается от территории Европы резко континентальным климатом, для которого характерна холодная продолжительная зима, но жаркое лето, значительные колебания температуры воздуха в течение года и в течение суток. Кроме этого, своеобразие геологического строения Западно-Сибирской равнины, особенности хозяйственного использования территории и техногенное загрязнение окружающей среды оказывают влияние на микроэлементный состав корма и воды. Так, из-за истощения плодородия почв на юге Западной Сибири усиливается дефицит в кормах ряда эссенциальных макро- и микроэлементов, в частности цинка (Сысо, Ильин, 2008), который необходим для формирования и функционирования семенников, стабилизации хроматина сперматозоидов, антиоксидантной защиты половых клеток (Björndahl, Kvist, 2010). Таким образом, климат, недостаток важных микроэлементов и другие неблагоприятные факторы могут оказывать негативное влияние на качество спермы быков, особенно представителей пород зарубежной селекции, которые могут быть слабо адаптированы к местным условиям. Однако изменения в сперматогенных параметрах при адаптации животных европейской селекции в эколого-географических условиях Сибири не получили должного внимания. В настоящее время имеются лишь единичные работы, посвященные исследованию количества и качества сперматозоидов (Четвертакова, 2012; Зенков, Топурия, 2014) у быков пород отечественной селекции и импортных животных, которые позволили установить наличие межпородных и межлинейных различий по сперматогенным параметрам.

При этом значительный теоретический и практический интерес представляет изучение встречаемости различных морфологических аномалий сперматозоидов, поскольку они могут служить относительно простым маркером нарушений спермиогенеза, в том числе в результате влияния неблагоприятных экологических факторов. Нарушения в процессе спермиогенеза приводят не только к изменению формы половых клеток, но и к повышению фрагментации ДНК сперматозоидов, что может обусловливать нарушения в развитии эмбриона (Evenson, 2016). Поэтому исследование морфологических аномалий сперматозоидов важно для прогноза фертильности быков-производителей и дает информацию о возможных причинах ее снижения (Freneau et al., 2010).

Цель работы – изучить спермопродукцию, подвижность сперматозоидов и разнообразие морфологических аномалий половых клеток у быков-производителей различных пород зарубежной селекции и отечественной черно-пестрой породы, проживающих в эколого-климатических условиях Западной Сибири. Дополнительно проводили сравнение двух генеалогических линий (Вис Бис Айдиал 1013415 и Рефлекшн Соверинг 198998) черно-пестрой породы по всем перечисленным выше показателям.

Материалы и методы

Животные. Исследование проводилось в сентябре–октябре 2015 г. в ОАО племпредприятие «Барнаульское» (Алтайский край, г. Барнаул). Было изучено 44 быка-производителя в возрасте от 2 до 10 лет. Животные принадлежали к англерской (n = 6), красной датской (n = 5), симментальской (n = 10) и черно-пестрой (n = 23) породам. Быки черно-пестрой породы относились к приобскому (n = 20) и ленинградскому (n = 3) типам этой породы. При анализе данных близкородственные англерская и красная датская породы были объединены в группу красных пород (n = 11). Изученные животные принадлежали к 13 генеалогическим линиям, крупнейшие из которых – линии Вис Бис Айдиал 1013415 и Рефлекшн Соверинг 198998. Быки поступили на предприятие в возрасте 1–2 лет и прожили там в среднем 4.7 года. Животные были закуплены в Германии (все быки англерской и 3 быка симментальской породы), Дании (красная датская порода), Австрии (7 быков симментальской породы) и на племенных хозяйствах Алтайского края и Ленинградской области (черно-пестрая порода).

Быки находились на стойловом содержании в крытых вентилируемых помещениях, животным предоставлялся ежедневный моцион. Кормление осуществляли комбикормом производства ОАО «Барнаульское» (Ильин, 2012).

Получение и анализ эякулята. От каждого быка получали три эякулята один раз в неделю, которые затем объединяли. Отбор проб эякулята производили в соответствии с ГОСТ 20909.1-75 с использованием искусственной вагины в стерильный пластиковый спермоприемник. Эякулят исследовали в течение 30 мин после получения. Общий объем полученной спермы определяли, взвешивая эякулят на электронных весах ЕК-200I и принимая, что 1 мл эякулята весит 1 г. Далее аликвоту спермы разводили 3 % раствором лимоннокислого натрия в 10 раз. В полученной суспензии определяли суммарную долю прогрессивно подвижных сперматозоидов, используя анализатор фертильности спермы АФС 500-2 (НПФ «Биола», Москва).

Концентрацию сперматозоидов определяли в камере Горяева под световым микроскопом (при увеличении ×200) после окраски аликвоты суспензии сперматозоидов трипановым синим в течение ночи. Полученный результат пересчитывали на 1 мл нативного эякулята.

Для исследования морфологии сперматозоидов аликвоту нативного эякулята разводили фосфатным буфером в 10 раз и делали мазок на предметном стекле. Мазки высушивали на воздухе и фиксировали метанолом в течение 2 мин. Фиксированные и высушенные на воздухе мазки окрашивали красителем Гимзы («Биовитрум», Санкт-Петербург) в соответствии с инструкцией производителя. После окраски препарат заключали в канадский бальзам. Исследовали первые 200 сперматозоидов под световым микроскопом при увеличении ×1 000 с масляной иммерсией. Морфологически нормальным считался сперматозоид, у которого головка, средняя часть и хвост соответствовали определенным критериям (Hopper, King, 2014). Остальные сперматозоиды относили к аномальным.

По месту расположения аномалии сперматозоид относили к одной из следующих групп: аномалии головки, средней части, хвоста, сочетанные аномалии головки и хвоста, головки и средней части, средней части и хвоста, а также сочетанные аномалии головки, средней части и хвоста (тройные). На основании этих данных рассчитывали индекс тератоспермии (TZI), который представляет собой отношение числа выявленных аномалий к числу дефектных сперматозоидов.

По форме и размеру головки, средней части и хвоста сперматозоид относили к одной из 21 группы в соответствии с классификацией Блома (Ball, Peters, 2004). Рассчитывали долю каждого дефекта от общего числа просчитанных сперматозоидов (частота встречаемости). Аномалии, частота встречаемости которых составляла менее 1 %, считались минорными, и данные по ним не представлены.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета компьютерных программ STATISTICA (версия 6.0), проверку на нормальность распределения производили по критерию Колмогорова–Смирнова. Для данных, имеющих нормальное распределение (вес тела, объем спермы, общее количество сперматозоидов, концентрация сперматозоидов в эякуляте, доля подвижных сперматозоидов, доля морфологически аномальных сперматозоидов), проводили однофакторный дисперсионный анализ. Факторами являлись порода (при сравнении пород животных) и линия (при анализе межлинейных различий у быков черно-пестрой породы). Для сравнения групп в рамках дисперсионного анализа использовали тест множественного сравнения Дункана. Для данных, имеющих распределение, отличающееся от нормального, сравнивали группы с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Для всех исследуемых параметров высчитывали среднее арифметическое и его ошибку.

Результаты

Сперматогенные и морфометрические показатели

Однофакторный дисперсионный анализ показал отсутствие генерального влияния породы ($F_{2;\,41} = 2.57$, $p = 0.089$) на вес тела быков (табл. 1). Однако масса тела быков симментальской породы оказалась достоверно выше, чем масса тела быков группы красных пород ($p < 0.05$, тест Дункана).

Однофакторный дисперсионный анализ показал достоверное ($F_{1;\,18} = 13.47$, $p < 0.05$) влияние генеалогической линии на вес тела быков черно-пестрой породы (табл. 2). Потомки В.Б. Айдиала весили достоверно выше, чем потомки Р. Соверинга ($p < 0.01$, тест Дункана).

Не установлено достоверного влияния породы на общий объем эякулята, общее количество сперматозоидов, долю подвижных и долю аномальных сперматозоидов, а также индекс тератоспермии (см. табл. 1). Однако доля аномальных сперматозоидов у быков симментальской породы была выше, чем у быков черно-пестрой породы на уровне тенденции ($p < 0.07$, тест Дункана). По другим показателям качества эякулята достоверных межпородных различий не отмечалось.

Однофакторный дисперсионный анализ позволил установить достоверное влияние линии ($F_{1;\,18} = 8.44$, $p < 0.01$)

Table 1. Body weight and sperm quality in bulls of different breeds

Index	Breeds		
	Black Pied	Simmental	Red breeds
Body weight, kg	930.35 ± 25.65	1011.70 ± 24.01[a]	900.27 ± 40.57
Total ejaculate volume, mL	12.70 ± 0.99	11.60 ± 1.31	11.45 ± 1.49
Total sperm number, bn	12.34 ± 0.93	12.78 ± 1.61	14.1 ± 2.38
Sperm concentration, bn/mL	1.01 ± 0.08	1.10 ± 0.08	1.17 ± 0.12
Progressive sperm motility, %	80.97 ± 1.49	77.93 ± 2.11	75.96 ± 2.90
Total abnormal sperm, %	13.30 ± 1.33	18.20 ± 2.29	16.52 ± 1.18
Teratozoospermia index (TZI)	1.05 ± 0.01	1.05 ± 0.02	1.07 ± 0.02

[a] Differences between the Simmental and red breeds are significant at ($p < 0.05$).

Table 2. Age, body weight, and sperm quality in bulls of different strains

Index	Strains	
	V. B. Eidial	R. Sovering
Age, month	62.38 ± 6.84	47.46 ± 6.30
Body weight, kg	998.78 ± 20.58	842.27 ± 34.58[aa]
Total ejaculate volume, mL	10.33 ± 0.96	13.91 ± 1.75
Total sperm number, bn	10.28 ± 1.26	13.50 ± 1.50
Sperm concentration, bn/mL	1.03 ± 0.16	1.02 ± 0.10
Progressive sperm motility, %	84.56 ± 1.90	76.48 ± 1.96[aa]
Total abnormal sperm, %	12.56 ± 2.32	14.18 ± 2.07
Teratozoospermia index (TZI)	1.05 ± 0.01	1.04 ± 0.02

[aa] Significance of interstrain differences ($p < 0.01$).

на долю прогрессивно подвижных сперматозоидов у быков черно-пестрой породы (см. табл. 2). У потомков В.Б. Айдиала доля подвижных сперматозоидов оказалась достоверно выше ($p < 0.01$, тест Дункана), чем у потомков Р. Соверинга.

Межлинейных различий по объему эякулята, концентрации и общему количеству сперматозоидов в эякуляте, доле аномальных сперматозоидов и индексу тератоспермии не отмечено.

Разнообразие морфологических форм сперматозоидов

Среди аномалий строения половых клеток обследованных быков-производителей преобладали одиночные дефекты головки и хвоста, реже встречались аномалии средней части. Доля сочетанных аномалий в разных частях сперматозоида не превышала одного процента (табл. 3 и 4).

Среди аномалий головки преобладали аморфные головки, относительно часто встречались также головки с грушевидной формой и отдельно лежащие головки (см. табл. 3 и 4). Доля остальных аномалий головки, таких как узкая, коническая, большая, маленькая, вакуолизированная, с аномалиями строения акросомной области, не превышала одного процента (данные не представлены).

Среди дефектов шейки и средней части преобладали склоненная головка (головка с изогнутой средней частью) и асимметричное прикрепление жгутика сперматозоида к головке. Доля остальных аномалий шейки и средней части не превышала одного процента.

Среди аномалий хвоста преобладали сперматозоиды со шпилькообразным хвостом. Остальные аномалии строения хвоста (закрученный и короткий хвост, наличие дистальной цитоплазматической капли) были минорными.

При анализе встречаемости аномалий строения сперматозоидов у быков разных пород (см. табл. 3) установлено, что частота нарушений строения головки сперматозоида у быков симментальской породы была достоверно выше ($p < 0.01$, критерий Манна–Уитни), чем у быков черно-пестрой породы, главным образом за счет грушевидной головки.

Встречаемость грушевидной головки у быков симментальской породы была достоверно выше ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), чем у быков черно-пестрой породы. Быки группы красных пород характеризовались достоверно более высокой ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) встречаемостью аномалий средней части сперматозоида по сравнению с животными симментальской и черно-пестрой пород. Быки красных пород отличались от быков черно-пестрой породы более высокой ($p < 0.01$, критерий Манна–Уитни) встречаемостью сочетанных аномалий средней части и головки, а также тройных аномалий. Кроме того, у быков красных пород аморфная головка сперма-

Table 3. Occurrence (%) of different sperm defects in bulls of different breeds

Defect category	Breeds		
	Black Pied	Simmental	Red breeds
Classification according to location of defects			
Head	4.98 ± 0.56	8.30 ± 0.86[aa]	6.32 ± 0.73
Midpiece	2.45 ± 0.35	1.95 ± 0.47[b]	3.73 ± 0.51[c]
Tail	5.38 ± 0.93	7.10 ± 1.31	5.52 ± 0.82
Multiple anomalies			
Head and midpiece	0.08 ± 0.04	0.35 ± 0.17	0.36 ± 0.09[cc]
Head and tail	0.28 ± 0.08	0.35 ± 0.17	0.32 ± 0.18
Midpiece and tail	0.11 ± 0.05	0.00	0.00
Head, midpiece and tail	0.05 ± 0.03	0.15 ± 0.10	0.27 ± 0.08[cc]
Classification according to shape and size			
Amorphous head	2.12 ± 0.28	3.35 ± 0.66	3.36 ± 0.46[c]
Pyriform head	1.50 ± 0.40	3.35 ± 0.79[a]	1.57 ± 0.57
Detached head	1.58 ± 0.35	2.90 ± 1.16	1.89 ± 0.59
Bent neck	1.42 ± 0.39	1.05 ± 0.28	2.07 ± 0.50
Asymmetrically attached tail	1.34 ± 0.23	1.05 ± 0.50	2.09 ± 0.57
Coiled tail	4.10 ± 0.82	5.00 ± 0.83	3.89 ± 0.74

Notes: Significance of differences [aa] ($p < 0.01$) and [a] ($p < 0.05$) significance of differences between Simmental and Black Pied breeds; [b] between Simmental and red breeds ($p < 0.05$); [cc] ($p < 0.01$) and [c] ($p < 0.05$) between red breeds and Black Pied breed.

тозоида встречалась достоверно чаще ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), чем у быков черно-пестрой породы.

При анализе встречаемости аномалий сперматозоидов у быков разных линий черно-пестрой породы установлено, что у потомков Р. Соверинга сочетанные аномалии средней части и хвоста встречаются чаще ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), чем у потомков В.Б. Айдиала (см. табл. 4). Межлинейных отличий по частоте встречаемости других типов аномалий сперматозоидов (как по форме, так и по месту расположения в сперматозоиде) не отмечено.

Обсуждение

Проведено комплексное исследование основных показателей качества эякулята у импортных быков пород зарубежной селекции, содержащихся в эколого-климатических условиях Западной Сибири несколько лет, и у быков черно-пестрой породы, хорошо адаптированных к местным условиям (Коростелева, Рудишина, 2007). Продукция сперматозоидов, их подвижность и встречаемость аномальных половых клеток у быков, импортированных из Западной Европы, не отличались от таковых у быков черно-пестрой породы. Средние значения всех этих показателей у животных в исследованной выборке оказались близки к таковым у быков, разводимых в европейских странах (табл. 5). Средние значения концентрации сперматозоидов в эякуляте, доли подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов у животных в изученной выборке быков находились в пределах, установленных российским Государственным стандартом (ГОСТ 23745-79) для свежеполученной спермы быков, пригодной для дальнейшего замораживания (см. табл. 5).

Table 4. Occurrence (%) of different sperm defect in bulls of different strains of the Black Pied breed

Index	Strains	
	V. B. Eidial	R. Sovering
Classification according to location of defects		
Head	4.53 ± 0.58	5.30 ± 1.01
Midpiece	2.31 ± 0.58	2.64 ± 0.58
Tail	5.28 ± 1.82	5.75 ± 1.29
Multiple anomalies		
Head and midpiece	0.08 ± 0.06	0.00
Head and tail	0.39 ± 0.14	0.18 ± 0.10
Midpiece and tail	0.00	0.23 ± 0.10[a]
Head, midpiece and tail	0.03 ± 0.03	0.09 ± 0.06
Classification according to shape and size		
Amorphous head	2.28 ± 0.38	1.75 ± 0.36
Pyriform head	1.17 ± 0.25	1.77 ± 0.80
Detached head	0.92 ± 0.27	2.09 ± 0.66
Bent neck	1.36 ± 0.68	1.50 ± 0.62
Asymmetrically attached tail	1.50 ± 0.54	1.34 ± 0.19
Coiled tail	3.44 ± 1.45	4.93 ± 1.24

[a] significance of interstrain differences ($p < 0.05$).

Table 5. Comparison of data on sperm quality in studied bulls with those in bulls from other countries and the Russian Government Standard

Country, reference	Breeds	Sperm concentration, bn/ml	Percentage of sperm, %	
			progressive sperm motility	total normal sperm
Russia, Altai region, our data	Angler, Danish Red, Black Pied, Simmental	1.10 ± 0.05	79.03 ± 1.19	84.78 ± 0.95
Netherlands (Holflack et al., 2007)	Holstein-Friesian	No data	68.9 ± 11.7	79.7 ± 7.0
Sweden (Al-Makxoomi et al., 2009)	Swedish Red	1.25 ± 2.1	71.8 ± 3.0	84.9 ± 10.7
Poland (Hering et al., 2014b)	Holstein-Friesian	1.28 ± 0.01	56.94 ± 0.51	No data
Austria (Fuerst-Waltl et al., 2006)	Simmental	1.2 ± 0.3	66.5 ± 5.3	No data
Russian Government Standard (No. 23745-79)		0.8	70	82

Notes. The data on studied breeds are combined. The data are presented as mean value ± error of the mean.

В других странах при оценке пригодности быков к разведению оценивают долю прогрессивно подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов. Пороговые значения этих показателей различаются в разных странах и колеблются от 30 до 70 % для доли подвижных сперматозоидов и от 70 до 75 % для доли морфологически нормальных сперматозоидов (Ball, Peters, 2004). Таким образом, средние значения качества эякулята у обследованных нами животных пород зарубежной и отечественной селекции соответствуют российским и зарубежным нормам по качеству спермы быков-производителей. Полученные данные говорят о том, что животные зарубежных англерской, красной датской, симментальской пород достаточно быстро адаптируются к эколого-климатическим условиям Западной Сибири и в полной мере реализуют свой наследственный потенциал в отношении качества эякулята.

Однако в результате детального изучения морфологического строения сперматозоидов было установлено, что быки симментальской и красных пород отличаются от животных черно-пестрой породы повышенной встречаемостью отдельных аномалий головки сперматозоида. Быки группы красных пород отличались повышенной встречаемостью аморфных головок сперматозоидов, а животные симментальской породы – грушевидных головок. В соответствии с классификацией Блома, аморфная и грушевидная головка относятся к группе так называемых мажорных аномалий (Ball, Peters, 2004). Присутствие таких сперматозоидов в эякуляте свидетельствует о серьезных нарушениях в сперматогенезе и отрицательно коррелирует с фертильностью животных (Enciso et al., 2011). Это обусловлено тем, что такие сперматозоиды не способны преодолеть женский репродуктивный тракт из-за нарушенной геометрии головки и сниженной подвижности. Кроме того, даже морфологически нормальные сперматозоиды в образце эякулята с повышенным числом мажорных аномалий сперматозоидов, таких как аморфная головка (Saacke, 2008) и дефекты строения акросомной области (Thundathil et al., 2000), обладают сниженной оплодотворяющей способностью. Авторы полагают, что повышение встречаемости подобных аномалий в эякуляте является маркером повышения частоты нарушений упаковки хроматина и целостности ДНК сперматозоидов. Оплодотворение яйцеклетки сперматозоидом с поврежденной ДНК приводит к нарушению развития эмбриона. Поэтому даже небольшое возрастание встречаемости аморфной и грушевидной головки у быков красных пород и симментальской породы может свидетельствовать о риске развития у них субфертильности, несмотря на нормальные значения показателей подвижности и спермопродукции. Полученные данные указывают на необходимость изучения целостности хроматина и фрагментации ДНК сперматозоидов у быков-производителей, используемых на территории Западной Сибири.

В результате сравнительного анализа показателей качества эякулята быков, принадлежащих к двум линиям черно-пестрой породы, установлено, что потомки Р. Соверинга обладали более низкой долей подвижных сперматозоидов, чем потомки В.Б. Айдиала, однако остальные параметры качества спермы, включая встречаемость разных морфологических аномалий сперматозоидов, у этих животных не различались. Причины подобного изолированного снижения подвижности сперматозоидов у быков линии Р. Соверинга неясны. Поскольку быки содержались в племенном хозяйстве в одинаковых условиях и достоверных межлинейных различий по возрасту животных не отмечено, то установленные различия по подвижности сперматозоидов, вероятно, имеют генетическую природу. Движение сперматозоида зависит от согласованной работы значительного количества белков, которые участвуют в обеспечении движущихся сперматозоидов энергией, входят в состав аксонемы и внешней оболочки хвоста сперматозоида, а также являются компонентами сигнальных путей, регулирующих подвижность (Ashrafzadeh et al., 2013). Исследования SNP и полногеномный анализ ассоциаций у быков-производителей позволили установить большое количество генов, мутации в которых могут быть причиной сниженной подвижности

сперматозоидов. К таким генам относятся, например, гены *CatSper*, контролирующие белки катионных каналов сперматозоидов (Sivakumar et al., 2018), ген *MARCH1*, кодирующий убиквитин-лигазу (Liu et al., 2017), которая необходима для нормального протекания спермиогенеза, и др. Полногеномный анализ ассоциаций у голштино-фризских быков в Польше позволил выявить 20 значимых SNP, расположенных на 12 аутосомах и ассоциированных со сниженной подвижностью сперматозоидов (Hering et al., 2014a). Не исключено, что полиморфизмы в этих или каких-либо других генах стали причиной межлинейных различий у быков черно-пестрой породы, однако их идентификация требует дальнейшего изучения.

Таким образом, комплексное исследование качества спермы быков-производителей и сравнение полученных данных с литературными сведениями позволяет предполагать, что природно-климатические условия юга Западной Сибири не оказывают существенного негативного влияния на продукцию сперматозоидов, а также на содержание подвижных и морфологически нормальных половых клеток в эякуляте.

В результате исследования показано влияние генеалогической линии на долю подвижных сперматозоидов у быков-производителей черно-пестрой породы. Межпородных различий по спермопродукции и подвижности сперматозоидов не установлено, но животные симментальской, англерской и красной датской пород отличались от быков черно-пестрой породы повышенной встречаемостью аморфных и грушевидных головок сперматозоидов. Эти аномалии строения сперматозоидов могут быть ассоциированы с повышением фрагментации ДНК в половых клетках. Полученные данные указывают на то, что детальная оценка морфологии сперматозоидов и фрагментации ДНК в половых клетках может быть полезной при рутинной оценке качества эякулята быков-производителей в животноводстве.

Acknowledgements

This study was supported by the Russian Science Foundation, project 15-16-30003.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Зенков П.М., Топурия Л.Ю. Влияние генотипа на показатели спермопродукции быков-производителей. Изв. Оренб. гос. аграр. ун-та. 2014;3:103-105.
[Zenkov P.M., Topuriya L.Y. Effect of genotype on sperm production in sires. Izvestija Orenburgskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Proceedings of the Orenburg State Agrarian University. 2014;3:103-105. (in Russian)]

Ильин В.В. ОАО Племпредприятие «Барнаульское». Новосибирск, 2012.
[Il'in V.V. Breeding Farm Barnaulskoe. Novosibirsk, 2012. (in Russian)]

Коростелева Н.И., Рудишина Н.М. История создания и современное состояние алтайской популяции приобского молочного типа скота черно-пестрой породы. Вестн. Алт. гос. аграр. ун-та. 2007;29(3):30-38.
[Korosteleva N.I., Rudishina N.M. The breeding history modern state of the Altai population of the Black Pied dairy cattle breed in the Ob area. Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University. 2007; 29(3):30-38. (in Russian)]

Сысо А.И., Ильин В.Б. Эколого-агрохимическая оценка содержания микроэлементов в почвах и растительной продукции на юге Западной Сибири. Проблемы агрохимии и экологии. 2008;3: 33-36.
[Syso A.I., Il'in V.B. Ecological and agrochemical assessment of microelement contents of in soils and plant products in southern West Siberia. Problemy Agrokhimii i Ekologii = Issues of Agrochemistry and Ecology. 2008;(3):33-36. (in Russian)]

Четвертакова Е.В. Влияние зимне-весеннего периода года на долю аномальных форм сперматозоидов в нативной и криоконсервированной сперме голштинских быков-спермодоноров. Вестн. Краснояр. гос. аграр. ун-та. 2012;(8):118-122.
[Chetvertakova E.V. Winter-spring season influence on the percentage of aberrant sperm cells in native and cryopreserved sperm of Holstein sperm donors. Vestnik KrasGAU = Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University. 2012;(8):118-122. (in Russian)]

Al-Makhzoomi A., Lundeheim N., Haard M., Rodríguez-Martínez H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. Theriogenology. 2008;70(4):682-691. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.04.049.

Ashrafzadeh A., Karsani S.A., Nathan S. Mammalian sperm fertility related proteins. Int. J. Med. Sci. 2013;10(12):1649-1657. DOI 10.7150/ijms.6395.

Ball P., Peters A.R. Reproduction in cattle. Oxford: Blackwell Publ. Ltd, 2004.

Björndahl L., Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. Mol. Hum. Reprod. 2010;16(1): 23-29. DOI 10.1093/molehr/gap099.

Canario L., Mignon-Grasteau S., Dupont-Nivet M., Phocas F. Genetics of behavioural adaptation of livestock to farming conditions. Animal. 2013;7(3):357-377. DOI 10.1017/S1751731112001978.

Enciso M., Cisale H., Johnston S.D., Sarasa J., Fernández J.L., Gosálvez J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. Theriogenology. 2011;76(1):23-32. DOI 10.1016/j.theriogenology.2010.12.034.

Evenson D.P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. Anim. Reprod. Sci. 2016;169:56-75. DOI 10.1016/j.anireprosci.2016.01.017.

Freneau G.E., Chenoweth P., Ellis R., Rupp G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. Anim. Reprod. Sci. 2010;118(2-4):176-181. DOI 10.1016/j.anireprosci.2009.08.015.

Fuerst-Waltl B., Schwarzenbacher H., Perner C., Sölkner J. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. Anim. Reprod. Sci. 2006; 95(1-2):27-37. DOI 10.1016/j.anireprosci.2005.09.002.

Hering D.M., Olenski K., Kaminski S. Genome-wide association study for poor sperm motility in Holstein-Friesian bulls. Anim. Reprod. Sci. 2014a;146(3-4):89-97. DOI 10.1016/j.anireprosci.2014.01.012.

Hering D.M., Oleński K., Ruść A., Kaminski S. Genome-wide association study for semen volume and total number of sperm in Holstein-Friesian bulls. Anim. Reprod. Sci. 2014b;151(3-4):126-130. DOI 10.1016/j.anireprosci.2014.10.022.

Hoflack G., Opsomer G., Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A., Duchateau L. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian blue and Holstein-Friesian bulls. Reprod. Domest. Anim. 2007;42(2):153-161. DOI 10.1111/j.1439-0531.2006.00745.x.

Hopper R.M., King E.H. Evaluation of breeding soundness: basic examination of the semen. In: Hopper R.M. (Ed.). Bovine Reproduction. Oxford: Wiley-Blackwell, 2014;248-260. DOI 10.1002/9781118833971.

Koivisto M.B., Costa M.T., Perri S.H., Vicente W.R. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the southeastern region of Brazil. Reprod. Domest. Anim. 2009;44(4):587-592. DOI 10.1111/j.1439-0531.2008.01023.x.

Liu S., Yin H., Li C., Qin C., Cai W., Cao M., Zhang S. Genetic effects of *PDGFRB* and *MARCH1* identified in GWAS revealing strong associations with semen production traits in Chinese Holstein bulls. BMC Genet. 2017;18(1):63. DOI 10.1186/s12863-017-0527-1.

Menegassi S.R., Pereira G.R., Bremm C., Koetz C., Jr., Lopes F.G., Fiorentini E.C., McManus C., Dias E.A., da Rocha M.K., Lopes R.B., Barcellos J.O. Effects of ambient air temperature, humidity, and wind speed on seminal traits in Braford and Nellore bulls at the Brazilian Pantanal. Int. J. Biometeorol. 2016;60(11):1787-1794. DOI 10.1007/s00484-016-1167-2.

Menon A.G., Barkema H.W., Wilde R., Kastelic J.P., Thundathil J.C. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. Can. J. Vet. Res. 2011;(4):241-247.

Ntemka A., Tsousis G., Brozos C., Kiossis E., Boscos C.M., Tsakmakidis I.A. Breed differences of bull frozen-thawed semen. Reprod. Domest. Anim. 2016;51(6):945-952. DOI 10.1111/rda.12769.

Omu A.E. Sperm parameters: paradigmatic index of good health and longevity. Med. Princ. Pract. 2013;22(1):30-42. DOI 10.1159/000354208.

Porto-Neto L.R., Reverter A., Prayaga K.C., Chan E.K., Johnston D.J., Hawken R.J., Fordyce G., Garcia J.F., Sonstegard T.S., Bolormaa S., Goddard M.E., Burrow H.M., Henshall J.M., Lehnert S.A., Barendse W. The genetic architecture of climatic adaptation of tropical cattle. PLoS One. 2014;9(11):1-22. DOI 10.1371/journal.pone.0113284.

Saacke R.G. Sperm morphology: its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. Theriogenology. 2008;70(3):473-478. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.04.012.

Sivakumar A., Kumar S., Yathish H.M., Mishra C., Modi R.P., Chaudhary R., Khan S., Sivamani B., Ghosh S.K., Sarkar M. Expression profiling and identification of novel SNPs in *CatSper2* gene and their influence on sperm motility parameters in bovines. Anim. Biotechnol. 2018;29(1):34-40. DOI 10.1080/10495398.2017.1294597.

Thundathil J., Meyer R., Palasz A.T., Barth A.D., Mapletoft R.J. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. Therigenology. 2000;54(6):921-934.

ORCID ID

M.A. Kleshchev orcid.org/0000-0002-7537-2525

L.V. Osadchuk orcid.org/0000-0002-7597-9204

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):939-950
DOI 10.18699/VJ18.436

Величина и стабильность урожайности современного селекционного материала яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) из России и Казахстана

П.Н. Мальчиков[1] ✉, М.А. Розова[2], А.И. Моргунов[3], М.Г. Мясникова[1], Ю.И. Зеленский[4]

[1] Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова, п. г. т. Безенчук, Самарская область, Россия
[2] Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул, Россия
[3] Представительство Международного центра улучшения кукурузы и пшеницы в Центральной Азии и Закавказье (CIMMYT), Анкара, Турция
[4] Представительство Международного центра улучшения кукурузы и пшеницы в Центральной Азии и Закавказье (CIMMYT), Астана, Казахстан

Определение адаптивных реакций селекционного материала, полученного в различных селекционных центрах, позволяет при необходимости целенаправленно корректировать эти свойства. В связи с этим в 2015–2017 гг. были изучены 42 современные селекционные линии твердой пшеницы из восьми учреждений России и Казахстана в сравнении с историческим стандартом – Безенчукской 139 в системе 16-17 и 18 КАСИБ-ЯТП. Полевые эксперименты и учет урожая в каждой экологической точке были организованы по единой схеме. Для решения поставленных задач применялись двухфакторный дисперсионный анализ, методики оценки адаптивности, кластерный анализ и метод главных компонент. В результате исследований установлено: 1) значимое влияние генотипа и генотип-средовых взаимодействий (суммарно 15.8–23.5 % от общей дисперсии) на изменчивость урожайности; 2) генотип-средовые взаимодействия проявили линейный характер и не вносили дестабилизирующего эффекта; 3) все изученные генотипы распределялись по трем кластерам, первый образовали сорта локального значения, третий – широкого ареала, второй объединил генотипы с промежуточными свойствами; 4) селекционные центры ФГБНУ Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий (ФАНЦА) и ФГБНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока преимущественно продуцируют сорта локального значения, Самарский НИИ сельского хозяйства – сорта широкого ареала; 5) устойчивое относительно исторического стандарта Безенчукская 139 преимущество по величине средней урожайности, рассчитанной по данным экологических пунктов, отмечено только для сортов Самарского НИИСХ; 6) сорта всех селекционных учреждений по стабильности и отзывчивости не имеют устойчивых изменений относительно Безенчукской 139, что объясняется незавершенностью селекционного процесса по этим свойствам и подтверждает целесообразность функционирования программы КАСИБ; 7) тренд увеличения урожайности относительно Безенчукской 139 в условиях локального испытания имел более устойчивые тенденции, наибольший прогресс отмечен в Алтайском НИИСХ (135.4 и 163.2 % к Безенчукской 139), что можно объяснить высокой эффективностью селекции по созданию сортов локального значения в этом селекционном центре.

Ключевые слова: твердая пшеница; селекция; урожайность; адаптивность; стабильность; отзывчивость; сорт; селекционная линия; кластер.

Yield performance and stability of modern breeding stock of spring durum wheat (*Triticum durum* Desf.) from Russia and Kazakhstan

P.N. Mal'chikov[1] ✉, M.A. Rozova[2], A.I. Morgunov[3], M.G. Myasnikova[1], Yu.I. Zelensky[4]

[1] Samara Research Institute of Agriculture named after N.M. Tulaikov, Bezenchuk, Samara region, Russia
[2] Federal Altai Scientific Center of Agro-BioTechnologies, Barnaul, Russia
[3] International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Ankara, Turkey
[4] International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Astana, Kazakhstan

Identification of adaptive responses of breeding material, developed in different breeding centers, helps to purposefully correct these traits where it is necessary. Thus, 42 modern breeding lines from eight institutions of Russia and Kazakhstan were studied in comparison with the historical standard Bezenchukskaya 139 in trails of 16-17 and 18 KASIB-SDW (Kazakhstan-Siberian net for wheat improvement, spring durum wheat) in 2015–2017. Field experiments and yield measurements in each ecological cite were similar. To solve these tasks of the experiment, two-factor ANOVA, methods for adaptability assessment cluster analysis and principle component method were applied. As a result, it was established that 1) genotype and genotype – environment interaction (overall 15.8–23.5 % of total dispersion) had significant effect on yield variability; 2) genotype – environment interactions were of linear nature and had no destabilizing effect; 3) all the genotypes tested can be distributed in three clusters, the first one for locally adapted varieties, the third for varieties of a wide areal, the second included genotypes with intermediate characteristics; 4) breeding centers of the Federal Altai Scientific Centre of Agro-Biotechnologies and of the Research Institute of Agriculture of South-East produced predominantly varieties of local importance, the Samara Research Institute of Agriculture – varieties of wide area; 5) a stable trend of increased mean yield compared to historical standard Bezenchukskaya 139 over ecological sites was observed only for Samara varieties; 6) varieties of all the breeding centers had no stable difference from Bezenchukskaya 139 concerning stability and responsive-

Received May 10, 2018
Revised July 2, 2018
Accepted October 17, 2018

✉ e-mail: sagrs-mal@mail.ru

ness, which can be explained by an incomplete breeding process for these parameters and confirms the importance of the KASIB program; 7) a trend of yield increase compared to Bezenchukskaya 139 under testing in definite local environments had more stable parameters with the largest progress observed in the Altai Research Institute of Agriculture (135.4 and 163.2 % to Bezenchukskaya 139), which can be explained by a high efficiency of breeding of locally adapted varieties in the breeding center.

Key words: durum wheat; breeding; yield; adaptability; stability; responsiveness; variety; breeding line; cluster.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Мальчиков П.Н., Розова М.А., Моргунов А.И., Мясникова М.Г., Зеленский Ю.И. Величина и стабильность урожайности современного селекционного материала яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) из России и Казахстана. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):939-950. DOI 10.18699/VJ18.436

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Mal'chikov P.N., Rozova M.A., Morgunov A.I., Myasnikova M.G., Zelensky Yu.I. Yield performance and stability of modern breeding stock of spring durum wheat (*Triticum durum* Desf.) from Russia and Kazakhstan. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):939-950. DOI 10.18699/VJ18.436

Решение проблемы повышения уровня и стабильности урожайности в процессе селекции сопряжено с преодолением ряда ограничений, возникающих в связи селекционным улучшением двух генетических систем одновременно – отзывчивости на благоприятные условия и устойчивости к стрессовым факторам. Установлено, что стабильность урожайности определяется устойчивостью к стрессам разной этиологии и характерна для сортов широкого ареала. Сорта, адаптированные к конкретным условиям среды, в том числе и к высокопродуктивным, как правило, узкоспециализированы, имеют локальное значение (Tollenaar, Lee, 2002; Duvick et al., 2004). В селекционной практике эти два направления реализуются в зависимости от широты предполагаемого ареала распространения создаваемых сортов. При этом необходимо учитывать, что варьирование урожайности генотипов по средам во многом определяется взаимодействием генотип–среда (GE). С одной стороны, селекционер должен стремиться к снижению величины GE и увеличению эффектов генотипа, обеспечивающих устойчивое формирование признака в разных средах. С другой стороны, GE открывает возможности отбора генотипов, адаптированных к определенному месту и преобладающим условиям окружающей среды этого места (эксплуатация конкретных адаптаций) (Lin, Binns, 1991; Ceccarelli, 1996). Тем не менее в большинстве экологических регионов селекционеры нацелены на разработку сортов с устойчивой урожайностью и широкой адаптацией к разнообразным условиям среды (Lin, Binns, 1988; Evans, 1993), что преимущественно связано с широкой амплитудой вариации климатических факторов по годам. Идеальный генотип должен хорошо работать как в течение многих лет в одном месте (определенных средовых условиях), так и в широком диапазоне сред, формируемых внешними условиями в разных местностях (Romagosa, Fox, 1993).

Предположение о том, что современные сорта пшеницы более восприимчивы к изменениям окружающей среды, чем ландрасы и сорта предшествующих этапов селекции, высказывалось неоднократно (Батыгин, 1995; Calderini, Slafer, 1998; Fufa et al., 2005). В то же время в ряде публикаций приведены данные, показывающие превалирование вектора засухоустойчивости в процессе создания высокопродуктивных сортов (Кумаков, 1985; Васильчук, 2001). В работе (De Vita et al., 2010) представлены результаты изучения 65 генотипов твердой пшеницы разных периодов использования (ландрасы, старые селекционные и новые сорта различных этапов выпуска и перспективные селекционные линии) в ряде сред на территории Италии, где показано, что стратегия селекции, принятая в течение последних десятилетий, привела к уменьшению эффектов взаимодействия генотип–среда и отбору генотипов с лучшей стабильностью в широком диапазоне сред. Некоторые современные генотипы превосходят по урожаю старые сорта во всех тестовых средах, где в соответствии с концепцией «биологической» или «статической» стабильности необходимо развитие свойств как сильной приспособляемости к стрессовым факторам, так и повышенной отзывчивости на благоприятные условия среды. S. Rajaram (2003) приводит убедительные данные о возможности создания высокоурожайных сортов, адаптированных к стрессовым факторам, подтвержденные другими исследованиями CIMMYT (Braun et al., 1996; Crossa et al., 2014).

В России и Казахстане селекция яровой твердой пшеницы прошла несколько этапов. В настоящее время состояние сортового разнообразия в районировании по регионам отчетливо демонстрирует превалирование сортов, созданных региональными селекционными учреждениями. В связи с этим правомерно предположение о доминировании в современном селекционном процессе адаптивных свойств локального значения. Вместе с тем в предшествующие периоды селекции наблюдалось распространение сортов монополистов (Мелянопус 69, Харьковская 46, Безенчукская 139), т. е. сортов с высоким уровнем стабильности урожайности в широком диапазоне средовых условий. Понимание динамики адаптивных реакций сортов твердой пшеницы в процессе их создания в различных селекционных центрах позволяет при необходимости целенаправленно корректировать эти свойства. Для экспериментального решения задачи по определению эволюционных тенденций адаптивности в различных регионах за определенный период селекции необходимо иметь общую «точку отсчета» не только во времени, но и в биологическом смысле. В этом случае необходим сорт,

который является историческим сортом для всех регионов и может выполнять функции общего стандарта. В качестве такого сорта целесообразно использовать Безенчукскую 139. Этот сорт в 80-х годах XX века был широко районирован от Поволжья до Казахстана и Сибири, т. е. в регулярных сортоиспытаниях стабильно превышал по урожайности зерна стандартные сорта в этих регионах. Очевидно, что в тот период сорт Безенчукская 139 можно было классифицировать как сорт широкого ареала.

Цель исследований заключалась в том, чтобы на основе данных эколого-географических испытаний генотипов (современных селекционных линий) твердой пшеницы научных учреждений КАСИБ (Казахстанско-Сибирская сеть по улучшению яровой пшеницы) дифференцировать селекционный материал по параметрам адаптивности, стабильности и селекционной ценности по урожайности зерна и определить эволюционные изменения по этим параметрам в генофонде различных селекционных центров относительно исторического сорта Безенчукская 139.

Материалы и методы

Объектами исследований были сорта яровой твердой пшеницы 16-17 и 18 КАСИБ-ЯТП, поступившие от учреждений-соисполнителей. Цикл 16-17 КАСИБ (выполнен в 2015–2016 гг.) включал 22 селекционные линии и сорта: Каргала 66, Каргала 1412, Каргала 1514 (Актюбинская СХОС, г. Актюбинск), Шарифа, Гордеиформе 950/99 (Карабалыкская СХОС, пос. Карабалык), Лавина, Дамсинская юбилейная, Шортандинская 256 (НПЦЗХ, г. Шортанды), Гордеиформе 18567-6, Гордеиформе 18585-2 (Казахский НИИ земледелия и растениеводства, пос. Алмалыбак), Гордеиформе 719, Гордеиформе 723, Гордеиформе 748 (ФГБНУ ФАНЦА, г. Барнаул), Гордеиформе 00-178-4, Гордеиформе 01-115-5, Гордеиформе 03-20-18 (Сибирский НИИСХ, г. Омск), Елизаветинская, Валентина (НИИСХ Юго-Востока, г. Саратов), Леукурум 1307Д-54, Леукурум 1469Д-21, Леукурум 1594Д-3 (Самарский НИИСХ, пос. Безенчук), Безенчукская 139 (исторический сорт, общий стандарт) и три местных стандарта в каждом учреждении из раннеспелой, среднеспелой и позднеспелой групп. Цикл 18 КАСИБ (выполнен в 2017 г.) включал те же стандартные сорта (три местных стандарта и один общий – Безенчукская 139) и новые селекционные линии и сорта: Каргала 223, Каргала 228, Каргала 238 (Актюбинская СХОС), Линия 19003, Линия 19029 (Казахский НИИ земледелия и растениеводства), Гордеиформе 69-08-2, Гордеиформе 178-05-2 (НПЦЗХ, Казахстан), Гордеиформе 2264, Гордеиформе 2383, Линия 9-25-016 (Карабалыкская СХОС), Гордеиформе 829, Гордеиформе 864, Гордеиформе 881 (ФГБНУ ФАНЦА), Гордеиформе 04-76-5, Гордеиформе 05-12-7, Гордеиформе 05-42-12 (Сибирский НИИСХ), Леукурум 1429Д-10, Леукурум 1506Д-36, Гордеиформе 1591Д-21 (Самарский НИИСХ), Аннушка, Луч 25 (НИИСХ Юго-Востока).

Изучение сортов 16-17 КАСИБ в 2015–2016 гг. проведено в пяти экологических пунктах: Актюбинск, Карабалык, Барнаул, Омск, Безенчук. Эксперименты 18 КАСИБ выполнены в 2017 г. в девяти экологических пунктах: Актюбинск, Карабалык, Алматы× (два пункта), Шортанды, Барнаул, Омск, Безенчук, Саратов.

Размещение делянок, наблюдения и учет урожая в каждой экологической точке были организованы по единой схеме. Предшественник – чистый пар, учетная площадь делянки 5–10.0 м^2, повторность 2–3-кратная. Размещение делянок в блоках – рендомизированное. Посев во всех экопунктах проводился в оптимальные агротехнические сроки. Уборка зерна осуществлялась при достижении полной спелости зерна, данные по урожайности пересчитывали на 14.0 % влажность.

Условия среды как внешние фоны формирования урожая по пунктам и годам в цикле 16-17 КАСИБ (2015–2016 гг.) можно условно распределить на три группы: 1) благоприятные – Карабалык, 2016 г.; Барнаул, 2015 г.; Омск, 2015 г. – со средней урожайностью 4.62, 3.82 и 3.30 т/га соответственно; 2) средние по продуктивности и негативным эффектам лимитирующих факторов среды – Барнаул, 2016 г.; Карабалык, 2015 г.; Омск, 2016 г. – с урожайностью 2.70, 2.69, 2.13 т/га соответственно; 3) жесткие с наибольшей концентрацией стрессовых факторов имели место в Актюбинске и Безенчуке в 2015–2016 гг., где урожайность варьировала от 1.16 до 1.88 т/га. В цикле 18 КАСИБ (2017 г.) условия среды по всем пунктам, кроме Актюбинска и Карабалыка, были благоприятными и очень хорошими. В Актюбинске на фоне хороших осенне-зимних запасов влаги в почве наблюдался сильный дефицит осадков в период вегетации. В Карабалыке на фоне сильной засухи в период посев–всходы и в начале вегетации отмечено изреживание стеблестоя посевов по отдельным сортам. Средняя урожайность в Актюбинске составила 1.25 т/га в Карабалыке – 1.56 т/га.

Оценку сортов провели по методу А.В. Кильчевского и Л.В. Хотылевой (1997), основанному на испытании генотипов в различных средах и применении двухфакторного дисперсионного анализа. Метод дает возможность определить общую и специфическую адаптивную способность генотипов, их стабильность и селекционную ценность. Общая адаптивная способность характеризует среднее значение признаков в различных условиях среды ($OAC = x_i - u$, где x_i – среднее значение признака i сорта во всех средах; u – среднее значение признака в эксперименте по всем сортам), специфическая адаптивная способность (CAC – отклонение от OAC в конкретной среде ($\sigma^2\ CAC_i = \sum(d_k + vd_{ik})^2/(m-1)\sigma^2/m$), где m – число сред. Чем меньше значение вариансы CAC, тем слабее генотип реагирует на изменения среды, тем выше его стабильность. Для сравнения результатов опытов с различным набором сортов, культур и средовых условий, применяется показатель относительной стабильности генотипа $s_{gi} = \sigma\ CAC_i/(u + OAC_i) \times 100$ %. Отношение $l_{gi} = \sigma^2_{(G\times E)gi}/\sigma^2\ CAC_i$ характеризует нелинейность ответа генотипа на среду. Если $l_{gi} \to 1$, генотип нелинейно реагирует на большинство сред, при $l_{gi} \to 0$ преобладает линейная реакция генотипа на среду. Для понимания сущности взаимодействия GE, при интерпретации вариансы $\sigma^2_{(G\times E)gi}$ применяется коэффициент компенсации K_{gi} ($K_{gi} = \sigma^2\ CAC_i/\sigma^2\ CAC'$, где $\sigma^2\ CAC' = \sum d_k^2/(m-1) - (m-1) \times \times \sigma^2/m$), который показывает относительный вклад генотипа и среды в варианту взаимодействия. При $K_{gi} \to 0$

преобладают эффекты компенсации взаимодействия GE, $K_{gi} = 1$ – эффекты компенсации и дестабилизации равны, $K_{gi} > 1$ – эффекты взаимодействия генотип–среда совпадают по знаку с эффектами среды, варианса σ^2 CAC_i возрастает с дестабилизирующим эффектом. В качестве селекционного критерия, оценивающего весь комплекс адаптивных реакций, применяется параметр – селекционная ценность генотипа $СЦГ_i = u + OAC_i - p \times \sigma CAC_i$, учитывающий как продукционные возможности генотипа в среднем по всем средам, так и стабильность.

Для оценки адаптивных свойств сортов в этой работе были использованы показатели OAC_i, CAC_i, 100 – *Sgi* (параметр введен для упрощения интерпретации полученных данных, поскольку его большие абсолютные величины характеризуют возрастание устойчивости в отличие от аналогичного по смыслу параметра *Sgi*), $СЦГ_i$, рассчитанные по (Кильчевский, Хотылева, 1997), коэффициент регрессии генотипов на среду b_i (Eberhart, Russell, 1966) и параметр гомеостатичности, рассчитанный по формуле В.В. Хангильдина (1978): $Hom = X^2/((X_{max} - X_{lim}) \times \sigma)$, где X – среднее значение признака с учетом всех фонов, X_{max} – максимальное значение признака, X_{lim} – минимальное значение признака в опыте, σ – среднеквадратическое отклонение признака.

Кластеризация сортов по свойствам адаптивности (OAC_i, CAC_i, 100 – *Sgi*, $СЦГ_i$, b_i, *Hom*) проведена на основе данных кластерного анализа, выполненного с применением пакета программ Agros 2.13 варианта *Q*-техники на персональном компьютере. В пакете реализован итерационный алгоритм, заключающийся в последовательном объединении объектов, наименее удаленных друг от друга. Разделение на кластеры проведено на основании значимости коэффициентов корреляции между компонентами кластерного анализа. Достоверность объединения сортов в кластеры подтверждена результатами дисперсионного анализа параметров адаптивности сортов. В качестве дополнительной процедуры группировки сортов был применен метод главных компонент. Целесообразность применения этого метода определяется двумя причинами: 1) подтверждение результатов кластерного анализа; 2) визуализация биплота в системе двух главных компонент более наглядно демонстрирует объединение сортов в группы.

Результаты и обсуждение

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа двух экспериментов (16-17 КАСИБ, 18 КАСИБ) показали значимые эффекты среды, генотипов и их взаимодействия (табл. 1). В обоих экспериментах превалирующий вклад в общую дисперсию урожайности вносили факторы среды. Наиболее значимое влияние условий среды имело место в первом эксперименте, что, видимо, связано с сильным проявлением лимитирующих факторов, действовавших на растения в отдельных опытах (год–пункт).

Уменьшение эффектов среды в опытах 18 КАСИБ относительно 16-17 КАСИБ на 7.6 % в абсолютных значениях сопровождалось увеличением (на 6.5 %) вклада в общее варьирование эффектов взаимодействия GE. Влияние генотипического фактора также возросло, но незначительно – на 1.1 %. Эта динамика может быть связана как с изменением факторов среды, так и с реакцией различного сортового состава в двух экспериментах. Тем не менее значимое влияние генотипа и эффектов взаимодействия позволяет оценить адаптивность, стабильность, отзывчивость и селекционную ценность исследуемых сортов.

Незначительная часть неучтенных (случайных) факторов (Error) объясняется тем, что их величина в системе двухфакторного дисперсионного анализа определяется дисперсией полевых повторений в каждом эксперименте. В обоих опытах варьирование данных полевых повторностей было значительно меньше дисперсии, определявшейся изменчивостью по годам, пунктам и сортам. Общая характеристика сортов 16-17 и 18 КАСИБ представлена в табл. 2 и 3. В обоих экспериментах, несмотря на значимые различия по l_{gi} и K_{gi}, оба параметра у всех сортов были ближе к нулевой отметке, что указывает на преобладание линейного ответа генотипов на изменение среды и отсутствие значимых дестабилизирующих эффектов, вызываемых совпадением по знаку вкладов в общее варьирование эффектов среды и GE взаимодействия, что предполагает схожую по направлению реакцию сортов на изменение среды.

Другие параметры в обоих экспериментах значительно изменялись в зависимости от свойств сортов и особенностей их взаимодействия со средой. Для распределения сортов, происходящих из различных селекционных центров, по группам, объединяющим сорта с близкими характеристиками продуктивности, адаптивности и стабильности, к массиву данных по OAC_i, σCAC_i, 100-*Sgi*, $СЦГ_i$, b_i, *Hom* были применены кластерный анализ и метод главных компонент. По результатам кластерного анализа, в обоих экспериментах выделено по три кластера (внутрикластерные коэффициенты корреляции составили в эксперименте 16-17 КАСИБ 0.634…0.995 и в 18 КАСИБ 0.529…0.997), и по два сорта в обоих экспериментах оказалось вне кластеров. Эти результаты были подтверждены методом главных компонент, которые представлены в виде биплота на основе первых двух главных компонент с долей от общей дисперсии в первом эксперименте – 99.9 %, во втором – 99.7 % (рис. 1 и 2). Вне кластеров оказались в первом эксперименте (16-17 КАСИБ) сорт Гордеиформе 18567-6 (Казахский НИИ земледелия) и усредненные значения местных стандартов из раннеспелой группы, во втором эксперименте (18 КАСИБ) – линия 19003 (Карабалыкская СХОС) и Луч 25 (НИИСХ Юго-Востока).

Первый кластер 16-17 КАСИБ объединил десять сортов: три – селекции Алтайского НИИСХ (Гордеиформе 719, Гордеиформе 748, Гордеиформе 728), три – селекции Научно-производственного центра зернового хозяйства (НПЦЗХ) (Лавина, Дамсинская юбилейная, Шортандинская 256), по одному сорту из НИИСХ Юго-Востока (Елизаветинская), Сибирского НИИСХ (Гордеиформе 00-178-04), Актюбинской СХОС (Каргала 1412) и исторический стандарт Безенчукская 139. Во второй кластер вошло четыре сорта – по одному из НИИСХ Юго-Востока (Валентина), Актюбинской СХОС (Каргала 1514), Карабалыкской СХОС (Шарифа) и Сибирского НИИСХ (Гордеиформе 03-02-18). Третий кластер объединил девять сортов: три – селекции Самарского НИИСХ (Леукурум 1307-54, Леукурум 1469-21, Леукурум 1594-3), по одному из Казах-

Table 1. Grain yield variation in KASIB 16-17 and 18 varieties in 10 and 9 test trials in Russia and Kazakhstan, respectively

Source of variation	KASIB 16-17				KASIB 18			
	DF	MS	SS	Percentage in overall variation	DF	MS	SS	Percentage in overall variation
E	9	6374.7**	57372	83.8	8	5684.1**	45472	76.2
G	24	165.8**	3978	5.8	24	172.3**	4136	6.9
GE	216	31.7**	6852.3	10.0	192	51.5**	9883.5	16.6
Error	249	1.05	263	0.4	224	0.653	146.3	0.3

Notes: DF, degree of freedom, MS, mean square; SS, sum of squares; E,G, GE, effects of the environment, genotype, and genotype-environment interactions, respectively; Error, unaccounted dispersion. ** Fisher's significance level 1%.

Table 2. Adaptability and stability of varieties KASIB 16-17 studied in Russia and Kazakhstan in 2015–2016

Genotype	Adaptability and stability parameters							
	OAC_i	$\sigma^2(G\times E)_{gi}$	σCAC_i	S_{gi}	BVG_i	I_{gi}	K_{gi}	b_i
Kargala 66	2.4	9.3	10.8	60.7	15.9	0.080	0.12	0.93
Kargala 1412	–2.6	13.5	10.2	55.0	11.7	0.130	0.10	0.86
Kargala 1514	0.1	11.7	11.1	56.1	13.4	0.095	0.12	0.94
Sharifa	0.7	5.0	11.5	55.5	13.5	0.038	0.13	1.01
Hordeiforme 950/99	–0.3	6.7	9.7	60.9	14.4	0.070	0.09	0.85
Lavina	–4.2	8.3	10.7	49.1	9.5	0.073	0.11	0.92
Damsinskaya yubileynaya	–3.2	4.7	10.8	51.0	10.4	0.040	0.12	0.94
Shortandinskaya 256	–1.9	3.3	11.1	52.3	11.4	0.027	0.12	0.98
Hordeiforme 18567-6	–7.7	5.7	9.8	44.1	7.0	0.059	0.09	0.86
Hordeiforme 18585-2	0.4	0.5	10.2	60.1	14.6	0.005	0.10	0.91
Early-ripening standard	0.6	5.8	11.3	56.4	13.7	0.046	0.13	0.98
Mid-season standard	0.9	2.2	10.1	61.1	15.2	0.021	0.10	0.90
Late-ripening standard	3.0	22.8	12.2	56.6	15.1	0.152	0.15	1.00
Historical standard Bezenchukskaya 139	–1.0	7.7	12.2	49.6	11.1	0.052	0.15	1.06
Hordeiforme 719	–3.1	6.2	12.2	44.7	9.0	0.041	0.15	1.07
Bezenchukskaya 139	–1.0	7.7	12.2	49.6	11.1	0.052	0.15	1.06
Hordeiforme 723	–1.0	2.5	11.8	51.5	11.6	0.018	0.14	1.04
Hordeiforme 748	1.1	47.6	14.8	43.7	10.4	0.218	0.22	1.18
Hordeiforme 00-178-4	1.5	11.6	13.8	48.1	11.8	0.061	0.19	1.21
Hordeiforme 01-115-5	2.6	23.1	11.6	58.4	15.4	0.173	0.13	0.94
Hordeiforme 03-20-18	1.8	8.4	12.0	55.7	14.1	0.059	0.14	1.03
Elizavetinskaya	–2.9	1.0	11.6	48.2	9.9	0.008	0.13	1.03
Valentina	1.4	12.6	12.5	52.9	13.1	0.080	0.16	1.07
Leucurum 1307D-54	3.6	11.8	12.5	56.5	15.4	0.075	0.16	1.08
Leucurum 1469D-21	5.7	17.1	13.8	55.4	16.1	0.090	0.19	1.18
Leucurum 1594D-3	3.0	0.4	11.3	59.9	16.0	0.003	0.13	1.00
x^*		10.0	11.6	53.7	12.8	0.07	0.13	1.00
Sx^{**}		1.99	0.25	1.33	0.50	0.01	0.01	0.02

* Mean; ** error of the mean.

ского института земледелия (КИЗ) (Гордеиформе 18585-2), Карабалыкской СХОС (Гордеиформе 950/89), Сибирского НИИСХ (Гордеиформе 01-115-5), Актюбинской СХОС (Каргала 66) и два местных стандарта (среднеспелый и позднеспелый биотипы).

Во втором эксперименте (18 КАСИБ) первый кластер образовали пять сортов – по одному из НПЦЗХ (Гордеиформе 69-08-2), Алтайского НИИСХ (Гордеиформе 864), Карабалыкской СХОС (Л9-25-016) и два местных стандарта раннеспелого и позднеспелого биотипов. Второй

Table 3. Adaptability and stability of KASIB 18 varieties studied in Russia and Kazakhstan in 2017

Genotype	Adaptability and stability parameters							
	OAC_i	$\sigma^2(G\times E)_{gi}$	σCAC_i	S_{gi}	BVG_i	I_{gi}	K_{gi}	b_i
Kargala 223	–1.0	9.9	8.5	69.9	17.5	0.137	0.10	0.78
Kargala 228	–0.1	6.0	11.5	60.8	14.6	0.046	0.18	1.06
Kargala 238	–0.2	12.6	11.6	60.4	14.4	0.094	0.19	1.04
Line 19003	–1.6	27.3	10.2	63.4	14.8	0.265	0.14	0.83
Line 19029	–3.2	35.0	6.4	75.6	18.0	0.854	0.06	0.53
Hordeiforme 69-08-2	–3.3	12.5	12.4	52.7	10.3	0.082	0.21	1.12
Hordeiforme 178-05-2	3.4	23.8	10.9	66.8	18.9	0.200	0.17	0.92
Hordeiforme 2264	–1.8	2.4	9.6	65.0	15.2	0.026	0.13	0.90
Hordeiforme 2383	–1.5	32.3	10.8	61.2	14.1	0.275	0.16	0.88
Line 9-25-016	–5.7	9.9	10.4	56.2	10.4	0.092	0.15	0.93
Early ripening standard	–4.2	22.5	13.4	46.9	8.1	0.126	0.25	1.19
Mid-season standard	–0.6	15.1	12.0	58.1	13.4	0.104	0.20	1.07
Late-ripening standard	0.4	56.8	15.6	47.7	9.9	0.234	0.34	1.32
Historical standard Bezenchukskaya 139	–2.6	10.8	9.3	65.3	14.9	0.125	0.12	0.83
Hordeiforme 829	–0.7	5.7	12.3	57.1	13.0	0.038	0.21	1.14
Hordeiforme 864	–1.4	19.6	13.6	51.5	10.6	0.106	0.26	1.23
Hordeiforme 881	–2.9	12.0	9.4	64.5	14.5	0.135	0.12	0.84
Hordeiforme 04-76-5	0.1	5.3	12.3	58.2	13.7	0.034	0.21	1.15
Hordeiforme 05-12-7	2.7	13.3	13.1	59.1	15.3	0.077	0.24	1.20
Hordeiforme 05-42-12	3.2	24.8	11.5	64.7	17.9	0.187	0.19	0.97
Leucurum 1429-10	2.9	19.4	10.4	67.7	18.9	0.179	0.15	0.89
Leucurum 1506-36	7.1	15.8	13.7	62.3	18.9	0.084	0.26	1.26
Hordeiforme 1591-21	5.4	30.7	11.9	66.0	19.7	0.218	0.20	0.98
Annushka	2.4	80.4	13.3	58.1	14.7	0.455	0.25	0.93
Luch 25	3.0	31.3	12.1	62.8	17.0	0.215	0.20	1.02
x^*		21.4	11.4	60.9	14.7	0.18	0.19	1.00
Sx^{**}		3.45	0.39	2.13	0.63	0.03	0.01	0.04

* Mean; ** error of the mean.

кластер объединил 12 сортов – по два из Алтайского НИИСХ (Гордеиформе 829, Гордеиформе 881), Сибирского НИИСХ (Гордеиформе 04-76-5, Гордеиформе 05-12-7), Карабалыкской СХОС (Гордеиформе 2383, Гордеиформе 2264), Актюбинской СХОС (Каргала 238, Каргала 228), по одному из НИИСХ Юго-Востока (Аннушка) и КИЗ (Линия 19003), стандарты – один местный среднеспелого биотипа и исторический стандарт Безенчукская 139. В третий кластер вошло шесть сортов: три из Самарского НИИСХ (Леукурум 1506Д-36, Леукурум 1429Д-10, Гордеиформе 1591Д-21), по одному из Сибирского НИИСХ (Гордеиформе 05-42-12), Актюбинской СХОС (Каргала 223), НПЦЗХ (Гордеиформе 178-05-2).

Результаты дисперсионного анализа (модель неорганизованных повторений) показали значимые различия между кластерами в обоих экспериментах по урожайности, селекционной ценности ($СЦГ_i$), гомеостатичности (*Hom*) и коэффициенту относительной стабильности (100 – *Sgi*) (табл. 4 и 5).

В обоих экспериментах отсутствовали различия между кластерами по параметрам σCAC_i и b_i, характеризующим специфическую адаптивность к конкретным средам и отзывчивость на улучшение среды.

Средние величины урожайности и OAC_i сортов второго и третьего кластера в первом эксперименте (16-17 КАСИБ) различаются недостоверно. В то же время между этими кластерами отмечены значимые различия по относительной стабильности и комплексным параметрам $СЦГ_i$ и *Hom*, оценивающим в одной цифре стабильность и продукционные возможности сортов. Чем ниже σCAC_i и выше OAC_i (урожайность), тем выше относительная стабильность $СЦГ_i$ и *Hom*. Наиболее существенные различия по этим параметрам отмечены между сортами первого и третьего кластеров. Преимущество третьего кластера над первым (кроме параметров σCAC_i и b_i, по которым различия незначимы) составило от 17.4 % по урожайности до 56.1 % по *Hom*. Один сорт из исследуемого набора, Гордеиформе 18567-6 (КИЗ), не вошедший в кластеры,

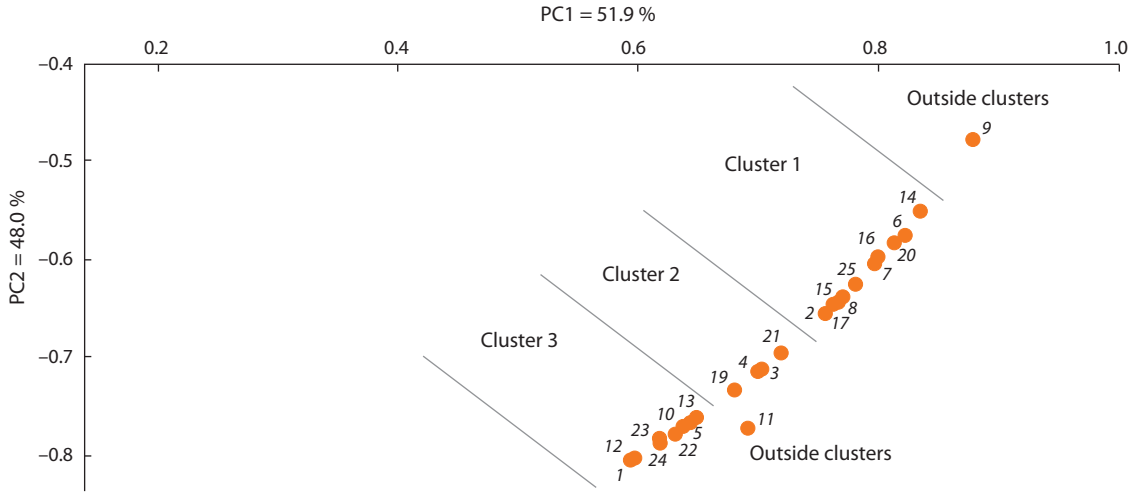


Fig. 1. Clustering of KASIB 16-17 varieties in the set of two principal components (PC1; PC2) calculated from parameters of adaptability and responsiveness: GAA_i, σSAA_i, $100\text{-}S_{gi}$, *BVG*, b_i, and *Hom*. Numerical designations of varieties:

1, Kargala 66; *2*, Kargala 1412; *3*, Kargala 1514; *4*, Sharifa; *5*, Hordeiforme 950/99; *6*, Lavina; *7*, Damsinskaya yubileynaya; *8*, Shortandinskaya 256; *9*, Hordeiforme 18567-6; *10*, Hordeiforme 18585-2; *11–13*, Local standards; *14*, Hordeiforme 719; *15*, Hordeiforme 723; *16*, Hordeiforme 748; *17*, Hordeiforme 00-178-4; *18*, Hordeiforme 01-115-5; *19*, Hordeiforme 03-20-18; *20*, Elizavetinskaya; *21*, Valentina; *22*, Leucurum 1307D-54; *23*, Leucurum 1469D-21; *24*, Leucurum 1594D-3; *25*, Bezenchukskaya 139.

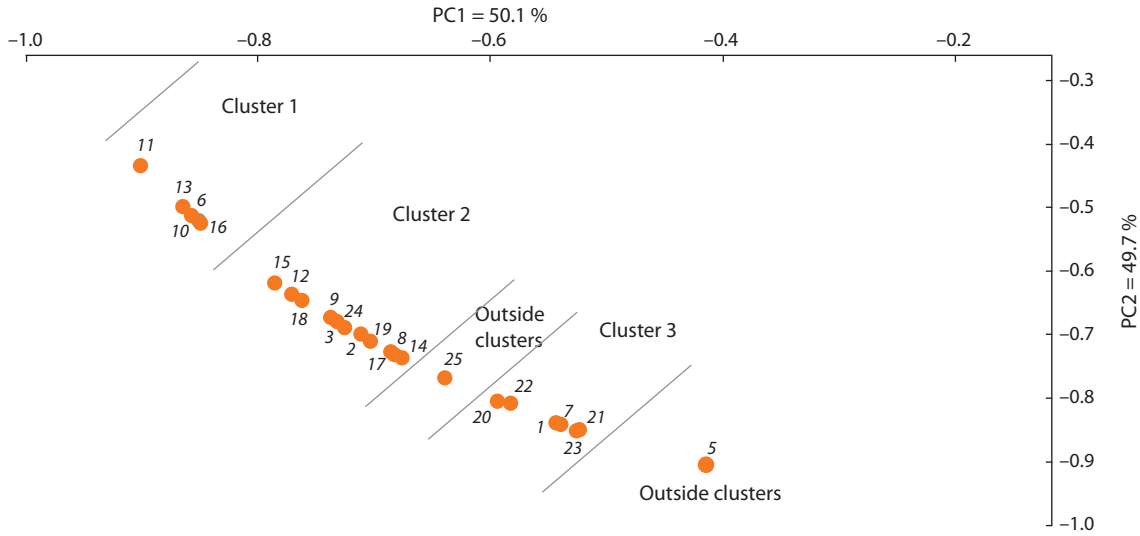


Fig. 2. Clustering of KASIB 18 varieties in the set of two principal components (PC1; PC2) calculated from parameters of adaptability and responsiveness: GAA_i, σSAA_i, S_{gi}, BVG_i, b_i, and *Hom*.

Numerical designations of varieties: *1*, Kargala 223; *2*, Kargala 228; *3*, Kargala 238; *4*, Line 19003; *5*, Line 19029; *6*, Hordeiforme 69-08-02; *7*, Hordeiforme 178-05-02; *8*, Hordeiforme 2264; *9*, Hordeiforme 2383; *10*, Line 9-25-016; *11–13*, Local standards; *14*, Bezenchukskaya 139; *15*, Hordeiforme 829; *16*, Hordeiforme 864; *17*, Hordeiforme 881; *18*, Hordeiforme 04-76-5; *19*, Hordeiforme 05-12-7; *20*, Hordeiforme 05-42-12; *21*, Leucurum 1429D-10; *22*, Leucurum 1506D-36; *23*, Hordeiforme 1591D-21; *24*, Annushka; *25*, Luch 25.

характеризуется очень низкой средней урожайностью (–23.4 % к уровню первого кластера) и одновременно низкой стабильностью – параметр 100 – *Sgi* (–13.0 %), селекционной ценностью генотипа (–34.5 %), *Hom* (–28.1 %) и отзывчивостью на среду b_i (–16.5 %).

Во втором эксперименте (18 КАСИБ) сорта, вошедшие в третий кластер, значимо превосходили сорта первого и второго кластеров по урожайности, стабильности (100 – *Sgi*), селекционной ценности ($СЦГ_i$) и гомеостатичности (*Hom*). Сорта второго кластера были обособлены от первого в основном в силу различий по стабильности (100–*Sgi*), $СЦГ_i$ и *Hom*.

В среднем по двум экспериментам (16-17, 18 КАСИБ) по доле сортов, вошедших в различные кластеры, оригинаторы отчетливо распределились на группы (рис. 3). Все изученные сорта Самарского НИИСХ вошли в третий кластер, в этот же кластер вошло 50.0 % сортов КИЗ, при этом 25.0 % сортов этого центра относились к первому

Table 4. Mean values of yield, stability, responsiveness, and breeding value for varieties in clusters, data on KASIB 16-17, 2015–2016

Cluster	Yield	σCAC_i σSAAi Specific adaptive ability	$100 - Sg_i$ Relative stability	BVG_i Breeding value of the genotype	b_i	*Hom* Homeo-stasis
Cluster 1	23.5a	11.9	49.3a	10.7a	1.03	1.25a
Cluster 2	26.2b	11.8	55.0b	13.5b	1.02	1.49b
Cluster 3	27.6b	11.4	58.9c	15.3c	0.98	1.95c
F test	13.6*	NS	29.2*	85.7**	NS	35.5**
Error of the mean, %	2.51	3.3	1.97	2.54	5.59	4.5

* ** indicate 5 % and 1 % significance levels according to Fisher's test, respectively. Numerals followed by the same letters differ insignificantly according to Duncan's test

Table 5. Mean values of yield, stability, responsiveness and breeding value for varieties in clusters, data on KASIB 18, 2017

Cluster	Yield	σCAC_i σSAAi Specific adaptive ability	$100 - Sgi$ Relative stability	BVG_i Breeding value of the genotype	b_i	*Hom* Homeo-stasis
Cluster 1	26.6a	13.1	51.0a	9.9a	1.16	1.37a
Cluster 2	28.8a	11.3	60.9b	14.4b	0.99	2.15b
Cluster 3	32.9b	11.2	66.2c	18.6c	0.97	2.94c
F test	12.6*	NS	34.5*	163.9**	NS	22.5*
Error of the mean, %	2.77	3.5	1.88	2.08	5.34	6.7

* ** indicate 5 % and 1 % significance levels according to Fisher's test, respectively. Numerals followed by the same letters differ insignificantly according to Duncan's test.

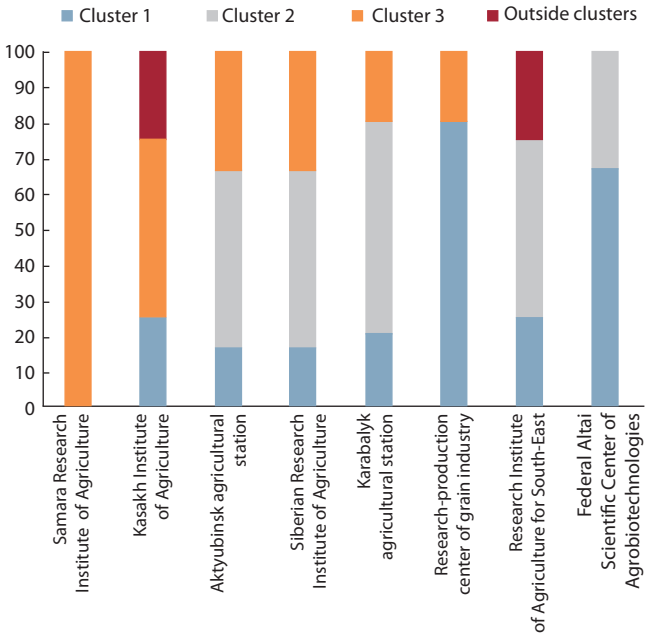


Fig. 3. Distribution of genotypes from different originators over clusters as percentages of the total number of genotypes, averaged over two experiments: KASIB 16–17 and 18.

кластеру и столько же оказалось вне кластеров. Актюбинская СХОС и Сибирский НИИСХ имели одинаковое распределение сортов по кластерам – в первый, второй и третий вошли соответственно 16.7, 50.0 и 33.3 % сортов этих учреждений. Близкое к этому соотношение наблюдалось для сортов Карабалыкской СХОС. Сорта НПЦЗХ распределялись по двум кластерам: 80.0 % вошли в первый, 20.0 % – в третий. Сорта НИИСХ Юго-Востока вошли в первый (25.0 %), во второй (50.0 %) кластеры и 25.0 % оказались вне кластеров. Все сорта Алтайского НИИСХ вошли в первый (75.0 %) и во второй (25.0 %) кластеры.

Очевидно, что в процессе селекции происходят эволюционные изменения, приводящие к формированию сортов как широкого ареала, так и локального значения, приспособленных к конкретным регионам и условиям среды. Генотипы, вошедшие в третий кластер в обоих экспериментах, можно отнести к сортам широкого ареала, соответственно, генотипы первого кластера имеют локальное значение. Сорта, вошедшие во второй кластер, по своим свойствам занимают промежуточное положение между этими двумя группами.

Отчетливо наблюдались существенные различия между средними значениями, вычисленными по каждому оригинатору (селекционному центру). Для определения эффекта оригинатора был применен однофакторный дисперсионный анализ неорганизованных повторений, где в качестве варианта рассматривались средние значения параметров по всем изученным сортам данного учреждения, а в качестве повторности привлекались значения по отдельным сортам. Сравнение полученных результатов по селекционным центрам провели с историческим стандартом – сортом Безенчукская 139 (табл. 6). В эксперименте 16-17 КАСИБ все изученные параметры по оригинаторам достоверно различались по критерию Фишера. При этом значимое превосходство над сортом Безенчукская 139 по урожайности отмечено только для Самарского НИИСХ. Сорта этого учреждения и еще трех (Актюбинская СХОС, Карабалыкская СХОС и Сибирский НИИСХ) достоверно превосходили Безенчукскую 139 по коэффициенту ста-

Table 6. Advance in yield, stability, and responsiveness to environments according to the results of ecological trials of the set of varieties over all sites, KASIB 16-17 (2015–2016), % with reference to Bezenchukskaya 139

Breeding centers	$U+V_i$	σCAC_i, σSAA_i	$100 - Sg_i$	BVG_i	b_i	*Hom*
Aktyubinsk agricultural station	103.8a-d	87.6ab	115.5bcd	122.9b-d	85.8ab	139.8b-d
Karabalyk agricultural station	104.8a-d	86.9ab	117.5d	126.0cd	87.5a-c	149.2d
Research & production center for grain industry	91.1a	88.8ab	102.5ab	93.9a	89.1a-d	103.6a
Kasakh Institute of Agriculture	88.9a	81.8a	105.1ab	97.3ab	83.4a	115.6abc
Bezenchukskaya 139	100.0a-c	100.0bc	100.0a	100.0a	100.0b-d	100.0a
Federal Altai Scientific Center of Agrobiotechnologies	99.8a-c	105.7c	94.0a	92.8a	103.1d	106.8ab
Siberian Research Institute of Agriculture	111.9cd	101.8bc	109.1bcd	124.0cd	99.9b-d	141.1cd
Research Institute of Agriculture for South-East	100.9a-c	98.5bc	102.0ab	103.7a-c	98.8d-d	102.3a
Samara Research Institute of Agriculture	120.8d	102.5bc	115.6dcd	142.6d	102.5cd	144.7cd
Fisher's test	3.23*	3.01*	4.37*	5.9*	2.82*	5.4*
Error of the mean, %	5.4	5.03	3.9	6.6	4.4	8.3

* 5 % significance level according to Fisher's test. Numerals followed by the same letters differ insignificantly according to Duncan's test.

Table 7. Advance in yield, stability, and responsiveness to environments according to the results of ecological trials of the set of varieties over all sites, KASIB 18 (2015–2016), % with reference to Bezenchukskaya 139

Breeding centers	$U+V_i$	σCAC_i, σSAA_i	$100 - Sg_i$	BVG_i	b_i	*Hom*
Aktyubinsk agricultural station	108.3abc	113.5	97.5	104.2	114.9	109.1
Karabalyk agricultural station	98.7a	110.9	93.1	89.0	108.4	81.1
Research & production center for grain industry	110.2abc	125.4	91.4	98.0	122.5	81.4
Kasakh Institute of Agriculture	100.9a	89.2	106.4	110.2	81.8	119.7
Bezenchukskaya 139	100.0a	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Federal Altai Scientific Center of Agrobiotechnologies	103.8ab	127.0	88.3	85.3	128.6	74.0
Siberian Research Institute of Agriculture	117.3bcd	132.8	92.9	105.0	133.1	81.6
Research Institute of Agriculture for South-East	123.0cd	136.7	92.6	106.7	116.7	84.4
Samara Research Institute of Agriculture	129.0d	129.4	100.0	128.7	125.7	109.3
Fisher's test	4.6*	NS	NS	NS	NS	NS
Error of the mean, %	4.3	8.5	5.9	8.3	9.2	17.9

*5 % significance level according to Fisher's test. Numerals followed by the same letters differ insignificantly according to Duncan's test.

бильности ($100 - Sgi$) и комплексным параметрам, учитывающим стабильность и продуктивность ($СЦГ_i$ и *Hom*). Параметры σCAC_i и b_i по всем оригинаторам, за исключением КИЗ, не отличались от уровня Безенчукской 139. У КИЗ они были меньше стандарта, что в сочетании с низкой средней урожайностью характеризует сорта этого центра, включенные в эксперимент как экстенсивные, слабо отзывчивые на улучшение среды. Таким образом, селекционные центры в процессе создания сортов, переданных в 16-17 КАСИБ, реализовали (если вести отсчет от Безенчукской 139) следующие направления по изменению свойств продуктивности и устойчивости: 1) значительный прогресс по средней урожайности, ее оптимальное сочетание со стабильностью, сохранение отзывчивости на уровне стандарта (Самарский НИИСХ); 2) средняя урожайность в пределах варьирования стандартного сорта и высокая ее стабильность (Актюбинская СХОС, Карабалыкская СХОС, Сибирский НИИСХ); 3) низкая урожайность (на 11.1 % меньше стандарта), низкая варианса специфической адаптивности (изменчивость по средам) и слабая отзывчивость на среду (КИЗ); 4) урожайность и все остальные параметры не отличаются от уровня стандарта (ФГБНУ ФАНЦА, НИИСХ Юго-Востока, НПЦЗХ).

В опытах 18 КАСИБ достоверные различия между «оригинаторами» наблюдались только по урожайности зерна (табл. 7). Значимое превосходство над сортом Безенчукская 139 отмечено для трех оригинаторов: Самарского НИИСХ, НИИСХ Юго-Востока, Сибирского НИИСХ. Отсутствие различий по другим параметрам объясняется сильной изменчивостью между сортами, представляющими одно и то же селекционное учреждение. Контрастность параметров между сортами особенно заметна в материа-

Table 8. Advance in yield according to local tests in the originator institutions, KASIB 16-17 and KASIB 18, % with reference to Bezenchukskaya 139

Originator	Yield, % with respect to Bezenchukskaya 139					
	KASIB 16-17				KASIB 18	
	2015		2016		2017	
	mean	min-max	mean	min-max	mean	min-max
Aktyubinsk agricultural station	151.1	126.4–171.4	162.0	134.7–184.2	103.6	87.0–122.9
Karabalyk agricultural station	95.7	91.3–100.0	84.4	77.6–91.3	82.8	28.2–110.4
Federal Altai Scientific Center of Agrobiotechnologies	113.4	94.4–135.4	131.5	113.6–163.2	141.8	139.9–144.2
Siberian Research Institute of Agriculture	112.6	106.1–124.2	135.2	125.4–153.5	104.8	99.9–109.8
Samara Research Institute of Agriculture	132.6	121.1–141.0	132.0	123.5–136.9	114.6	103.4–136.4
Kasakh Institute of Agriculture	–	–	–	–	119.7	116.7–122.6
Research-production center of grain industry	–	–	–	–	125.2	120.1–130.4
Research Institute of Agriculture for South-East	–	–	–	–	102.7	99.7–105.7

ле следующих оригинаторов: Актюбинской СХОС (*Hom*, 100 – *Sgi*), КИЗ (σCAC_i, b_i, *Hom*), НПЦЗХ (*СЦГ*$_i$, *Hom*, 100 – *Sgi*), Алтайского НИИСХ (b_i), Карабалыкской СХОС (*СЦГ*$_i$), Самарского НИИСХ (b_i), Сибирского НИИСХ (*СЦГ*$_i$).

Таким образом, по средней урожайности в обоих экспериментах только сорта Самарского НИИСХ стабильно и достоверно превосходят исторический стандарт. По параметрам стабильности и отзывчивости сорта всех селекционных учреждений не имеют устойчивых изменений относительно Безенчукской 139. Можно предположить, что в процессе селекции в одном селекционном центре наряду с превалированием определенных свойств могут быть реализованы различные варианты генотипов в координатах адаптивности, стабильности и продуктивности. Очевидно, что сорта, созданные в разных учреждениях, могут иметь общие черты и однотипно реагировать на изменения среды.

Эти результаты наводят на мысль о том, что свойства адаптивности, стабильности и отзывчивости на среду в значительной степени зависят от всей совокупности условий селекционного центра, включающей биоклиматический потенциал, частоту благоприятных и стрессовых периодов в экопункте селекции, исходный материал и реализуемые селекционные стратегии.

Систематизируя полученные данные по свойствам производимых сортов, можно вычленить доминирующие факторы отбора, действующие в селекционных центрах. В экопункте Самарского НИИСХ (отсутствуют сорта первого и второго кластера) с большой долей вероятности предполагается стабильное действие отбора, приводящее к созданию сортов широкого ареала. Условия функционирования селекционного процесса в Алтайском НИИСХ и НИИСХ Юго-Востока (отсутствуют сорта третьего кластера) способствуют созданию сортов локального значения, хорошо приспособленных к местным условиям среды. Все остальные селекционные центры (включают сорта первого и третьего кластеров) с определенной вероятностью могут производить сорта как широкого ареала, так и локального значения.

По результатам изучения питомников 16-17 и 18 КАСИБ, к сортам широкого ареала отнесены 13 сортов (30.9 %): Леукурум 1307д-54, Леукурум 1469д-21, Леукурум 1594д-3, Леукурум 1429-10, Леукурум 1506-36, Гордеиформе 1591-21 (Самарский НИИСХ), Гордеиформе 18585-2 (КИЗ), Гордеиформе 950/899 (Карабалыкская СХОС), Гордеиформе 01-115-5, Гордеиформе 05-42-12 (Сибирский НИИСХ), Каргала 66, Каргала 223 (Актюбинская СХОС), Гордеиформе 178-05-2 (НПЦЗХ). В группу сортов локального значения вошли также 13 сортов (30.9 %): Гордеиформе 719, Гордеиформе 748, Гордеиформе 728, Гордеиформе 864 (ФГБНУ ФАНЦА), Лавина, Дамсинская юбилейная, Шортандинская 256, Гордеиформе 69-08-2 (НПЦЗХ), Елизаветинская (НИИСХ Юго-Востока), Гордеиформе 00-178-04 (Сибирский НИИСХ), Каргала 1412 (Актюбинская СХОС), Л9-25-016 (Карабалыкская СХОС) и исторический стандарт Безенчукская 139.

Эти сорта рекомендуется использовать в селекции в качестве исходного материала по соответствующим направлениям. Сорта широкого ареала целесообразно использовать также в качестве исходного материала в селекции сортов локального значения для усиления стабильности их продукционных свойств.

Наряду с этим прогресс увеличения урожайности относительно Безенчукской 139 в каждом селекционном центре имел более устойчивые тенденции (табл. 8). Сорта местной селекции Актюбинской СХОС, Алтайского НИИСХ, Сибирского НИИСХ и Самарского НИИСХ при изучении в эксперименте 16-17 КАСИБ (2015–2016 гг.) значительно (на 112.6–162.0 %) превысили в этих селекционных центрах уровень Безенчукской 139 и только на Карабалыкской СХОС получен отрицательный результат. Аналогичное исследование в 18 КАСИБ показало положительный тренд по урожайности (114.6–141.8 %) для четырех селекционных центров – Алтайского НИИСХ, Самарского НИИСХ, КИЗ и НПЦЗХ. При этом среди сортов всех селекционных центров обнаружены генотипы, более продуктивные (109.8–144.2 %), чем Безенчукская 139. Если ориентироваться только на лучшие генотипы, то

наиболее значимый и устойчивый прогресс в обоих экспериментах отмечен для Алтайского НИИСХ (135.4 и 163.2 % к Безенчукской 139), что можно объяснить высокой эффективностью селекции по созданию сортов локального значения в этом селекционном центре.

Значительные различия между сортами одного и того же учреждения по урожайности, другим изученным параметрам в обоих экспериментах, тренду урожайности относительно Безенчукской 139 в каждом селекционном центре можно объяснить тем, что исследованный в наших экспериментах селекционно-генетический материал не прошел весь цикл селекционного процесса (за исключением сортов НИИСХ Юго-Востока), завершением которого справедливо считается допуск сорта к коммерческому использованию. Это связано с подходами к формированию питомников программы КАСИБ, функциональным предназначением которой является расширение возможностей селекционного процесса на завершающем этапе селекции. Полученные результаты подтверждают целесообразность и необходимость широкого экологического испытания сортов на этом этапе селекции, что соответствует методологии, разработанной Международным центром улучшения кукурузы и пшеницы (CIMMYT). Эффективность международных многоуровневых испытаний пшеницы, проводившихся в течение XX века CIMMYT с использованием соответствующих генетических вариаций, оказалась очень высокой. Результат этого подхода известен в форме Зеленой революции (Trethowan et al., 2007). В настоящее время методология нуждается в тонкой настройке в связи с изменением климата и особенностями условий крупных регионов. Стратегия улучшения пшеницы включает введение новых источников генетической изменчивости через дикие виды, использование синтетических форм на основе *Aegilops tauschii*, *Triticum dicoccum*, местных сортов (landraces) и, возможно, трансгеноза для трудно передаваемых при половой гибридизации признаков. Этот вариант сочетается с функционированием международных питомников испытаний и системой челночной селекции. Эффективность селекции повышается за счет применения молекулярных маркеров, более целенаправленного использования физиологических признаков формирования урожая, генетики растений, биостатистики и биоинформатики. Важная роль в этом процессе отводится поиску QTL адаптаций и их маркированию. Первый этап этих исследований предусматривает мультилокальные испытания экспериментальных популяций (Lage, Trethowan, 2008; Crossa et al., 2014).

Результаты, представленные в настоящей статье, можно рассматривать как первоначальный этап поиска перспективных для селекции генотипов и характеристики их адаптивных свойств, связанных с формированием урожайности и получения информации, необходимой для развития современных методов селекции.

Таким образом, в процессе эколого-географического изучения современного селекционного материала твердой пшеницы из России и Казахстана выявлены значимые эффекты генотипа и генотип-средовых взаимодействий, суммарно составившие 15.8–23.5 % от общей дисперсии урожайности. Генотип-средовые взаимодействия носили линейный характер, эффекты дестабилизации были незначительными, что предполагает схожую по направлению реакцию сортов на изменение условий среды. Все изученные в обоих экспериментах генотипы в результате применения методов кластерного анализа и главных компонент к массиву данных по OAC_i, σCAC_i, $100-Sgi$, $СЦГ_i$, b_i, Hom распределялись на три кластера. Дифференциация сортов по OAC_i (средней урожайности), $100-Sgi$, $СЦГ_i$, Hom стала определяющим фактором формирования кластеров. Первый кластер объединил генотипы, имеющие локальное значение, хорошо приспособленные к конкретным условиям среды. Третий кластер образовали сорта широкого ареала, с высокой средней урожайностью, стабильностью, гомеостатичностью и селекционной ценностью. Второй кластер включал генотипы с промежуточными величинами большинства параметров. В экопункте Самарского НИИСХ предполагается стабильное действие факторов, приводящих к созданию сортов широкого ареала. Условия функционирования селекционного процесса в Алтайском НИИСХ и НИИСХ Юго-Востока способствуют созданию сортов локального значения, хорошо приспособленных к местным факторам среды. Выделенные генотипы широкого ареала и локального значения рекомендуется использовать в селекции в качестве исходного материала по соответствующим направлениям. По средней урожайности стабильное превосходство над историческим стандартом показали только сорта Самарского НИИСХ. По параметрам стабильности и отзывчивости сорта всех селекционных учреждений не имеют устойчивых изменений относительно Безенчукской 139, что объясняется незавершенностью селекционного процесса по этим свойствам и подтверждает целесообразность функционирования программы КАСИБ. В то же время увеличение урожайности относительно Безенчукской 139 в каждом селекционном центре было более большим и стабильным в обоих экспериментах. Наиболее значимый и устойчивый тренд в обоих экспериментах отмечен для сортов Алтайского НИИСХ (135.4 и 163.2 % к Безенчукской 139), что можно объяснить высокой эффективностью селекции по созданию сортов локального значения в этом селекционном центре.

Acknowledgements

The authors are grateful to the staff of the KASIB enterprise for collaboration and discussion of the experimental results in workshops and conferences.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Батыгин Н.Ф. Физиология онтогенеза. Теоретические основы селекции. Т. 2. Ч. 1. Физиологические основы селекции растений. СПб.;1995;14-97.
[Batyguin N.F. Physiology of Ontogeny. Theoretical Basis of Breeding. V. 2. Pt. 1. Physiological Basis of Plant Breeding. St. Petersburg; 1995;14-97. (in Russian)]

Васильчук Н.С. Селекция яровой твердой пшеницы. Саратов, 2001. [Vasil'chuk N.S. Spring Durum Wheat Breeding. Saratov, 2001. (in Russian)]

Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Экологическая селекция растений. Минск: Тэхналогія, 1997.

[Kilchevsky A.V., Khotyleva L.V. Ecological Plant Breeding. Minsk: Technologia Publ., 1997. (in Russian)]

Кумаков В.А. Физиологическое обоснование моделей сортов пшеницы. М., 1985.
[Kumakov V.A. Physiological Grounds of Models of Wheat Varieties. Moscow, 1985. (in Russian)]

Хангильдин В.В. О принципах моделирования сортов интенсивного типа. Генетика количественных признаков сельскохозяйственных растений. М., 1978;111-116.
[Khungildin V.V. Principles of Modeling Intensive Varieties. Genetics of Quantitative Traits of Crop Plants. Moscow, 1978;111-116. (in Russian)]

Braun H.-J., Rajaram S., van Ginkel M. CIMMYT's approach to breeding for wide adaptation. Euphytica 92. 1996;175-183.

Calderini D.F., Slafer G.A. Changes in yield and yield stability in wheat during the 20th century. Field Crops Res. 1998;57:335-347. DOI 10.1016/S0378-4290(98)00080-x.

Ceccarelli S. Positive interpretation of genotype by environment interactions in relation to sustainability and biodiversity. Eds. M. Cooper, G.L. Hammer. Plant Adaptation and Crop Improvement. Wallingford, 1996;467-486.

Crossa J., Pérez P., Hickey J., Burgueño J., Ornella L., Cerón-Rojas J., Zhang X., Dreisigacker S., Babu R., Li Y., Bonnett D., Mathews K. Genomic prediction in CIMMYT maize and wheat breeding programs. Heredity. 2014;(112):48-60.

De Vita P., Mastrangelo A.M., Matteu L., Mazzucotelli E., Virzì N., Palumboc M., Lo Storto M., Rizza F., Cattivelli L. Genetic improvement effects on yield stability in durum wheat genotypes grown in Italy. Field Crops Res. 2010;119:68-77. DOI 10.1016/j.fcr.2010.06.016.

Duvick D.N., Smith J.S.C., Cooper M. Changes in performance, parentage, and genetic diversity of successful corn hybrids, 1930 to 2000. Eds. C.W. Smith, J. Betran, E.C.A. Runge. Corn: Origin, History, Technology and Production. Hoboken, N.J.: Willey, 2004;65-97.

Eberhart S.A., Russell W.A. Stability parameters for comparing varieties. Crop Sci. 1966;6:36-40. DOI 10.2135/cropsci1966.0011183X000600010011x.

Evans L.T. Crop Evolution, Adaptation and Yield. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 1993.

Fufa H., Baenziger P.S., Beecher B.S., Graybosch R.A., Eskridge K.M. Genetic improvement trends in agronomic performances and end-use quality characteristics among hard red winter wheat cultivars in Nebraska. Euphytica. 2005;144:187-198. DOI 10.1007/s10681-005-5811-x.

Lage J., Trethowan R.M. CIMMYT's use of synthetic hexaploid wheat in breeding for adaptation to rainfed environments globally. Aust. J. Agric. Res. 2008;59(5):461-469. DOI 10.1071/AR07223.

Lin C.S., Binns M.R. A method for analyzing cultivar × location × year experiments: a new stability parameter. Theor. Appl. Genet. 1988; 76:425-430. DOI 10.1007/BF00265344.

Lin C.S., Binns M.R. Genetic properties of four types of stability parameter. Theor. Appl. Genet. 1991;82:505-509. DOI 10.1007/BF00588606.

Rajaram S. Is Conventional plant breeding still relevant? Increasing Wheat Production in Central Asia through Science and International Cooperation. Proc. First Central Asia Wheat Conf. Almaty. Kazakhstan, 2003;1-4.

Romagosa I., Fox P.N. Genotype × environment interaction and adaptation. Eds. M.D. Hayward, N.O. Bosemark, I. Romagosa. Plant Breeding: Principles and Prospects. London: Chapman & Hall, 1993;373-390.

Tollenaar M., Lee E.A. Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. Field Crops Res. 2002;75:161-169. DOI 10.1016/S0378-4290(02)00024-2.

Trethowan R., Ortiz Ferrara G., Iwanaga M., Dodds J.H., Crouch J.H., Crossa J., Hans-Braun J. High yield potential, shuttle breeding, genetic diversity, and a new international wheat improvement strategy. Euphytica. 2007;157(3):365-384.

ORCID ID

P.N. Mal'chikov orcid.org/0000-0002-2141-6836

M.A. Rozova orcid.org/0000-0002-0119-5693

A.I. Morgunov orcid.org/0000-0001-7082-5655

M.G. Myasnikova orcid.org/0000-0002-7224-0308

Yu.I. Zelensky orcid.org/0000-0001-8512-0738

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):951-956
DOI 10.18699/VJ18.437

Development and investigation of common wheat lines of winter cultivar Bezostaya 1 with combinations of dominant alleles of *VRN-1* loci

E.V. Chumanova[1] ✉, T.T. Efremova[1], Y.V. Kruchinina[1, 2], L.A. Pershina[1]

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

VRN genes, determining wheat sensitivity to vernalization, are the main genetic system that defines the duration of the entire growing period and the durations of the main organogenesis phases. To date, several alleles have been described for *VRN-1* loci, and allele-specific primers have been developed that allow rapid identification of allelic spectra in common wheat varieties and lines. The unequal influence of different alleles of *VRN-1* loci on the duration of the growing period has also been shown; however, there is little information on the effect of the combination of different alleles on heading time. In developing genotypes having different alleles of dominant *VRN* genes on the base of the same genetic background, it is necessary to study the genetic effects of *VRN* genes on the duration of the growing season and the individual developmental phases, as well as on productivity. Most varieties presently grown in Russia carry the dominant alleles of two *VRN-1* genes: *Vrn-A1a* and *Vrn-B1a* or *Vrn-B1c*; thus, the task was to create lines combining the dominant alleles of *Vrn-A1a* with *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c* against the genetic background of the winter variety Bezostaya 1 (Bez1 *Vrn-A1a*/*Vrn-B1a* and Bez1 *Vrn-A1a*/*Vrn-B1c*). Homozygous plants were isolated in the F_2 generation by using known allele-specific primers for the *Vrn-A1* and *Vrn-B1* loci. The durations of the tillering–first node period, which is the key stage determining growing duration, and the period from shoots to heading were significantly reduced in lines with a combination of two dominant alleles of *VRN-1* loci compared to isogenic lines of Bezostaya 1 with the dominant alleles *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c*. The duration of these developmental phases also decreased in the obtained lines as compared to the isogenic line containing the dominant *Vrn-A1a* allele, but the differences were not significant. No substantial differences were found in the duration of other growing phases in lines with two dominant alleles of the *VRN-1* loci as compared to isogenic lines of Bezostaya 1.

Key words: common wheat lines; duration of growing phases; alleles of the *VRN-1* loci; allele-specific primers.

Получение и изучение линий мягкой пшеницы по озимому сорту Безостая 1 с комбинацией доминантных аллелей локусов *VRN-1*

Е.В. Чуманова[1] ✉, Т.Т. Ефремова[1], Ю.В. Кручинина[1, 2], Л.А. Першина[1]

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

Гены чувствительности к яровизации (*VRN*) являются основными генетическими системами, определяющими продолжительность вегетационного периода в целом, а также длительность основных этапов органогенеза. К настоящему времени для локусов *VRN-1* описан ряд аллелей и разработаны аллель-специфичные праймеры, позволяющие проводить быструю идентификацию аллельного состава у сортов и линий мягкой пшеницы. Установлено неодинаковое влияние различных аллелей локусов *VRN-1* на продолжительность вегетационного периода, однако исследований, касающихся влияния комбинации различных аллелей на время колошения, недостаточно. Получение полных наборов всех возможных генотипов по разным аллелям доминантных генов *VRN* на одном генетическом фоне необходимо для более глубокого изучения генетических эффектов генов *VRN* на продолжительность вегетационного периода и отдельных фаз развития, а также на продуктивность. Поскольку большинство современных сортов России несет доминантные аллели двух генов *VRN* (*Vrn-A1a* и *Vrn-B1a* или *Vrn-B1c*), нами была поставлена задача – получить линии, сочетающие доминантные аллели *Vrn-A1a* с *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c* на генетическом фоне озимого сорта Безостая 1 (Без1 *Vrn-A1a*/*Vrn-B1a* и Без1 *Vrn-A1a*/*Vrn-B1c*). С использованием известных аллель-специфичных праймеров для локусов *Vrn-A1* и *Vrn-B1* в поколении F_2 были выделены гомозиготные растения. У полученных линий с комбинацией двух доминантных аллелей локусов *VRN-1* достоверно уменьшалась продолжительность периода «кущение–первый узел», который представляет собой ключевой этап, определяющий продолжительность вегетационного периода и периода от всходов до колошения по сравнению с изогенными линиями по сорту Безостая 1 с доминантными аллелями *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c*. По сравнению с изогенной линией с доминантным аллелем *Vrn-A1a* у полученных линий также произошло уменьшение продолжительности этих фаз развития, однако различия были недостоверны. Достоверных различий по продолжительности

Received August 18, 2018
Revised October 5, 2018
Accepted October 8, 2018

✉ e-mail: chumanova@bionet.nsc.ru

остальных фаз развития у линий с двумя доминантными аллелями локусов *VRN-1* относительно изогенных линий по сорту Безостая 1 выявлено не было.

Ключевые слова: линии мягкой пшеницы; продолжительность фаз развития; аллели локуса *VRN-1*; аллель-специфичные праймеры.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Chumanova E.V., Efremova T.T., Kruchinina Y.V., Pershina L.A. Development and investigation of common wheat lines of winter cultivar Bezostaya 1 with combinations of dominant alleles of *VRN-1* loci. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):951-956. DOI 10.18699/VJ18.437

The duration of the growing period in common wheat is an important adaptive trait, which determines plant productivity and resistance to biotic and abiotic stress factors: drought, low temperatures, diseases, and pests (Stelmakh, 1990; Worland, 1996; Snape et al., 2001; Cockram et al., 2007; Kamran et al., 2014). The main genetic systems that initiate the transition of wheat plants from the vegetative to the generative stage of development are the genes for vernalization (*VRN*) and photoperiod sensitivity (*PPD*) (Snape et al., 2001; Kamran et al., 2014).

The main loci that determine sensitivity to the photoperiod (*PPD-1*) in wheat were mapped on the short arms of the second homoeologous group chromosomes: 2D, 2B, and 2A (Worland et al., 1998; Snape et al., 2001).

The duration of the wheat growing period is determined by three main *VRN* genes: *VRN-1*, *VRN-2*, and *VRN-3*. The genes *VRN-1* and *VRN-3* were mapped on chromosomes of groups 5 and 7, respectively (Yan et al., 2003, 2006).

Common wheat has three homoeologous *VRN-1* loci: *VRN-A1*, *VRN-B1*, and *VRN-D1*. They are located on the long arms of chromosomes 5A, 5B and 5D, respectively (Snape et al., 2001; Yan et al., 2003). The spring habit of development is determined by the presence of at least one dominant allele; the presence of all the three recessive *vrn* alleles defines the winter habit of wheat varieties. Cultivars bearing the dominant *VRN-A1* allele are completely insensitive to vernalization, whereas cultivars with the dominant alleles *VRN-B1* and *VRN-D1* are slightly sensitive to vernalization (Pugsley, 1971).

For *VRN-1* loci (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1*), a series of different alleles was described, mutations resulting in changes in the structure of these alleles were cloned and characterized, and allele-specific primers were designed for rapid genotyping of common wheat varieties and lines (Yan et al., 2004; Fu et al., 2005; Milec et al., 2012; Shcherban et al., 2012). It was found that the dominant alleles of these loci had insertions or deletions in the promoter and the first intron.

It is known that wheat cultivars bearing the dominant *Vrn-A1a* allele are the earliest ripening. The *Vrn-A1b* allele, on the contrary, increases the duration of the heading period (Koval, Goncharov, 1998; Kamran et al., 2014). Genotypes with the dominant *Vrn-B1c* allele ripe earlier than genotypes with *Vrn-B1a* allele (Efremova et al., 2011).

It has been shown that various combinations of alleles of the *VRN* and *PPD* loci differently affect the lengths of the growing period and phases of plant development, as well as productivity. The earliest ripening genotypes are those with three dominant genes (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1*); however, they tend to have lower yields, and, for this reason, they are seldom used in breeding. The habit of most Russian varieties (including Siberia), Europe, North America and Australia is determined by two dominant genes *VRN-A1* and *VRN-B1*. These varieties ripe earlier, and they are more productive than varieties with one *VRN* gene, because such allelic composition of the *VRN-1* genes allows the plants to sustain late spring and early autumn frosts (Stelmakh, 1998; Goncharov, 2004; Efremova et al., 2016). Genotypes with the dominant *VRN-D1* gene are advantageous in regions with extreme conditions such as drought and high temperature during grain filling (Stelmakh, 1993).

In particular, the varieties predominant in Russia and West Siberia have two dominant alleles: *Vrn-A1a* and *Vrn-B1c* or *Vrn-B1a* (Shcherban et al., 2012; Likhenko et al., 2014; Efremova et al., 2016). Thus, according to (Efremova et al., 2016), the *Vrn-A1a* allele, which has the greatest effect on the length of the growing period, occurs in about 80 % in the investigated varieties of West Siberia. The frequencies of the *Vrn-B1c* and *Vrn-B1a* alleles vary among accessions within 40–50 % and 30–50 %, respectively. It was also found that the *Vrn-A1a* allele, along with *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c*, was typical for spring varieties in Europe (Milec et al., 2012; Shcherban et al., 2014). The *Vrn-A1a* allele is widely distributed among the spring varieties of Canada, USA, Argentina, and China (Yan et al., 2004; Iqbal et al., 2007; Zhang et al., 2008; Santra et al., 2009).

Isogenic lines created on the basis of winter varieties with known alleles of *PPD* genes play an important role in the detailed analysis of the *VRN* genes, which control the duration of the growing period (Stelmakh, Avsenin, 1983; Voronin, Stelmakh, 1985; Koval et al., 2001; Efremova et al., 2011). Study of such lines permits one to single out the effect of alleles of each of the *VRN* genes or different alleles of the same gene, as well as of their combinations, on the duration of the heading period (Merezhko, 1994; Koval, Goncharov, 1998; Stelmakh et al., 2000; Efremova et al., 2011), the duration of the main stages of organogenesis (Voronin, Stelmakh, 1985; Emtseva et al., 2013), and productivity and fitness (Voronin, 1988). In addition, isogenic lines are suitable models for studying the primary structure and expression of *VRN* alleles (Loukoianov et al., 2005; Shcherban et al., 2013).

A series of near-isogenic lines of winter Bezostaya 1 cv. (Bez1) possessing one dominant *Ppd-D1a* gene (determining weak sensitivity to day length (Worland et al., 1998)), with two different alleles of the *VRN-B1* gene (Efremova et al., 2011), as well as on the *VRN-A1a* and *VRN-D4* loci were raised at the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk. In these lines, different alleles of the dominant *VRN-B1* gene (*Vrn-B1a* and *Vrn-B1c*) were in the same genetic background, and this fact allowed more accurate identification of differences in the duration of the period from shoots to heading. With these lines, it was shown that the *Vrn-A1a* allele determined earlier heading than the *Vrn-B1c* and *Vrn-B1a* alleles, and the *Vrn-B1c*

Table 1. Isogenic lines of Bez1 cultivar used to obtain lines with two dominant alleles of the *VRN-1* loci

Isogenic line	Haploid genotype for *VRN* genes	Donor of the dominant *VRN* gene	References
i: Bez1*Vrn-A1a*	*Vrn-A1a vrn-B1 vrn-D1*	Triple Dirk D	Efremova (unpublished)
i: Bez1*Vrn-B1a*	*vrn-A1 Vrn-B1a vrn-D1*	Diamant II	Efremova et al., 2011; Shcherban et al., 2012
i: Bez1*Vrn-B1c*	*vrn-A1 Vrn-B1c vrn-D1*	Saratovskaya 29	»

Table 2. Primers for identifying alleles of the *VRN-A1* and *VRN-B1* genes in common wheat lines

Allele	Allele-specific primers		Amplicon size, bp	References
Vrn-A1a	VRN1AF	GAAAGGAAAAATTCTGCTCG	650 + 750	Yan et al., 2004
Vrn-A1b	VRN1R	TGCACCTTCCC(C/G)CGCCCCAT	480	
vrn-A1			500	
Vrn-B1a	Ex1/B/F3	GAAGCGGATCGAGAACAAGA	709 + 1235	Milec et al., 2012
Vrn-B1c	Intr1/B/F	CAAGTGGAACGGTTAGGACA	849	
vrn-B1	Intr1/B/R3	CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	1149	
	Intr1/B/R4	CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA		

Table 3. PCR schedules with allele-specific primers for the *VRN-A1* and *VRN-B1* genes

Allele	PCR conditions					
	Predenaturation, t^o (min)	Number of cycles	Denaturation, t^o (s)	Annealing, t^o (s)	Elongation, t^o (s)	Final elongation, t^o (min)
Vrn-A1a *Vrn-A1b* *vrn-A1*	94 (10)	40	95 (30)	55 (30)	72 (60)	72 (10)
Vrn-B1a *Vrn-B1c* *vrn-B1*	94 (2)	35	94 (30)	52 (30)	72 (90)	72 (5)

allele, in turn, reduced the duration of the period from shoots to heading as compared to the *Vrn-B1a* allele (Emtseva et al., 2013). However, since most modern commercial varieties in Russia carry the dominant alleles of two genes, *Vrn-A1a* and either *Vrn-B1a* or *Vrn-B1c*, it should be found out how the combination of different alleles of the two genes can affect the time before heading. Therefore, it is advisable to obtain lines with two alleles of these genes against the genetic background of Bez1 cv. This would allow a more detailed study of the contribution of *VRN* alleles to early maturity and productivity. It should be noted that all previously created isogenic lines and lines with two or three dominant *VRN* genes were obtained without taking into account the presence of alleles of the *VRN* genes and their role in controlling heading time. Therefore, the raise of complete sets of all possible genotypes for different alleles of the *VRN-1* loci against the same genetic background is necessary for a more comprehensive study of the genetic effects of the *VRN* loci.

The objectives of this work were (1) to obtain lines combining two different *VRN-1* loci (*Vrn-A1a*/*Vrn-B1a* and *Vrn-A1a*/*Vrn-B1c*) in one genotype on the base of previously obtained isogenic common wheat lines with dominant *Vrn-A1a*, *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c* for the winter variety Bez1 (Efremova et al., 2011) and (2) to determine the effect of the combination of alleles on the duration of individual development phases under the conditions of the forest-steppe zone of the Novosibirsk region.

Materials and methods

Plant material. Experiments were performed with (1) lines of winter cultivar Bez1 with combinations of two alleles of the *VRN-1* loci: Bez1 *Vrn-A1a*/*Vrn-B1a* and Bez1 *Vrn-A1a*/*Vrn-B1c* and (2) the parental isogenic lines of Bez1 with dominant alleles *Vrn-A1a*, *Vrn-B1a*, and *Vrn-B1c* (Table 1). The design of the raise of isogenic lines carrying the *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c* alleles from the Saratovskaya 29 and Diamant II varieties, respectively, was described in (Efremova et al., 2011). The isogenic lines of Bez1 with the dominant *Vrn-A1a* allele were obtained in a similar manner (Efremova, unpublished). The donor of the dominant *Vrn-A1a* allele for isogenic line i:Bez1*Vrn-A1a* was a Triple Dirk D isogenic line (Pugsley, 1971).

DNA isolation and PCR. Genomic DNA was isolated from leaves of adult plants after digestion with proteinase K according to a previously described method (Edwards et al., 1991). All amplification reactions were carried out in a 25 µl volume containing 50–100 ng genomic DNA, reaction buffer (67 mM Tris HCl pH 8.8, 1.5 mM $MgCl_2$, 18 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.01 % Tween 20), 0.2 mM each dNTP, 0.25 µM primer pair, and 1 unit of *Taq* polymerase.

Amplification of DNA was carried out according to our domestic protocols. The nucleotide sequences of the primers and PCR conditions are shown in Tables 2 and 3. Amplification products were resolved by electrophoresis in 1.5 % agarose gel in 1×TAE buffer with the presence of ethidium bromide.

The gels were photographed under UV illumination with the Doc-Print II documentation system for gels (Vilber Lourmat).

Study of the duration of developmental phases. The durations of individual phases of development in the lines of common wheat with dominant alleles of the *VRN-1* loci were studied in an experimental field of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS at natural daylength (At 55°2′ N, 82°56′ E, the daylength in May-August is 17 h.) in 2017. The following phases of development were recorded: shooting, the emergence of the third leaf, tillering, the emergence of the first node, stem elongation, and heading. Tillering was recorded when the second shoot began to depart from the main shoot. The first node phase was recorded when the first node was palpable on the main shoot at a height of 1 cm above the soil surface. The stem elongation phase was recorded when the first node rose to a height of about 5 cm and the second node began to separate from it. Heading was recorded when the spike was completely out of the flag leaf. The dates of developmental stages were recorded for each plant individually, and the mean values were calculated. Twenty-five plants of each line were studied.

The statistical evaluation of the data was carried out with Microsoft Excel 2013. The statistical significance of the differences between mean values was assessed by Student's *t*-test (Rokitskii, 1974).

Results and discussion

Raise of common wheat lines of winter variety Bez1 with a combination of dominant alleles of the *VRN-1* loci. Two near-isogenic lines, i: Bez1*Vrn-B1a* and i: Bez1*Vrn-B1c*, were crossed to the isogenic line i: Bez1*Vrn-A1a*. The resulting F_1 hybrids were self-pollinated. Homozygous plants with two dominant alleles of the *VRN* genes, *Vrn-A1a/Vrn-B1a* and *Vrn-A1a/Vrn-B1c*, were selected with known allele-specific primers for the *VRN-A1* and *VRN-B1* genes presented in Table 2 in the F_2 generation. Amplification of the dominant allele *Vrn-A1a* with the allele-specific primers VRN1AF and VRN1R revealed two fragments approximately 650 bp and 750 bp in size, and in the PCR of the recessive *vrn-A1* allele one fragment of about 500 bp was obtained. Correspondingly, three fragments were amplified in heterozygous plants.

Multiplex PCR with four primers Ex1/B/F3, Intr1/B/F, Intr1/B/R3, and Intr1/B/R4 was used to detect three alleles of the *VRN-B1* locus: *Vrn-B1a*, *Vrn-B1c* and *vrn-B1*. In case of the dominant *Vrn-B1a* allele, the PCR products included two fragments, 709 bp and 1235 bp. For the dominant *Vrn-B1c* allele, a fragment of 849 bp was typical. The presence of the recessive *vrn-B1* allele was judged from the presence of a 1149 bp fragment. In heterozygous *Vrn-B1a/vrn-B1* and *Vrn-B1c/vrn-B1* plants, fragments characteristic of both the dominant and recessive alleles were present (Fig. 1 and 2).

Twenty-eight plants were analyzed in the *Vrn-A1a/Vrn-B1a* combination and nineteen, in *Vrn-A1a/Vrn-B1c*. In the *Vrn-A1a/Vrn-B1a* combination, fourteen plants with two dominant alleles were isolated, five of them being homozygous, two with the dominant *Vrn-A1a* allele and recessive *vrn-B1*, ten plants with the dominant *Vrn-B1a* allele and recessive *vrn-A1*, and two winter plants with recessive alleles *vrn-A1* and *vrn-B1*. In the *Vrn-A1a/Vrn-B1c* combination, nine plants with two dominant alleles were isolated. Four of them were homozygous, one plant had the dominant *Vrn-A1a* and the recessive *vrn-B1* allele, eight plants had the dominant *Vrn-B1a* allele and recessive *vrn-A1*, and one plant showed the winter habit.

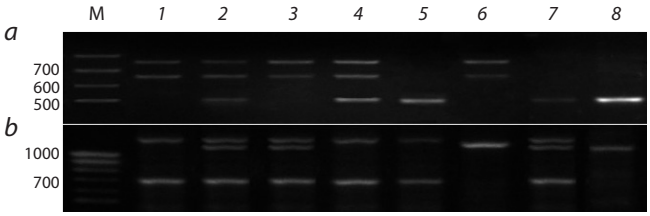


Fig. 1. Identification of alleles of *VRN-1* loci in F_2 hybrids in the raise of the Bez1 *Vrn-A1a/Vrn-B1a* line with allele-specific primers.

a – VRN-A1; b – VRN-B1. Lanes: M, 100-bp ladder; *1–8* – plant genotypes: *1 – Vrn-A1a Vrn-A1a Vrn-B1a Vrn-B1a; 2 – Vrn-A1a vrn-A1 Vrn-B1a vrn-B1; 3 – Vrn-A1a Vrn-A1a Vrn-B1a vrn-B1; 4 – Vrn-A1a vrn-A1 Vrn-B1a Vrn-B1a; 5 – vrn-A1 vrn-A1 Vrn-B1a Vrn-B1a; 6 – Vrn-A1a Vrn-A1a vrn-B1 vrn-B1; 7 – vrn-A1 vrn-A1 Vrn-B1a vrn-B1; 8 – vrn-A1 vrn-A1 vrn-B1 vrn-B1.*

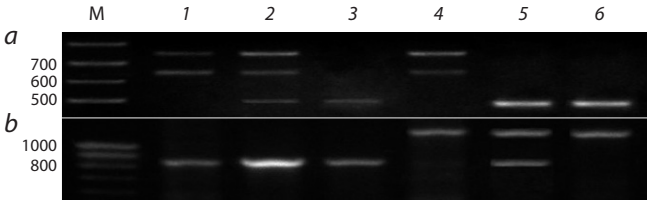


Fig. 2. Identification of alleles of the *VRN-1* loci in F_2 hybrids in the raise of the Bez1 *Vrn-A1a/Vrn-B1c* line with allele-specific primers.

a – VRN-A1; b – VRN-B1. Lanes: M, 100-bp ladder; *1–6* – plant genotypes: *1 – Vrn-A1a Vrn-A1a Vrn-B1c Vrn-B1c; 2 – Vrn-A1a vrn-A1 Vrn-B1c Vrn-B1c; 3 – vrn-A1 vrn-A1 Vrn-B1c Vrn-B1c; 4 – Vrn-A1a Vrn-A1a vrn-B1 vrn-B1; 5 – vrn-A1 vrn-A1 Vrn-B1c vrn-B1; 6 – vrn-A1 vrn-A1 vrn-B1 vrn-B1.*

Thus, by using molecular markers already in the F_2 generation, we managed to isolate homozygous plants with two dominant alleles of the *VRN-A1* and *VRN-B1* genes. This approach is the most effective in isolating genotypes for a target gene, as it shortens the time for selecting the desired genotype significantly and permits one to determine the presence of *VRN* loci at early stages of plant development. At present, marker-assisted selection complements traditional methods, and it is widely used to introgress target genes and create near-isogenic lines, especially in the breeding of lines with genes that control the resistance to various types of stress (Leonova, 2013).

Determination the effect of the combination of dominant alleles in the *VRN-1* loci on the duration of individual developmental phases in the forest-steppe zone of the Novosibirsk region. We studied the duration of individual developmental phases of the common wheat lines with two dominant alleles of the *VRN-1* loci obtained in the present work, Bez1 *Vrn-A1a/Vrn-B1a* and Bez1 *Vrn-A1a/Vrn-B1c*, in an experimental field of the Institute of Cytology and Genetics with natural daylength in the spring of 2017. Isogenic lines of Bez1 with dominant alleles *Vrn-A1a*, *Vrn-B1a*, and *Vrn-B1c* were used as controls. The results are presented in Table 4 and Fig. 3.

Isogenic line i: Bez 1*Vrn-A1a* headed on day 42. Plants of isogenic lines with dominant alleles in the *VRN-B1* locus

Table 4. Duration of developmental phases in common wheat lines with dominant alleles of the *VRN-1* loci (field, 2017)

Line	Duration of individual phases of development, days						
	shoots–third leaf	third leaf–tillering	tillering–first node	first node–stem elongation	stem elongation–flag leaf	flag leaf–heading	shoots–heading
i: Bez1*Vrn-A1a*	5.2 ± 0.7	6.6 ± 1.4	12.9 ± 2.4	3.7 ± 1.0	2.9 ± 1.2	10.5 ± 1.6	41.8 ± 2.2
i: Bez1*Vrn-B1a*	6.3 ± 2.4	5.6 ± 1.8	20.3 ± 1.7	3.6 ± 1.2	2.1 ± 1.0	10.6 ± 1.4	48.5 ± 2.9
i: Bez1*Vrn-B1c*	5.3 ± 1.1	5.7 ± 1.3	17.8 ± 2.0	3.6 ± 1.1	3.0 ± 1.3	9.5 ± 1.8	44.8 ± 2.0
Bez1 *Vrn-A1a/Vrn-B1a*	5.1 ± 1.1	5.5 ± 0.8	11.0 ± 1.1***[1]	4.1 ± 0.4	3.6 ± 1.5	10.6 ± 1.2	39.9 ± 1.1**[1]
Bez1 *Vrn-A1a/Vrn-B1c*	6.7 ± 1.5	5.3 ± 2.2	10.2 ± 1.5***[2]	4.0 ± 0.4	2.6 ± 1.5	11.0 ± 1.5	39.8 ± 1.4*[2]

Significant differences: [1] – from i: Bez1*Vrn-B1a*; [2] – from i: Bez1*Vrn-B1c*. *$p \le 0.05$, **$p \le 0.01$, ***$p \le 0.001$.

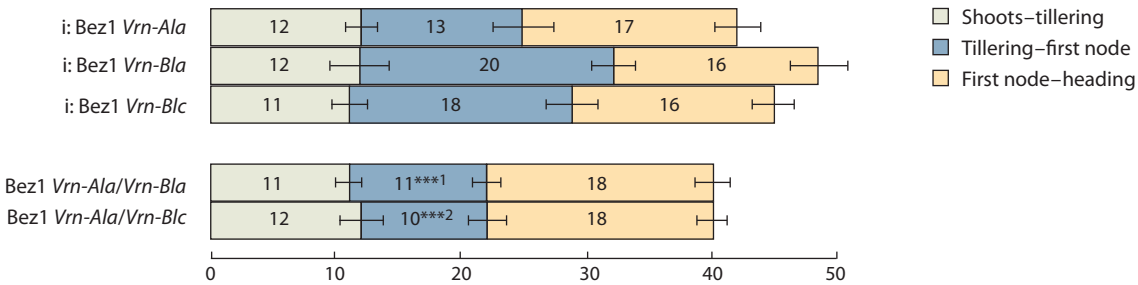


Fig. 3. Durations of developmental phases in common wheat lines with dominant alleles of *VRN-1* loci (field, 2017).
Significant differences: [1] – from i: Bez1*Vrn-B1a*; [2] – from i: Bez1*Vrn-B1c*. ***$p \le 0.001$.

headed later than the isogenic line with *Vrn-A1a*. The difference between the isogenic lines with the *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c* alleles in this experiment was four days. The isogenic line with the *Vrn-B1a* allele headed on day 49, and the line with *Vrn-B1c*, on day 45. This result is consistent with the previous work (Emtseva et al., 2013). In the lines obtained in this work with the combination of two alleles of the *VRN-1* loci (Bez1 *Vrn-A1a/Vrn-B1a* and Bez1 *Vrn-A1a/Vrn-B1c*), the period from shooting to heading was forty days, which was two days less than in the isogenic line with the *Vrn-A1a* allele (differences are not significant), and significantly shorter than in the isogenic lines i: Bez1 *Vrn-B1a* (nine days shorter) ($p \le 0.01$) and i: Bez1 *Vrn-B1c* (five days shorter) ($p \le 0.05$). It was shown that varieties with two alleles, *Vrn-A1a* and *Vrn-B1c*, headed earlier than varieties with one dominant allele, *Vrn-A1a* or *Vrn-B1c* (Efremova et al., 2016).

The durations of the main phases of development, which ultimately determine the duration of the period from shooting to heading, are shown in Fig. 3. The duration of the shoots–tillering period was approximately the same in all lines examined, 11–12 days. The length of the first node–heading period, which was 16–18 days, did not vary significantly either. Significant differences were observed only in the tillering–first node period. For lines with two dominant alleles of *VRN-1* loci (Bez1 *Vrn-A1a/Vrn-B1a* and Bez1 *Vrn-A1a/Vrn-B1c*), the tillering–first node phases were 11 and 10 days, respectively. In comparison to the isogenic line with the *Vrn-A1a* allele, for which this phase lasted 13 days, the differences were insignificant. For isogenic lines i: Bez1*Vrn-B1a* and i: Bez1*Vrn-B1c*, the durations were 20 and 18 days, respectively. The combination of the dominant *Vrn-A1a* allele with *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c* in the genotype resulted in a decrease of the tillering–first node phase compared to the isogenic lines i: Bez1*Vrn-B1a* and i: Bez1*Vrn-B1c*: nine and eight days respectively ($p \le 0.001$). Several studies of the duration of developmental phases of substituted and isogenic common wheat lines with different alleles of the *VRN-1* loci show that the key stage determining the duration of the vegetation period is just the length of the tillering–first node period (Voronin, Stelmakh, 1985; Pánková, Košner, 2004; Emtseva et al., 2013).

Thus, lines derived from the Bez1 cultivar with two dominant alleles of *VRN-1* loci (Bez1 *Vrn-A1a*/*Vrn-B1a* and Bez1 *Vrn-A1a*/*Vrn-B1c*) turned out to be earlier ripening than the isogenic lines i: Bez1*Vrn-B1a* and i: Bez1*Vrn-B1c* and slightly earlier than the isogenic line i: Bez1*Vrn-A1a* (difference about two days). Differences in the duration the shoots–heading period were associated with a decrease in the duration of the tillering–first node period.

Acknowledgements
The study is supported by the Russian Foundation for Basic Research, project No. 18-34-00146 mol_a; and State Budgeted Project No. 0324-2018-0018.

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest.

References
Cockram J., Jones H., Leigh F.J., O'Sullivan D., Powell W., Laurie D.A., Greenland A.J. Control of flowering time in temperate cereals: Genes, domestication, and sustainable productivity. J. Exp. Bot. 2007;58(6):1231-1244. DOI 10.1093/jxb/erm042.

Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucl. Acids Res. 1991;19:1349.

Efremova T.T., Arbuzova V.S., Leonova I.N., Makhmudova K. Multiple allelism in the *Vrn-B1* locus of common wheat. Cereal Res. Commun. 2011;39(1):12-21. DOI 10.1556/CRC.39.2011.1.2.

Efremova T.T., Chumanova E.V., Trubacheeva N.V., Arbuzova V.S., Belan I.A., Pershina L.A. Prevalence of *VRN1* locus alleles among spring common wheat cultivars cultivated in Western Siberia. Russ. J. Genet. 2016;52(2):146-153. DOI 10.1134/S102279541601004X.

Emtseva M.V., Efremova T.T., Arbuzova V.S. The influence of *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c* alleles on the length of developmental phases of substitution and near isogenic lines of common wheat. Russ. J. Genet. 2013;49(5):545-552. DOI 10.1134/S1022795413050050.

Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J.S., von Zitzewitz J., Hayes P.M., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. Mol. Genet. Genomics. 2005;273:54-65.

Goncharov N.P. Response to vernalization in wheat: its quantitative or qualitative nature. Cereal Res. Commun. 2004;32:323-330.

Iqbal M., Navabi A., Yang R.C., Salmon D.F., Spaner D. Molecular characterization of vernalization response genes in Canadian spring wheat. Genome. 2007;50:511-516. DOI 10.1139/G07-028.

Kamran A., Iqbal M., Spaner D. Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. Euphytica. 2014; 197:1-26. DOI 10.1007/s10681-014-1075.

Koval S.F., Goncharov N.P. Multiple allelism at the *VRN1* locus of common wheat. Acta Agron. Hung. 1998;46(2):113-119.

Koval S.F., Koval V.S., Shamanin V.P. Wheat near-isogenic lines. Omsk, 2001. (in Russian).

Leonova I.N. Molecular markers: Implementation in crop plant breeding for identification, introgression and gene pyramiding. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2013;3(6):464-473. DOI 10.1134/S2079059713060051.

Likhenko I.E., Stasyuk A.I., Shcherban A.B., Zyryanova A.F., Likhenko N.I., Salina E.A. Analysis of the allelic variation of the *Vrn-1* and *Ppd-1* genes in siberian early and medium early varieties of spring wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(4/1):691-703. (in Russian).

Loukoianov A., Yan L., Blechl A., Sanchez A., Dubcovsky J. Regulation of *VRN-1* vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat. Plant Physiol. 2005;138:2364-2373. DOI 10.1104/pp.105.064287.

Merezhko A.F. The Problem of Donors in Plant Breeding. St. Petersburg: VIR, 1994. (in Russian)

Milec Z., Tomková L., Sumíková T., Pánková K. A new multiplex PCR test for the determination of *Vrn-B1* alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Mol. Breed. 2012;30:317-323. DOI 10.1007/s11032-011-9621-7.

Pánková K., Košner J. Chromosome substitutions with dominant loci *Vrn-1* and their effect on developmental stages of wheat. Czech J. Genet. Plant Breed. 2004;40(2):37-44.

Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-wheat habit of growth in wheat. Aust. J. Agric. Res. 1971;22:23-31.

Rokitskii P.F. Introduction to Statistical Genetics. Minsk, 1974. (in Russian).

Santra D.K., Santra M., Allan R.E., Campbell K.G., Kidwell K.K. Genetic and molecular characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from the Pacific Northwest Region of the USA. Plant Breed. 2009;128:576-584. DOI 10.1111/j.1439-0523.2009.01681.x.

Shcherban A.B., Borner A., Salina E.A. Effect of *VRN-1* and *PPD-1* genes on heading time in European bread wheat cultivars. Plant Breed. 2014. DOI 10.1111/pbr.12223.

Shcherban A.B., Emtseva M.V., Efremova T.T. Molecular genetical characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from Russia and adjacent regions. Cereal Res. Commun. 2012;40(3):425-435. DOI 10.1556/CRC.40.2012.3.4.

Shcherban A.B., Khlestkina E.K., Efremova T.T., Salina E.A. The effect of two differentially expressed wheat *VRN-B1* alleles on the heading time is associated with structural variation in the first intron. Genetica. 2013;141:133-141.

Snape J.W., Butterworth K., Whitechurch E., Worland A.J. Waiting for fine times: genetics of flowering time in wheat. Euphytica. 2001; 119:185-190.

Stelmakh A.F. Geographic distribution of *Vrn* genes in landraces and improved varieties of spring bread wheat. Euphytica. 1990;45: 113-118.

Stelmakh A.F. Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat. Euphytica. 1993;65:53-60.

Stelmakh A.F. Genetic systems regulating flowering response in wheat. Euphytica. 1998;100:359-369.

Stelmakh A.F., Avsenin V.I. Creation of sets of near isogenic lines at *Vrn 1-3* loci. Nauch.-Techn. Bull. VSGI = Scientific and Technical Bulletin VSGI. 1983;48(2):24-28. (in Russian).

Stelmakh A.F., Fait V.I., Martyniuk V.R. Genetic system of the type and speed of development of common wheat. Cytologia i Genetica = Cytology and Genetics. 2000;34(2):39-45. (in Russian).

Voronin V.I. The role of the loci *Vrn 1-3* in determining the differences in productivity in comon wheat. Prikladnye Aspecty Genetiki, Tsytologii i Biotechnologii Selskochozyaistvennych Rasteniy = Applied Aspects of Genetics, Cytology and Biotechnology of Agricultural Plants. Odessa: VSGI, 1988;13-20. (in Russian).

Voronin A.N., Stelmakh A.F. Stages of organogenesis in near isogenic *Vrn 1-3* comon wheat lines. Nauch.-Techn. Bull. VSGI = Scientific and Technical Bulletin VSGI. 1985;55(1):19-23. (in Russian).

Worland A.J. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. Euphytica. 1996;89:49-57. DOI 10.1007/BF00015718.

Worland A.J., Börner A., Korzun V., Li W.M., Petrovic S., Sayers E.J. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats. Euphytica. 1998;100:385-394.

Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103;19581-19586. DOI 10.1073/pnas.0607142103.

Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. Theor. Appl. Genet. 2004;109:1677-1686.

Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J. Positional cloning of wheat vernalization gene *VRN1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003;100:6263-6268. DOI 10.1073/pnas.0937399100.

Zhang X.K., Xiao Y.G., Zhang Y., Xia X.C., Dubcovsky J., He Z.H. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. Crop Sci. 2008;48:458-470. DOI 10.2135/cropsci2007.06.0355.

ORCID ID

E.V. Chumanova orcid.org/0000-0002-2746-2307

T.T. Efremova orcid.org/0000-0002-2865-5418

Y.V. Kruchinina orcid.org/0000-0002-1084-9521

L.A. Pershina orcid.org/0000-0002-9941-2026

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):957-966
DOI 10.18699/VJ18.438

Маш и урд: перспективы возделывания и селекции в Российской Федерации

М.А. Вишнякова[1] ✉, М.О. Бурляева[1], М.Г. Самсонова[2]

[1] Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Расширение разнообразия продукции растениеводства в Российской Федерации может быть отчасти достигнуто интродукцией и привлечением в производство малораспространенных и недооцененных сельскохозяйственных культур. Маш (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) и урд (*V. mungo* (L.) Hepper) – зернобобовые культуры, возделываемые на ограниченных площадях в РФ. Между тем маш занимает около 8.5 % мировых производственных площадей под зернобобовыми культурами (без сои). Его культивируют преимущественно в странах Юго-Восточной Азии, однако в настоящее время возделывание культуры расширяется на весь субтропический пояс земного шара. В Российской Федерации эти культуры можно с успехом выращивать на поливе в ряде регионов юга Европейской части страны и Дальнего Востока, где температуры во время их вегетации около 28–30 °C и всегда выше 15 °C. Цель этой статьи – обобщение мирового опыта возделывания и селекционного улучшения маша и урда как культур, перспективных для выращивания в определенных почвенно-климатических зонах Российской Федерации. Освещаются мировое производство, направления использования этих высокобелковых культур, история и особенности селекции, в том числе в СССР. Для расширения культивирования обеих культур в РФ необходимы их популяризация и развитие селекции. Основные требования к современным сортам включают устойчивость к биотическим и абиотическим стрессорам, которая может быть интрогрессирована из диких родичей. Большое значение обеих культур в странах Азии привело к бурному развитию там молекулярных исследований. Геном урда секвенирован, геном маша секвенирован частично. Маркированы и картированы некоторые гены и QTL признаков адаптивности у ряда диких видов рода *Vigna*. Обсуждается роль диких родичей в селекции маша и урда. В мировых генбанках накоплены значительные генетические ресурсы обеих культур. Все это создает предпосылки для развития маркер-опосредованной и геномной селекции.

Ключевые слова: маш; урд; зернобобовые культуры; признаки; возделывание; селекция; генетические ресурсы; геномные ресурсы.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Вишнякова М.А., Бурляева М.О., Самсонова М.Г. Маш и урд: перспективы возделывания и селекции в Российской Федерации. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):957-966. DOI 10.18699/VJ18.438

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Vishnyakova M.A., Burlyaeva M.O., Samsonova M.G. Green gram and black gram: prospects of cultivation and breeding in Russian Federation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):957-966. DOI 10.18699/VJ18.438 (in Russian)

Green gram and black gram: prospects of cultivation and breeding in Russian Federation

M.A. Vishnyakova[1] ✉, M.O. Burlyaeva[1], M.G. Samsonova[2]

[1] Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia
[2] Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

Diversification of crop production in the Russian Federation could be partly achieved by the introduction and production of minor and underutilized crops. Green gram or mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) and black gram or urd (*V. mungo* (L.) Hepper) are grain legume crops cultivated in limited areas in the Russian Federation. Meanwhile, green gram occupies about 8.5 % of the world production area under pulses (without soybean). It is cultivated mainly in countries of Southeast Asia, but production is expanding to the entire subtropical belt of the globe. In our country these crops can be successfully grown on irrigation in a number of regions in the southern area of the European part and the Russian Far East, where the temperatures during their vegetation are about 28–30 °C and always above 15 °C. The purpose of this paper is to summarize the world's experience in breeding improvement of mung bean and urd as crops with promise for cultivation in certain soil and climatic zones of the Russian Federation. The world production, use of these high-protein crops, history and peculiarities of breeding, including in the USSR, are covered. To expand the production of both crops in the Russian Federation, their popularization and development of breeding are required. Basic requirements for modern varieties include resistance to biotic and abiotic stressors which can be introgressed from wild relatives. The great importance of both crops in the Asian countries led to the rapid development of molecular researches there. The genome of black gram has been fully sequenced, the genome of green gram has been partly sequenced. Some genes and QTL of adaptability traits have been marked and mapped in a number of wild species of the genus *Vigna*. The role of wild relatives in the breeding of crops concerned is discussed. In the world genebanks, significant genetic resources of mung bean and urd have been accumulated. All this creates prerequisites for the development of marker-assistant and genomic breeding.

Key words: green gram; black gram; pulses; biological features; production; breeding; genetic resources; genomic resources.

Received August 26, 2018
Revised October 27, 2018
Accepted October 28, 2018

✉ e-mail: m.vishnyakova@vir.nw.ru

Маш (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) и урд (*V. mungo* (L.) Hepper) – зернобобовые культуры, практически не известные большинству жителей Российской Федерации, однако пользующиеся большой популярностью у возделывающих их огородников целого ряда регионов нашей страны. В зарубежной научной литературе их относят к категории «малых» (minor) зернобобовых, в силу их невысокой социальной и экономической значимости, определяемой их местом в мировом производстве, недостаточным использованием, малой селекционной проработкой. Термин «малые» культуры отражает также их сравнительно узкое региональное значение, не достигшее пока мирового масштаба в пределах подходящих для них почвенно-климатических условий (Chivenge et al., 2015). По мнению специалистов, эти культуры заслуживают пристального внимания в силу их высокой питательной и кормовой ценности и как новые источники ингредиентов для промышленности, фармакологии и т. п. Эти культуры наряду с другими, называемыми также «недоиспользуемыми» (“underutilized”), находятся под неустанным вниманием ФАО (FAO) – Организации по продовольствию и сельскому хозяйству – с целью их пропаганды и масштабного продвижения в сельскохозяйственное производство (Padulosi et al., 2002).

Маш и урд – высокобелковые растения, семена которых употребляются преимущественно для продовольственных целей. В определенной степени их применяют и как кормовые культуры: в качестве высокобелковых добавок, сена, силоса и соломы (Mogotsi, 2006). Как все бобовые, за счет симбиоза с полезной почвенной микробиотой они играют значительную средообразующую функцию. Маш накапливает 58–109 кг/га атмосферного азота (Ali, Gupta, 2012), что позволяет использовать обе культуры так же, как сидеральные и покровные. Кроме того, они имеют значительную агрономическую ценность для маргинальных областей растениеводства, поскольку приспособлены к экстремальным условиям земледелия, в частности к засушливым и полузасушливым районам (Stagnari et al., 2017).

Маш и урд относятся к теплолюбивым культурам. Основные районы их производства ограничены 40° северной и южной широт со среднесуточными температурами во время вегетации не менее 20 °C (Lawn, Ahn, 1985). Однако исторические и современные данные свидетельствуют об успешной интродукции этих культур в почвенно-климатические условия, присущие ряду регионов Российской Федерации: юга Европейской части страны и Дальнего Востока (Павлова, 1952; Носирова, 2012; Курьянович, 2017; Бурляева и др., 2018). Обе культуры популярны у огородников и владельцев мелких хозяйств. Многолетнее изучение генофонда маша и урда, имеющегося в коллекции ВИР, в Астраханской области свидетельствует о хорошем потенциале продуктивности скороспелых и среднеспелых сортов в Нижнем Поволжье. Средний многолетний показатель семенной продуктивности при возделывании на поливе достигает 41–60 г/растение у образцов, созревающих за 69–80 дней, и более 80 г/растение – при вегетационном периоде 81–90 дней (Бурляева и др., 2014), в пересчете на урожайность это 2.0–3.0 и 4.0 т/га соответственно. В Российской Федерации не занимаются селекцией маша и урда. Однако еще в начале 1930-х гг. первые сорта маша были созданы в СССР на основе коллекции ВИР на Среднеазиатской опытной станции института.

Цель настоящей статьи – обобщение мирового опыта производства и селекционного улучшения маша и урда как культур, перспективных для возделывания в определенных почвенно-климатических зонах Российской Федерации.

Ботаническая характеристика. *Vigna* Savi (Fabaceae) – большой род из трибы Phaseolinae сем. Fabaceae с пантропическим ареалом. Сведения о числе видов, входящих в род *Vigna*, противоречивы: одни систематики считают, что их 82 (Marechal et al., 1978), другие относят к роду более 100 диких и 10 окультуренных видов (Takahashi et al., 2016), в международной базе данных бобовых (ILDIS World Database of Legumes, 2009) – 118 видов.

По систематическому положению виды *Vigna* наиболее близки к родам *Phaseolus* L. (Фасоль) и *Dolichos* L. (Гиацинтовые бобы) (Дитмер и др., 1937).

Vigna radiata и *V. mungo* – близкородственные виды, ранее относимые к роду *Phaseolus*. Систематика этих видов не обошлась без некоторой путаницы. Сначала *V. radiata* фигурировал как *Phaseolus mungo* L., в последующем был узаконен как *P. aureus* (Roxb.) Piper. и только в середине XX века – как *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). Одним из следствий этой путаницы является второе название маша в русском языке – мунг и английское название культуры – mung bean. При наличии самостоятельного вида *V. mungo* (L.) Hepper, называемого в русском языке урд, а в английском urd bean, это выглядит неким алогизмом.

Оба вида – травянистые однолетние растения. Морфологические различия между ними касаются прежде всего бобов: числа семян в них, их длины и положения на цветоносе. У *V. radiata* бобы длинные, 6–18 см, с 7–15 семенами, у *V. mungo* – короткие, не длиннее 6 см, волосистые, расположены вертикально, имеют 4–10 семян. Семена у *V. radiata* зеленоватые, желтые, желто-коричневые, черные, рубчик белый. Масса 1 000 семян – 12–100 г. У *V. mungo* семена черные, серо-черные или пестрые, хорошо отличимые по белому сильно выдающемуся на поверхности семени рубчику. Масса 1 000 семян – 15–100 г.

Высота растений маша составляет 15–120 см, урда – 30–100 см. У обоих видов стержневые корни, очередные, тройчатые листья; форма растений сильно варьирует: от прямостоячей до стелющейся. Растения урда сильно опушены сравнительно короткими прижатыми волосками. Венчик у обоих видов со спирально изогнутой лодочкой с роговидным придатком. У маша цветки желтые, желто-зеленые, иногда с розоватым оттенком, у урда – ярко-желтые и желтые (Иванов, 1949; Павлова, 1952; Watt, Marechall, 1977; Бурляева и др., 2016).

Оба вида имеют одинаковое число хромосом ($2n = 2x = 22$), сходные кариотипы и дают частично фертильное потомство при скрещиваниях, когда *V. radiata* используется как материнское растение (Sen, Ghosh, 1963; Dana, 1966; De, Krishnan, 1966; Verma, Singh, 1986). В реципрокных скрещиваниях получают нежизнеспособное потомство и пониженную фертильность пыльцы. Цитологические

исследования выявили различия видов по хромосомным транслокациям, делециям и дупликациям (De, Krishnan, 1966; Ravi et al., 1987). Самостоятельный видовой статус для обоих видов доказан также с помощью белковых (Jaaska V., Jaaska V., 1989) и молекулярных (Dikshit et al., 2007) маркеров.

Происхождение. Маш и урд – представители группы наиболее древних сельскохозяйственных культур. Родина *V. radiata* и *V. mungo* – Персия (Иран), где они были окультурены (Tomooka et al., 2003; Fuller, 2007). При этом не исключают возможности доместикации маша еще в двух регионах: Северо-Западной Индии, где его обугленные остатки относят к Бронзовому веку (4500 лет назад) и Южной Индии (4000 лет назад), где происходило укрупнение семян (Fuller, 2007). Археологические находки свидетельствуют о том, что этот процесс растянулся по времени не менее чем на тысячелетие после начала использования маша как культурного растения (Fuller, Harvey, 2006). Долгое время предком обоих видов считали дикий вид *V. sublobatus* Roxb. (Verdcourt, 1970), по другим версиям – подвид *V. radiata* subspecies *sublobata*. Однако более поздние исследования показали, что *V. radiata* и *V. mungo* имеют независимое происхождение – от двух четко различающихся диких видов *V. radiata* var. *sublobata* и *V. mungo* var. s*ilvestris* соответственно (Chandel et al., 1984).

Полагают, что дикий родич маша до сих пор произрастает в Индии и Бирме, а также в Северной и Восточной Австралии (Aykroyd, Doughty, 1964; Purseglove, 1977; Lawn, Cottrell, 1988). Многочисленные исследования установили, что он служит источником множества адаптивных качеств: устойчивости к фасолевой зерновке (Srinives et al., 2007), вирусу желтой мозаики (Singh, Ahuja, 1977), толерантности к засухе (Ignacimuthu, Babu, 1984), засоленным и щелочным почвам (Lawn, Cottrell, 1988), и имеет еще целый ряд ценных свойств для улучшения культурного вида.

С Индийского субконтинента маш распространился в Китай, Юго-Восточную Азию, а затем и в Африку, в отличие от урда, который из Индии не пошел дальше Мьянмы (Castillo, Fuller, 2010). В Средней Азии начало возделывания маша относят к нашей эре, но также к достаточно далеким временам – IX в. (Гафуров, 1989). Настоящее время можно назвать новым этапом распространения маша и урда по миру. Они становятся востребованными во многих странах Европы, Америки и в Австралии.

Производство. Маш занимает около 8.5 % мировых производственных площадей под зернобобовыми культурами (без сои) – 6 млн га. Годовой валовый сбор достигает 3 млн т зерна (5 % мирового производства зернобобовых, без сои). Главный мировой производитель и потребитель маша – Индия. На ее долю приходится 65 и 54 % мировых посевных площадей и валового сбора соответственно (Ali, Gupta, 2012). В силу скороспелости маш высевают здесь как промежуточную культуру между двумя основными, к примеру, между пшеницей, томатами, горчицей, сахарным тростником. Статистические данные производства обеих культур в разных странах мира нам не доступны. В базе данных ФАО (faostat http://www.fao.org/faostat/en/) они отсутствуют. Однако известно, что в промышленных масштабах маш производят в Китае, Индонезии, Таиланде, Мьянме, на Филиппинских островах, в Австралии и во всем субтропическом поясе земного шара. Его возделывают в засушливых условиях Южной Европы и в некоторых американских штатах.

В СССР маш выращивали в южноазиатских республиках, где он считается стародавней культурой. Его использовали там преимущественно в качестве «вторичной» (пожнивной) культуры после озимых зерновых – пшеницы и ячменя, получая урожай семян 10–20 ц/га. Среднеспелые сорта требовали суммы активных температур выше 10 °С 2250 °С. Получали также значительные урожаи зеленой массы, однако при небольших заморозках (–1 °С) она погибала. Достоинство пожнивных посевов заключалось в том, что они служили существенным резервом в условиях малоземелья, а использование их в качестве сидератов позволяло увеличивать последующий урожай хлопчатника на 50 % (Павлова, 1952; Павлова, Глушенкова, 1962). В настоящее время маш по-прежнему возделывают в среднеазиатских странах СНГ. Узбекистан является крупным экспортером маша, поставляет на мировой рынок до 67 тыс. т в год (https://nuz.uz/ekonomika-i-finansy/28118). В небольших масштабах маш и урд культивируют в Закавказье.

В 1950-е гг. экспериментальные посевы маша проводились в системе опытных станций ВИР на юге Молдавии, Украины и Северного Кавказа, где культура получила положительную оценку (Павлова, 1952). Сегодня маш входит в разряд нишевых культур, производство которых на пике популярности на Украине (http://propozitsiya.com/nyshevye-kultury-kotorye-mogut-byt-podstrahovkoy-dlya-selhozproyzvodytelya).

Урд, в отличие от маша, – менее распространенная культура. Ведущим производителем также является Индия, где получают ежегодно до 1.5 млн тонн урда, идущего полностью на внутреннее потребление (Sharma et al., 2011). Главными экспортерами урда выступают Мьянма и Таиланд (CRN India, 2011). Его используют в смешанных посевах с другими бобовыми (арахис, гуар), техническими (хлопчатник, сахарный тростник) и зерновыми культурами (сорго, просо и жемчужное просо). Это способствует повышению их урожайности на 42–53 % (Jansen, 2006; Krishna, 2010).

В Российской Федерации оба вида способны произрастать в почвенно-климатических условиях, присущих целому ряду регионов юга Европейской части страны и Дальнего Востока. Основные площади возделывания маша сконцентрированы на Северном Кавказе, в Прикаспийской низменности и на юге Приморского края, преимущественно в фермерских и личных хозяйствах. Известны положительные результаты возделывания маша в Среднем Поволжье (Курьянович, 2017).

Биологические особенности маша и урда. Многие виды из рода *Vigna* толерантны к неблагоприятным условиям среды, включая сильно засоленные, кислые, щелочные, подтопленные почвы, обладают засухоустойчивостью, устойчивостью к вредителям и болезням. Более того, некоторые из устойчивых и восприимчивых видов репродуктивно совместимы, что облегчает задачу поиска соответствующих генов адаптивности (Chankaew et al., 2014; Tomooka et al., 2014; Yoshida et al., 2016).

Маш и урд отличаются скороспелостью в условиях тропиков и субтропиков, где оптимальные температуры около 28–30 °C и всегда выше 15 °C. Это культуры короткого дня, но известно наличие нейтральных по реакции на фотопериод сортов (Akpapunam, 1996). Маш может произрастать от низинных мест до высот 2000 м над уровнем моря, как правило, в достаточно засушливых условиях, предпочитает плодородную суглинистую, хорошо дренированную почву с pH = 5.5–8.2 (Krishna, 2010). Урд лучше растет на более легких почвах с pH 4.7–7.5 (Jansen, 2006; Baligar, Fageria, 2007). По отношению к осадкам у обеих культур существует определенная внутривидовая дифференциация. Скороспелые сорта могут произрастать в полуаридных условиях при наличии 600–900 мм осадков в год; среднеспелые и позднеспелые сорта требуют большего годового количества осадков: 900–1500 мм (Tomooka et al., 2003).

При выращивании маша в Закавказье и среднеазиатских республиках в первой половине XX века был отмечен замедленный рост надземной части растений в первую половину лета до сформирования мощной корневой системы. Данное обстоятельство препятствует созреванию позднеспелых сортов в этих районах (Иванов, 1929).

На орошаемых сероземах Гиссарской долины Центрального Таджикистана оптимальный срок посева пожнивного маша – третья декада июня. Инокулирование семян ризоторфином, норма высева 450 тыс. семян/га и соблюдение других технологических приемов обеспечивают урожайность зерна 2.0–2.1 т/га (Носирова, 2012).

Оба вида – самоопылители. Опыление происходит в закрытом бутоне, как у целого ряда видов фасоли. Ценная особенность обеих культур – длительное сохранение жизнеспособности семян: более 25 лет (Павлова, 1966).

Химический состав семян. В семенах маша от 19.5 до 28.5 % белка (в среднем 24–26 %), 51 % углеводов, 3.78–4.34 % масла, 3 % витаминов, в частности группы B, фолиевая кислота, 4 % минералов: кальций, магний, фосфор, натрий, калий, селен, медь, большое количество железа. Показано, что железо и фолиевая кислота в семенах маша превышают содержание этих соединений у многих зернобобовых культур (Keatinge et al., 2011; Tresina et al., 2014). Как у всех бобовых культур, в белке ограниченное содержание аминокислот метионина и цистина (Afzal et al., 2008), но при этом больше лизина, чем у других возделываемых представителей из семейства Fabaceae. В масле определены линолевая, пальмитиновая, олеиновая, линоленовая, стеариновая и арахидоновая жирные кислоты. Семена маша – богатый источник токоферолов (Anwar et al., 2007), количество олигосахаридов незначительно (Adsule et al., 1986).

Основные биохимические параметры семян урда очень схожи: белка 24.37–26.22 %, углеводов 61.24–64.43 %, масла 2.94–4.24 %, в большом количестве натрий, калий и фосфор. Содержание незаменимых аминокислот высокое по сравнению со стандартами ФАО/ВОЗ (Protein quality evaluation…, 1991). В масле высокая концентрация линолевой и линоленовой кислот. Антипитательные вещества (фенолы, танины, фитиновая кислота, цианиды, лектин, ингибиторы трипсина) в семенах обеих культур присутствуют в незначительных количествах и инактивируются при тепловой обработке в процессе приготовления пищи (Tresina et al., 2010, 2014).

Использование. Главное применение культур, как сказано выше, продовольственное. Оно имеет специфические особенности в разных странах и разных регионах мира. В Индии употребляют в пищу в основном лущеные и дробленые семена. В Индии и Китае используют также муку из сушеных бобов. Большую популярность имеют зеленые бобы (в технической спелости) в качестве овоща, который отваривают, маринуют. В Китае и США особую популярность имеют проростки семян маша, очень часто принимаемые за проростки семян сои (Guleria, Kumar, 2017). В азиатских странах популярно использование муки маша в кондитерской промышленности для приготовления конфет, печенья, десертов. Из маша готовят главное блюдо аюрведической кулинарии – кичари, состоящее из смеси лущеного маша с рисом и специями. Это сбалансированная пища, считающаяся в Индии совершенной. Она легко переваривается, придает человеку силу и жизнестойкость. Кичари рекомендуют для монодиеты и употребляют при прохождении аюрведических очистительных программ (Oghbaei, Prakash, 2017). Из крахмала маша готовят лапшу, которая в России известна как «стеклянная» лапша, иногда называемая также рисовой.

Таким образом, продовольственное использование маша очень разнообразно и, по-видимому, его возможности еще не исчерпаны.

В Индии и Пакистане с древности эти культуры наделяли свойствами противоядий и употребляли в медицинских и косметических целях (Sharma, Mishra, 2009). Известны их антигипертензивные и антидиабетические свойства. У маша, как и у целого ряда других зернобобовых, показана антиканцерогенная активность (Kumar, Singhal, 2009). Урд снижает уровень холестерина в крови (Indira, Kurup, 2003).

Генетические ресурсы. Для расширения генетической основы сельскохозяйственных культур в селекционный процесс должно привлекаться максимальное разнообразие, имеющееся в их генофондах. Источником такого разнообразия служат коллекции генетических ресурсов растений. Коллекциями маша располагают около 35 научных учреждений мира, в общей сложности содержащих более 25 тыс. образцов. Коллекций урда значительно меньше (Bisht, Singh, 2013). Наиболее крупные коллекции маша и урда на сегодняшний день сохраняются во Всемирном центре овощеводства (Тайвань); Институте гермоплазмы растений Китайской академии сельскохозяйственных наук (Пекин); в Национальном бюро генетических ресурсов растений Индийского совета сельскохозяйственных исследований (Нью-Дели); Университете Филиппин (Манила), Японском Центре генетических ресурсов Национального института агробиологии (Цукуба), Группе по сохранению генетических ресурсов растений Университета Джорджии, США (Ebert, 2013). Самая старая коллекция, которой более ста лет, сохраняется в ВИР (Санкт-Петербург, Россия). Она насчитывает 1634 образцов маша из 74 стран мира и 219 урда из 14 стран. Среди них – уникальные местные образцы из мест происхождения культур, а также Афганистана и Средней Азии, собранные Н.И. Вавиловым. Число образцов, поступивших из того или иного региона

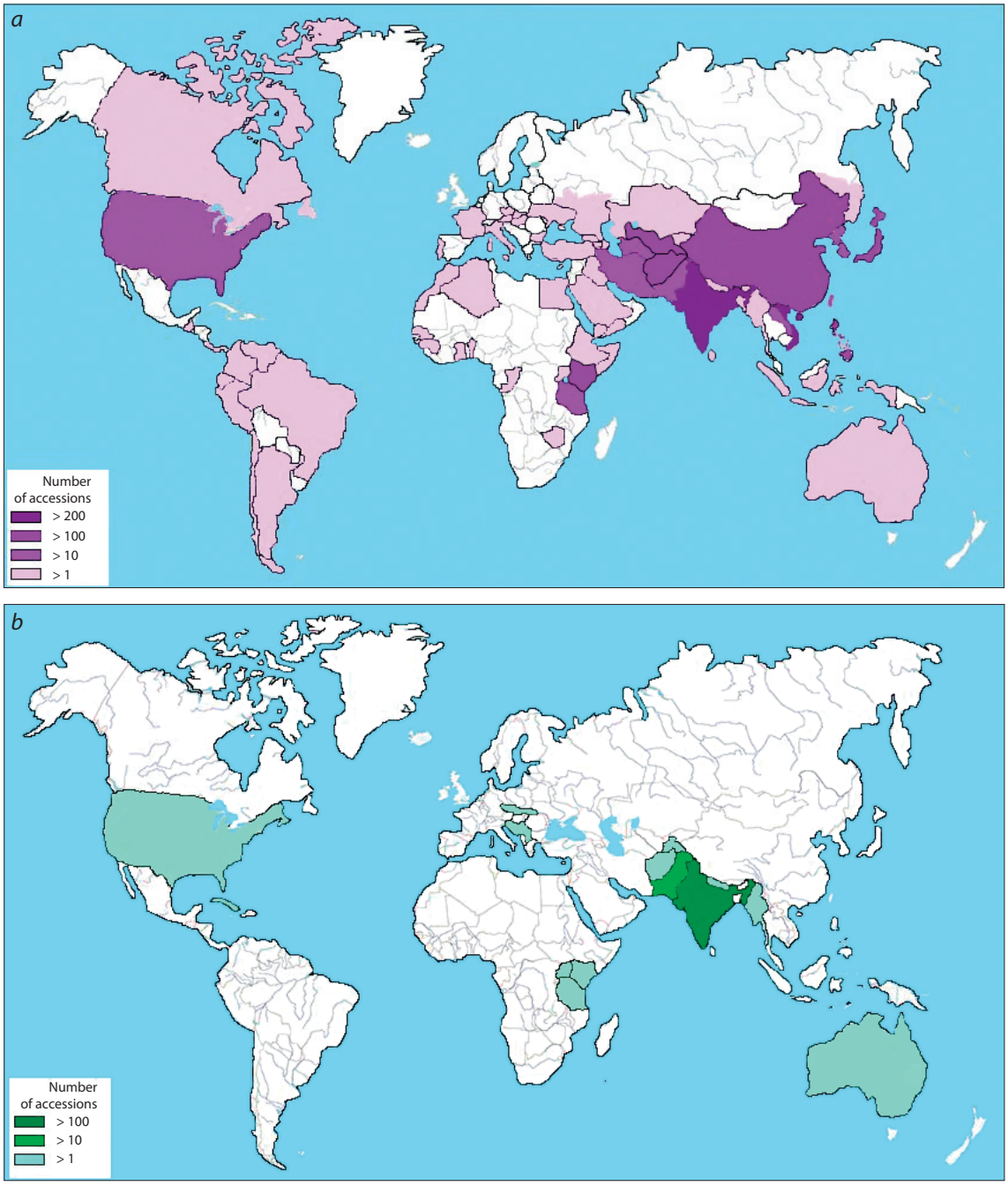


Fig. 1. Numbers of VIR accessions of (*a*) mung bean and (*b*) mungo bean sampled in various geographic regions.

мира, как правило, отображает генетическое разнообразие культуры и степень ее производства/популярности в этом регионе (рис. 1). Наиболее изучена фенотипически и генотипически коллекция маша Всемирного центра овощеводства – самая большая в мире (6742 образцов). Для более оперативной работы с коллекцией в Центре были созданы коколлекции (core-collections) – репрезентативные выборки, сохраняющие максимальное генетическое разнообразие. Большая коколлекция – создана на основе оценки восьми фенотипических признаков, содержит 1481 образец, малая, или мини-коколлеция – выборка из первой после использования 20 SNP-маркеров – насчитывает 296 образцов (Schafleitner et al., 2015).

Коллекцию ВИР изучали по наиболее важным в селекции вигны признакам: фенология, продуктивность растения, масса 1000 семян, устойчивость к вирусной мозаике. Наиболее ценные образцы, собранные Н.И. Вавиловым и Е.Н. Синской, были исследованы по 23 морфологическим и хозяйственно ценным признакам, включая устойчивость к абиотическим и биотическим неблагоприятным факторам: высоким температурам воздуха, засухе, избыточной влажности воздуха и пониженной сумме активных температур, засоленности почв, вирусным заболеваниям (Вишнякова и др., 2012; Бурляева и др., 2018). Все эти ресурсы могут быть исходным материалом для селекции.

Необходимо отметить, что обе культуры, особенно маш, в последние годы стали объектом пристального изучения больших коллективов ученых в странах-производителях культур. В 2017 г. создана Международная сеть улучшения маша (International Mungbean Improvement Network, IMIN), объединившая усилия ученых Индии, Мьянмы, Бангладеша, Австралии и финансируемая правительством Австралии. В задачи этой организации входит объединение генетических ресурсов маша и его диких родичей из разных стран с целью поиска исходного материала для создания новых улучшенных сортов (Establishing the International Mungbean Improvement Network, 2016).

Селекция маша и урда. До середины XX века во всем мире культивирование обеих культур было основано на местных сортах-популяциях. Их селекционное улучшение даже в ведущих странах-производителях началось сравнительно недавно. Однако отмечается, что продуктивность современных сортов мало растет со временем, что объясняют отсутствием генетического разнообразия, низким уборочным индексом, отсутствием соответствующих идеотипов сортов для разных систем земледелия, неодновременным созреванием и восприимчивостью к болезням и вредителям (Souframanien, Gopalakrishna, 2006). К ключевым биотическим стрессорам относят вирус желтой мозаики маша (MYMV), вирус листовой морщинистости урда (UCLV), фузариозное увядание (*Fusarium oxysporum*) и мучнистую росу (*Erysiphe polygoni DC*) (Vishalakshi et al., 2017).

Самоопыление в бутоне затрудняет тактику гибридизации, поэтому преимущественными методами селекции маша стали физический и химический мутагенез (Javed et al., 2014) и межвидовые скрещивания (Pandiyan et al., 2010). Оба вида более или менее успешно скрещиваются с другими культивируемыми видами рода *Vigna*. К примеру, гибриды получены между *V. radiata* с *V. trilobata* (L.) Verdc. и *V. umbellata* (Thumb.) Ohwi et Ohashi (Dana, 1966). Позднее впечатляющие результаты были получены в скрещиваниях *V. radiata* с 13 дикими видами рода *Vigna*. Некоторые из них привели к получению интересных в селекционном плане линий. Например, гибриды *V. radiata* × *V. umbellata* в течение девяти сезонов сохраняли устойчивость к вирусным заболеваниям (Pandiyan et al., 2010).

В СССР селекцию маша начали в 1930-е годы в системе ВИР – на Среднеазиатской опытной станции. Автор первых сортов, А.М. Павлова, создала их методами индивидуального отбора и внутривидовой гибридизации. Первым районированным во многих областях Узбекистана и Туркменистана, в Каракалпакской АССР был скороспелый сорт Победа 104, полученный на основе западнокитайских образцов. Семена этого сорта содержали 28–31 % белка, в пожнивном посеве он созревал за 60 дней (Павлова, Глушенкова, 1962). В странах Средней Азии этот сорт до сих пор не выходит из производства. В Российской Федерации селекцией маша и урда не занимались. Однако в последние годы интенсифицировались селекция и культивирование одного из видов рода *Vigna* – коровьего гороха (*V. unguiculata* (L.) Walp). В настоящее время районировано уже 19 сортов, рекомендованных для личных подсобных хозяйств, при этом 18 сортов – овощного направления использования и один – зернового.

Маш и урд на пороге геномной селекции. Учеными азиатских стран неоднократно предпринимались попытки развития различных геномных ресурсов для интенсификации маркерной селекции этих культур. Для анализа генетического разнообразия использовали маркеры: RFLP, RAPD, AFLP, SSR и ISSR. Эти работы проводились преимущественно на представителях *V. radiata* и обобщены в ряде обзоров (Kim et al., 2015; Souframanien, Reddy, 2015; Nath et al., 2017; Mathivathana et al., 2018). На основе использования SSR-повторов в качестве маркеров в популяциях рекомбинантных инбредных линий, полученных от скрещивания двух сортов, устойчивых к засухе на разных стадиях онтогенеза, построена генетическая карта *V. radiata.* Она включает 313 маркеров, имеет суммарную длину 1010.18 cM и 11 групп сцепления, что соответствует гаплоидному числу хромосом, покрывая весь геном маша с плотностью один маркер на 3.23 cM (Liu et al., 2017). Для *V. mungo* разработаны две версии карт групп сцепления для всех 11 хромосом. Первая – с маркированием 148 локусов (Chaitieng et al., 2006), вторая – с использованием 428 молекулярных маркеров, с суммарной длиной 865.1 cM и со средней плотностью один маркер на 2 cM (Gupta et al., 2008).

Создание генетических карт сцепления позволило начать работы по поиску и картированию генов и QTL, контролирующих агрономически важные признаки. При фенотипировании образцов маша в двух географических точках Китая (Щицзячжуан и Пекин) на поливе и на богаре было идентифицировано 58 локусов количественных признаков маша: устойчивость к вирусу желтой мозаики, устойчивость к мучнистой росе, церкоспориозу и зерновке, высота растения, максимальная поверхность листа, масса растения, время цветения, продуктивность; а также пять QTL, связанных с устойчивостью к засухе (Liu et al., 2017) (рис. 2).

В результате сравнительного картирования геномов маша и ряда других зернобобовых культур, включая аздуки (*V. angularis* (Wild.) Ohwi et Ohashi), фасоль, коровий горох (*V. unguiculata*), сою и долихос, выявлены различные уровни макросинтении, в зависимости от вида. Наиболее высокий уровень макросинтении обнаружен между геномами маша и фасоли. При сравнении карт хромосом маша и адзуки установлена высокая степень колинеарности геномов.

Были предприняты попытки разработки BAC-библиотек маша с целью клонирования отдельных генов и QTL.

Последовательности EST и геномные базы перечисленных бобовых культур могут быть использованы для разработки эффективных маркеров, таких как SSR, для генотипирования. Эти ресурсы перспективны для выявления генов, картирования и маркер-опосредованной селекции данных близкородственных видов (Souframanien, Dhanasekar, 2014).

Размер генома *V. radiata* – 579, а *V. mungo* – 574 Мб (Arumuganathan, Earle, 1991). Секвенирование генома *V. radiata* было завершено в 2014 г. (Kang et al., 2014). Секвенированы также хлоропластный и митохондриальный геномы маша. Для лучшего понимания процессов доместикации, полиплоидизации и видообразования в роде *Vigna* было выполнено полногеномное секвенирование

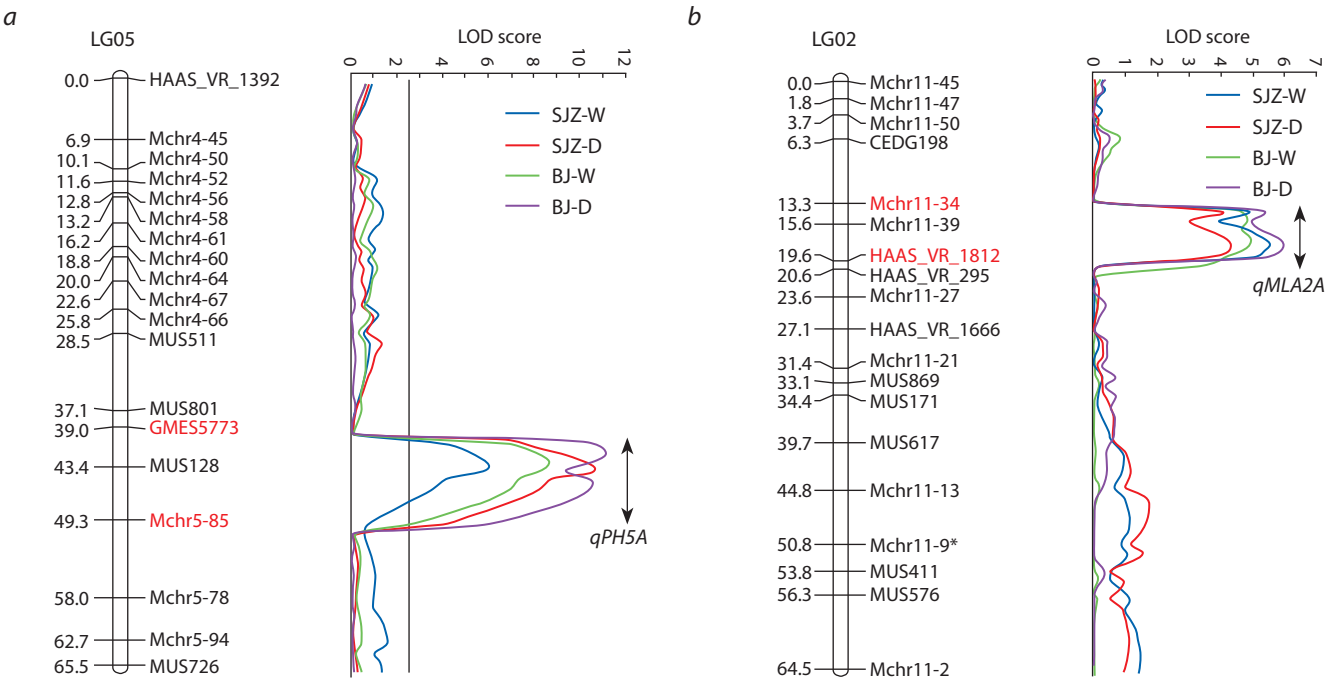


Fig. 2. Two stable mung bean QTLs controlling plant height (PH) and the maximum leaf area (MLA) in four experimental designs.

Linkage groups (*a*) LG05 and (*b*) LG02, containing the stable QTL associated with PH (qPH5A) and with MLA, respectively, in recombinant inbred lines (RIL). The LOD scores for QTLs in the RIL populations grown in four different environments are shown with differently colored lines. Designations of conditions: SJZ-W, Shijiazhuang, watered field; SJZ-D, Shijiazhuang, dryland; BJ-W, Beijing, watered field; BJ-D, Beijing, dryland. Red markers are boundaries for QTLs. The solid line shows the LOD threshold (2.5), according to Liu et al., 2017).

предка и дикого родича маша (*V. radiata* var. *sublobata* Hayata) и его тетраплоидного родича (*V. reflexo-pilosa*) и получены транскриптомные последовательности 22 образцов 18 видов вигны (Kang et al., 2014). Геном *V. mungo* еще не опубликован, но недавно был секвенирован геном еще одного диплоидного азиатского вида, *V. angularis* (Kang et al., 2015). Он имеет сходный с геномами маша и урда размер – 612 Мб. Аннотированная информация об этих геномах и геномах других зернобобовых содержится в базе данных Legume Information Resource (https://legumeinfo.org/). Из-за короткого жизненного цикла и небольшого размера генома виды *Vigna* служат подходящими модельными объектами для изучения геномной организации и улучшения агрономических признаков у бобовых. Проведенное полногеномное секвенирование маша ускорило исследования по геномике других видов *Vigna* и, скорее всего, ускорит программы их селекции.

Для незрелых семян *V. mungo* собран транскриптом, представленный 48 291 контингами с медианной длиной 200–299 п. н. Показано, что 33.766 контингов обнаруживают существенное сходство (73.91 %) с последовательностями известных белков (Souframanien, Reddy, 2015), причем наибольшее сходство наблюдалось с последовательностями фасоли обыкновенной – *Phaseolus vulgaris* L. (50 %) и сои – *Glycine max* (L.) Merr (11 %), т. е. с таксономически близкими зернобобовыми культурами (рис. 3).

Дикие родичи культурных растений всегда привлекали внимание в качестве потенциальных генетических ресурсов для улучшения сельскохозяйственных культур. В настоящее время этот интерес многократно усилился

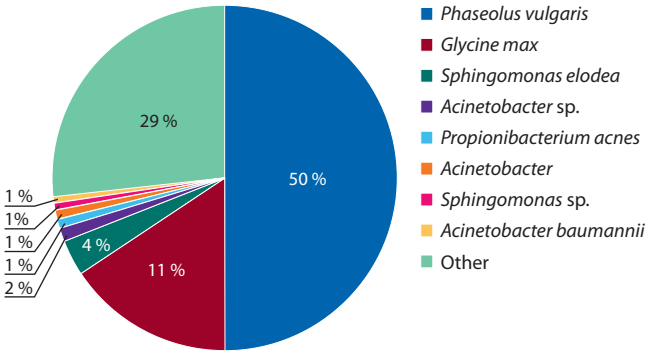


Fig. 3. Pie graph of the similarity (BLASTx, E-statistics threshold 10^{-5}) between sequences of mungo bean contigs and other proteins of the deduplicated NCBI database (Souframanien, Reddy, 2015).

(McCouch et al., 2013; Dempewolf et al., 2017). Фактически были предложены новые концепции селекции, такие как неодоместикация и обратная селекция, пытающиеся использовать желательные признаки диких видов для интрогрессии в культивируемые (Tomooka et al., 2014; Palmgren et al., 2015). Как сказано выше, дикие виды рода *Vigna* – хорошие источники качеств адаптивности. Изучаются молекулярные механизмы устойчивости диких видов вигны к засухе, засоленным почвам (Iseki et al., 2016, 2018) и другим неблагоприятным факторам, что делает род *Vigna* потенциально ценной новой модельной системой для изучения адаптации растений к стрессовой

среде. Создание селекционных программ на основе новых прорывных технологий позволит получить сорта маша и урда с требуемыми качествами для возделывания в Российской Федерации.

В настоящее время растениеводство Российской Федерации стоит перед необходимостью расширения отечественного сортимента сельскохозяйственных культур и диверсификации продукции. Решение этих задач зависит от множества составляющих, из которых можно вычленить расширение ареалов возделывания культур, а также интродукцию и привлечение в сельскохозяйственное производство новых и нетрадиционных видов растений. Маш и урд, ограниченно возделываемые в нашей стране, являются культурами, которые могут способствовать решению этих проблем, позволят расширить ресурсно-сырьевую базу и внести вклад в повышение качества жизни человека. Это определятся многофункциональностью зернобобовых культур, в том числе маша и урда. Перечень регионов, по агроклиматическим условиям соответствующих возделыванию маша и урда в Российской Федерации, сравнительно широк, а спектр использования культур разнообразен.

Обе культуры стали в последние годы объектами интенсивных геномных исследований. Небольшие объемы геномов *V. radiata* и *V. mungo* наряду с геномами других культурных и диких видов рода *Vigna* позиционируют их как перспективные модельные объекты. Наличие большого генофонда диких родичей с изученными молекулярными механизмами адаптивности к целому набору стрессоров открывает перспективы для обратной селекции и неодоместикации маша и урда посредством молекулярных технологий. Необходимы соответствующие внимание, интерес и инвестиции в эти перспективные культуры, способные стать инновационными и в России.

Acknowledgements
This study was supported by the Russian Science Foundation, Russia–Taiwan project 18-46-08001. Data obtained at the unique research facility VIR collection of plant genetic resources were employed.

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References
Бурляева М.О., Гуркина М.В., Тихонова Н.И. Маш, урд. Исходный материал для селекции при орошении в условиях Прикаспийской низменности. Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 818. СПб., 2014.
[Burlyaeva M.O., Gurkina M.V., Tikhonova N.I. Mung bean and mungo bean: The initial material for breeding under irrigation in the Caspian Lowland. Catalog of the World VIR Collection. St. Petersburg, 2014; Issue 818. (in Russian)]

Бурляева М.О., Гуркина М.В., Чебукин П.А. Виды рода *Vigna* Savi в коллекции ВИР: эколого-географическое разнообразие и перспективы использования. Труды XIV Съезда Русского ботанического общества и конференции «Ботаника в современном мире». Махачкала, 2018;2:371-373.
[Burlyaeva M.O., Gurkina M.V., Chebukin P.A. Species of the genus *Vigna* Savi in the VIR collection: ecogeographical diversity and prospects for use. Proc. of the XIV Congress of the Russian Botanical Society and the conference “Botany in the Modern World”. Makhachkala, 2018; 2:371-373. (in Russian)]

Бурляева М.О., Гуркина М.В., Чебукин П.А., Киселева Н.А. Международный классификатор видов рода *Vigna* Savi. СПб., 2016.
[Burlyaeva M.O., Gurkina M.V., Chebukin P.A., Kiseleva N.A. International descriptor of species of the genus *Vigna* Savi. St. Petersburg, 2016. (in Russian)]

Вишнякова М.А., Буравцева Т.В., Булынцев С.В., Бурляева М.О., Семенова Е.В., Сеферова И.В., Александрова Т.Г., Яньков И.И., Егорова Г.П. Стратегия и тактика мобилизации генетических ресурсов зернобобовых в коллекцию ВИР на рубеже XX–XXI веков. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. СПб., 2012;169:41-52.
[Vishnyakova M.A., Buravtseva T.V., Bulyntsev S.V., Burlyaeva M.O., Semenova E.V., Seferova I.V., Aleksandrova T.G., Yan’kov I.I., Egorova G.P. The strategy and tactics of mobilizing the genetic resources of grain legumes to the VIR collection at the turn of the XX–XXI centuries. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings Applied Botany, Genetics, and Breeding. St. Petersburg, 2012;169:41-52. (in Russian)]

Гафуров Б.Г. Таджики (древнейшая, древняя и средневековая история). Душанбе, 1989;Т. 1.
[Gafurov B.G. Tajiks: the most ancient, ancient and medieval history. Dushanbe, 1989; V. 1. (in Russian)]

Дитмер Э.Э., Иванов Н.Р., Попова Г.М. *Phaseolus* L.– Фасоль. Культурная флора СССР. Зерновые бобовые. М.; Л., 1937;IV:457-621.
[Ditmer E.E., Ivanov N.R., Popova G.M. *Phaseolus* L. Common Beans. Cultural Flora of the USSR. Grain Legumes. Moscow; Leningrad, 1937;IV:457-621. (in Russian)]

Иванов Н.Р. Новые зерновые бобовые культуры для южных районов СССР. Достижения и перспективы в области прикладной ботаники, генетики и селекции. Л., 1929;267-278.
[Ivanov N.R. New grain legumes for southern regions of the USSR. Achievements and Prospects in Applied Botany, Genetics, and Breeding. Leningrad, 1929:267-278. (in Russian)]

Иванов Н.Р. Фасоль. М.; Л., 1949.
[Ivanov N.R. Common Beans. Moscow; Leningrad, 1949. (in Russian)]

Курьянович А.А. Изменение параметров водного режима маша (*Vigna radiata* L. (R) Wilczek) как показателя адаптационных возможностей маша к условиям Среднего Поволжья. Матер. III Междунар. конф. «Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции овощных, плодово-ягодных и лекарственных растений», Москва, 15–17 февраля, 2017;289-292.
[Kuryanovich A.A. Change of the water regime parameters of green gram (*Vigna radiata* L. (R) Wilczek) as an indicator of its adaptability to the conditions of the Middle Volga region. Proc. III Int. conf. “The Role of Physiology and Biochemistry in the Introduction and Breeding of Vegetables, Berries, and Medicinal Plants”, Moscow, February 15–17, 2017;289-292. (in Russian)]

Носирова М.Д. Влияние приемов возделывания на фотосинтетические, симбиотические параметры и продуктивность маша (*Vigna radiate* (L.) R. Wilczek). Изв. Калинингр. гос. техн. ун-та. 2012;27:200-205.
[Nosirova M.D. The influence of cultivation techniques on photosynthetic, symbiotic parameters and productivity of green gram (*Vigna radiate* (L.) R. Wilczek). Izvestiya Kaliningradskogo Gosudarstvennogo Tekhnicheskogo Universiteta = Proceedings of the Kaliningrad State Technical University. 2012;27:200-205. (in Russian)]

Павлова А.М. Сорта маша для новых районов орошаемого земледелия. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1952;29:67-70.
[Pavlova A.M. Green gram varieties for new areas of irrigated agriculture. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1952;29:67-70. (in Russian)]

Павлова А.М. Итоги изучения исходного материала зерновых бобовых культур на Среднеазиатской опытной станции ВИР. Селекция, агротехника зерновых в Средней Азии: Материалы научно-производственной конференции по увеличению производства зерна в Средней Азии. Ташкент, 1966;118-124.

[Pavlova A.M. The results of the study of the initial material of grain legumes at the Central Asian VIR experimental station. Breeding, Agricultural Technology of Cereals in Central Asia: Proc. scientific conf. to increasing grain production in Central Asia. Tashkent, 1966; 118-124. (in Russian)]

Павлова А.М., Глушенкова Н.И. Бобовые культуры в пожнивных посевах в Узбекистане. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1962;34:63-71.
[Pavlova A.M., Glushenkova N.I. Legume plants in stubble crops in Uzbekistan. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1962;34: 63-71. (in Russian)]

Adsule R.N., Kadam S.S., Salunkhe D.K. Chemistry and technology of green gram (*Vigna radiata* [L.] Wilczek). Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1986;25(1):73-105.

Afzal M.A., Murshad A.N.M.M.M., Bakar M.A., Hamid A., Salahuddin A.B.M. Mungbean Cultivation in Bangladesh. Pulse Research Station, Bangladesh Agricultural Research Institute: Gazipur, Bangladesh, 2008.

Akpapunam M. Mung bean (*Vigna radiate* (L.) Wilczek). Eds. E. Nwokolo, J. Smartt. Food and Feed from Legumes and Oilseeds. New York: Chapman and Hall, 1996;209-215.

Ali M., Gupta S. Carrying capacity of Indian agriculture: Pulse crops. Curr. Sci. 2012;102(6):874-881.

Anwar F., Latif S., Przybylski R., Sultana B., Ashraf M. Chemical composition and antioxidant activity of seeds of different cultivars of mungbean. J. Food Sci. 2007;72(7):503-510.

Arumuganathan K., Earle E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol. Biol. Rep. 1991;9:208-218.

Aykroyd W.R., Doughty J. Legumes in human nutrition. FAO Nutritional Studies No. 19. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1964.

Baligar V.C., Fageria N.K. Agronomy and physiology of tropical cover crops. J. Plant Nutr. 2007;30(8):1287-1339.

Bisht I.S., Singh M. Germplasm utilization. Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement. London: Elsevier Science, 2013;248-253. DOI 10.1016/B978-0-12-397935-3.00010-4.

Castillo C., Fuller D. Still too fragmentary and dependent upon chance? Advances in the study of early Southeast Asian archaeobotany. Eds. B. Bellina, E.A. Bacus, O. Pryce, J. Weissman Christie. Fifty Years of Archaeology in Southeast Asia: Essays in Honour of Ian Glover. Bangkok; London: River Books, 2010; 91-111.

Chaitieng B., Kaga A., Tomooka N., Isemura T., Kuroda Y., Vaughan D.A. Development of a black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] linkage map and its comparison with an azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi] linkage map. Theor. Appl. Genet. 2006; 113(7):1261-1269.

Chandel K.P.S., Lester R.N.F., Starling R.J. The wild ancestors of urid and mung beans (*Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiate* (L.) Wilczek). Bot. J. Linn. Soc. 1984;89:85-96. DOI 10.1111/j.1095-8339.1984.tb01002.x.

Chankaew S., Isemura T., Naito K., Ogiso-Tanaka E., Tomooka N., Somta P., Kaga A., Vaughan D.A., Srinives P. QTL mapping for salt tolerance and domestication-related traits in *Vigna marina* subsp. *oblonga*, a halophytic species. Theor. Appl. Genet. 2014;127(3):691-702. DOI 10.3390/ijerph120605685.

Chivenge P., Mabhaudhi T., Modi A.T., Mafongoya P. The potential role of neglected and underutilised crop species as future crops under water scarce conditions in Sub-Saharan Africa. Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2015;12:5685-5711. DOI 10.3390/ijerph120605685.

CRN (Core Road Network) India, 2011. http://www.crnindia.com/commodity/urad.html.

Dana S. The cross between *Phaseolus aureus* Roxb. and *P. mungo* L. Genetica. 1966;37:259-274.

De D.N., Krishnan R. Cytological studies of the hybrid *Phaseolus aureus* × *P. mungo*. Genetica. 1966;37:588-600.

Dempewolf H., Baute G., Anderson J., Kilian B., Smith C., Guarino L. Past and future use of wild relatives in crop breeding. Crop Sci. 2017;57:1070-1082. DOI 10.2135/cropsci2016.10.0885.

Dikshit H.K., Jhang T., Singh N.K., Koundal K.R., Bansal K.C., Chandra N., Tickoo J.L., Sharma T.R. Genetic differentiation of *Vigna* species by RAPD, URP and SSR markers. Biol. Plant. 2007;51(3): 451-457.

Ebert A. Ex situ conservation of plant genetic resources of major vegetables. Eds. M.N. Normah, H.F. Chin, B.M. Reed. Conservation of Tropical Plant Species. New York: Springer Science+Business Media, 2013;373-417.

Establishing the International Mungbean Improvement Network, 2016. https://avrdc.org/intl-mungbean-network (date of the application 29.09.2018).

Fuller D.Q. Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: recent archaeo-botanical insights from the Old World. Ann. Bot. 2007;100(5):903-924.

Fuller D.Q., Harvey E. The archaeobotany of Indian pulses: identification, processing and evidence for cultivation. Env. Archaeol. 2006; 11(2):219-246.

Guleria P., Kumar V. Understanding the phenylpropanoid pathway for agronomical and nutritional improvement of mungbean. J. Hort. Sci. Biotech. 2017;92:335-348.

Gupta S.K., Souframanien J., Gopalakrishna T. Construction of a genetic linkage map of black gram, *Vigna mungo* (L.) Hepper, based on molecular markers and comparative studies. Genome. 2008;51:628-637. DOI 10.1139/G08-050.

Ignacimuthu S., Babu C.R. Breeding potential of *Vigna sublobata* (Roxb.) in the improvement of mung bean. Curr. Sci. 1984;53:786-788.

ILDIS World Database of Legumes. 2009. International Legume Database & Information Service. http://www.ildis.org.

Indira M., Kurup P.A. Blackgram a hypolipimic pulse. Nat. Prod. Radiance. 2003;2(5):240-242.

Iseki K., Takahashi Y., Muto C., Naito K., Tomooka N. Diversity and evolution of salt tolerance in the genus *Vigna*. PLoS One. 2016; 1(10):e0164711.

Iseki K., Takahashi Y., Muto C., Naito K., Tomooka N. Diversity of drought tolerance in the genus *Vigna*. Front. Plant Sci. 2018;9:729. DOI 10.3389/fpls.2018.00729.

Jaaska V., Jaaska V. Isoenzyme differentiation between Asian beans *Vigna radiate* and *V. mungo*. Biochem. Physiol. Pflanzen. 1989;185: 41-53.

Jansen P.C.M. *Vigna mungo* (L.) Hepper. Record from Protabase. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa. Wageningen, 2006.

Javed I., Ahmad H.M., Ahsan M., Ali Q., Ghani M.U., Iqbal M.S., Rashid M., Akram H.N. Induced genetic variability by gamma radiation and traits association study in mung bean (*Vigna radiata* L.). Life Sci. J. 2014;11(8s):530-539.

Kang J.K., Kim S.K., Kim M.Y., Lestari P., Kim K.H., Ha B.K., Jun T.H., Hwang W.J., Lee T., Lee J., Shim S., Yoon M.Y., Jang Y.E., Han K.S., Taeprayoon P., Yoon N., Somta P., Tanya P., Kim K., Gwag J.G., Moon J.K., Lee Y.H., Park B.S., Bombarely A., Doyle J.J., Jackson S.A., Schafleitner R., Srinives P., Varshney R.K., Lee S-H. Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species. Nat. Commun. 2014;5:5443.

Kang Y.J., Satyawan D., Shim S., Lee T., Lee J., Hwang W.J., Kim S.K., Lestari P., Laosatit K., Kim K.H., Ha T.J., Chitikineni A., Kim V.Y., Ko J.-M., Gwag J.-G., Moon J.-K., Lee Y.-H., Park B.-S., Varshney R.K., Lee S-H. Draft genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis*. Sci. Rep. 2015;5:8069.

Keatinge J.D.H., Easdown W.J., Yang R.Y., Chadha M.L., Shanmugasundaram S. Overcoming chronic malnutrition in a future warming world: the key importance of mungbean and vegetable soybean. Euphytica. 2011;180:129-141.

Kim S.K., Nair R.M., Lee J., Lee S.-H. Genomic resources in mungbean for future breeding programs. Front. Plant Sci. 2015;6:626.

Krishna K.R. Agroecosystems of South India: Nutrient Dynamics, Ecology and Productivity. Boca Raton, Fla.: Brown Walker Press, 2010.

Kumar V.L., Singhal A. Germinating seeds of the mung bean, *Vigna radiata* (Fabaceae), as a model for the preliminary evaluation of cytotoxic effects of drugs. Biocell. 2009;33(1):19-24.

Lawn R.J., Ahn C.S. Mungbean (*Vigna radiate* (L.) Wilczek *Vigna mungo* (L.) Hepper). Eds. R.J. Summerfield, E.H. Roberts. Grain Legume Crops. London: William Collins Sons & Co. Ltd, 1985;584-623.

Lawn R.J., Cottrell A. Wild mungbean and its relatives in Australia. Bilogist. 1988;35:267-273.

Liu C., Wu J., Wang L., Fan B., Cao Z., Su Q., Zhang Z., Wang·Y., Tian J., Wang S. Quantitative trait locus mapping under irrigated and drought treatments based on a novel genetic linkage map in mungbean (*Vigna radiata* L.). Theor. Appl. Genet. 2017. DOI 10.1007/s00122-017-2965-6.

Marechal R., Mascherpa J.M., Stainier F. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'especes des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de donnees morphologiques et polliniques, traitees par l'analyse informatique. Boissiera. 1978;28:1-273.

Mathivathana M.K., Jagadeeshselvam N., Madhumitha B., Karthikeyan A., Pandiyan M., Karthikeyan G., Vanniarajan C., Raveendran M., Senthil N., Sudha M. Screening and identification of SSR markers for genetic diversity for Mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2018;7(04):789-793.

McCouch S., Baute G.J., Bradeen J., Bramel P., Bretting P.K., Buckler E., Burke J.M., Charest D., Cloutier S., Cole G., Dempewolf H., Dingkuhn M., Feuillet C., Gepts P., Grattapaglia D., Guarino L., Jackson S., Knapp S., Langridge P., Lawton-Rauh A., Lijua Q., Lusty C., Michael T., Myles S., Naito K., Nelson R.L., Pontarollo R., Richards C.M., Rieseberg L., Ross-Ibarra J., Rounsley S., Hamilton R.S., Schurr U., Stein N., Tomooka N., van der Knaap E., van Tassel D., Toll J., Valls J., Varshney R.K., Ward J., Waugh R., Wenzl P., Zamir D. Agriculture: Feeding the future. Nature. 2013; 499:23-24. DOI 10.1038/499023a.

Mogotsi K.K. *Vigna radiate* (L.) R. Wilczek. PROTA 1: Cereals and pulses/Céréales et légumes secs. PROTA, Wageningen, Netherlands, 2006.

Nath A., Maloo S.R., Barman K.K., Meena B.L., Devi G., Yadav G.S., Tak S. Molecular characterization of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] for future breeding programme. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2017;6(6):1385-1398.

Oghbaei M., Prakash J. Nutritional, ling on total and bioaccessible nutrients and bioactive components. J. Food Sci. Technol. 2017;54(4): 871-879.

Padulosi S., Hodgkin T., Williams J.T., Haq N. Underutilized crops: trends, challenges and opportunities in the 21th century. Managing Plant Diversity. Wallingford, U K, CAB International, 2002;323-338.

Pandiyan M., Senthil N., Ramamoorthi N., Muthiah A.R., Tomooka N., Duncan V., Jayaraj T. Interspecific hybridization of *Vigna radiata* × 13 wild *Vigna* species for developing MYMV donar. Electron. J. Plant Breed. 2010;1:600-610.

Protein quality evaluation: report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Bethesda, Md., USA, 4–8 December 1989. Rome, Italy: Food and Agricultural Organization of the United Nations. 1991.

Purseglove J.W. Tropical Crops: Dicotyledons. London, 1977.

Ravi J., Singh J.P., Minocha J.L. Meiotic behaviour of interspecific hybrids *V. radiata* × *V. mungo*. Proc. First Symp. Crop Improvement. Coimbatore, India, 1987;58-59.

Schafleitner R., Nair R., Rathore A., Wang Y., Lin C., Chu S.H., Lin P.Y., Chang J.C., Ebert A.W. The AVRDC – The world vegetable center mungbean (*Vigna radiata*) core and mini core collections. BMC Genomics. 2015;16(1):344. DOI 10.1186/s12864-015-1556-7.

Sen N.K., Ghosh A.K. Interspecific hybridization between *Phaseolus aureus* Roxb. (green gram) and *Ph. mungo* L. (black gram). Bull. Bot. Soc. Bengal. 1963;14:1-4.

Sharma O.P., Bambawale O.M., Gopali J.B., Bhagat S., Yelshetty S., Singh S.K., Anand R., Singh O.M. Field guide mung bean and urd bean. Government of India, Department of Agricultural and Cooperation, NCIPM, ICAR, New Delhi, India, 2011.

Sharma P., Mishra N.K. Ethno-medicinal uses and agro-biodiversity of Barmana region in Bilaspur district of Himachal Pradesh, Northwestern Himalaya. Ethnobotanical Leaflets. 2009;13:709-721.

Singh B.V., Ahuja M.R. *Phaseolus sublobata* Roxb: A source of resistance to yellow mosaic virus for cultivated mung. Indian J. Genet. 1977;37:130-132.

Souframanien J., Dhanasekar P. Advances in greengram and blackgram genomics. Legumes in the Omic Era. New York, 2014;155-184. DOI 10.1007/978-1-4614-8370-0_8.

Souframanien J., Gopalakrishna T. ISSR and SCAR markers linked to the mungbean yellow mosaic virus (MYMV) resistance gene in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. Plant Breed. 2006;125: 619-622.

Souframanien J., Reddy K.S. *De novo* assembly, characterization of immature seed transcriptome and development of genic-SSR markers in black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. PLoS One. 2015;10(6): e0128748. DOI 10.1371/journal.pone.0128748.

Srinives P., Somta P., Sompta Ch. Genetics and breeding of resistance to bruchids (*Callosobruchus* spp.) in *Vigna* crops: A review. NU Int. J. Sci. 2007;4(1):1-17.

Stagnari F., Maggio A., Galieni A., Pisante M. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. Chem. Biol. Technol. Agric. 2017;4(2):1-13.

Takahashi Y., Somta P., Muto C., Iseki K., Naito K., Pandiyan M., Natesan S., Tomooka N. Novel genetic resources in the genus *Vigna* unveiled from gene bank accessions. PLoS One. 2016;11(1):e0147568.

Tomooka N., Naito K., Kaga A., Sakai H., Isemura T., Ogiso-Tanaka E., Iseki K., Takahashi Y. Evolution, domestication and neo-domestication of the genus *Vigna*. Plant Genet. Resour. 2014;12:S168-S171. DOI 10.1017/S1479262114000483.

Tomooka N., Vaughan D.A., Moss H., Mixted N. The Asian Vigna: Genus Vigna Subgenus Ceratotropis Genetic Resources. New York: Kluwer, 2003.

Tresina P.S., Daffodil D.E., Lincy P., Mohan V.R. Assesment of biochemical composition and nutritional potential of three varieties of *Vigna radiata* (L.) Wilezek. Biolife. 2014;2(2):655-667.

Tresina P.S., Kamatchi A., Kala B., Mohan V.R., Vadivel V. The biochemical composition and nutritional potential of three varieties of *Vigna mungo* (L.) Hepper. Adv. Biores. 2010;1(2):6-16.

Verdcourt B. Studies in the Leguminosae – Papilionoideae for the "Flora of Tropical East Africa": IV. Kew Bull. 1970;24.

Verma R.P.S., Singh D.P. Problems and prospects of interspecific hybridization involving green gram and black gram. Indian J. Agric. Sci. 1986;56:535-537.

Vishalakshi B., Umakanth B., Shanbhag A.P., Ghatak A., Sathyanarayanan N., Madhav M.S., Krishna G.G., Yadla H. RAPD assisted selection of black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) towards the development of multiple disease resistant germplasm. 3 Biotech. 2017; 7(1):1.

Watt E.E., Marechal R. The differences between mung and urid beans. Trop. Grain Bull. 1977;7:31-33.

Yoshida Y., Marubodee R., Ogiso-Tanaka E., Iseki K., Isemura T., Takahashi Y., Somta P., Muto C., Iseki K., Naito K., Pandiyan M., Natesan S., Tomooka N. Salt tolerance in wild relatives of adzuki bean, *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi. Genet. Resour. Crop Evol. 2016;63:627. DOI 10.1007/s10722-015-0272-0.

ORCID ID

M.A. Vishnyakova orcid.org/0000-0003-2808-7745

M.O. Burlyaeva orcid.org/0000-0002-3708-2594

M.G. Samsonova orcid.org/0000-0001-8170-1260

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):967-977
DOI 10.18699/VJ18.439

Principal approaches and achievements in studying race composition of wheat stem rust

A.S. Rsaliyev[1] ✉, Sh.S. Rsaliyev[2]

[1] Research Institute for Biological Safety Problems, Zhambyl Region, Kazakhstan
[2] Kazakh Research Institute of Farming and Crop Science, Almaty Region, Kazakhstan

Wheat stem rust caused by the *biotrophic fungus Puccinia graminis* f. sp. *tritici* is a dangerous disease that seriously damages the economics in many countries of the world. The review contains information about epidemics of wheat stem rust and causes of their emergence worldwide. Recently wheat stem rust epidemics have been recorded in the northern regions of Kazakhstan and on the territories adjacent to Omsk Region of Russia. It has been shown that severe wheat stem rust epidemics occur mainly due to the emergence of new virulent races of the disease agent and to growing susceptible wheat cultivars. New methods of studying the race composition of the fungus are described as well as the use of the previous and current differential sets for race determination of *P. graminis* f. sp. *tritici*. The results of developing molecular markers and assessing their effectiveness in studying stem rust races are presented. Wheat stem rust races dominant in major grain-growing countries of the globe and their typical peculiarities are described. The paper contains information on identification of race Ug99 and of its variations including data on areas of their dissemination and on their virulence to *Sr*-resistance genes. The existence and emergence of other races of the agent potentially dangerous for commercially important genes for stem rust resistance is also described. Currently in nature strongly virulent races of *P. graminis* f. sp. *tritici* are circulating with wide geographical coverage and their virulence is absolutely different from the virulence of race Ug99. Historical and modern data on studying the race composition of the pathogen in Kazakhstan are summarized. It is stated that the use of the old standard differential set and an incomplete North American system of race nomenclature in experiments prevents measuring similarity between Kazakhstani races and the worldwide known races of the pathogen. It has been shown that there is a need to continue studies on the intraspecies structure of the disease agent's population in Kazakhstan with the use of the modern differential set, on determination of race composition and ways of emergence of new races potentially dangerous for commercial wheat varieties.
Key words: wheat; stem rust; resistance; race; *Sr* genes; virulence.

Основные подходы и достижения в изучении расового состава стеблевой ржавчины пшеницы

А.С. Рсалиев[1] ✉, Ш.С. Рсалиев[2]

[1] Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Жамбылская область, Казахстан
[2] Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, пос. Алмалыбак, Алматинская область, Казахстан

Стеблевая ржавчина пшеницы, вызываемая биотрофным грибом *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, – опасное заболевание, наносящее серьезный экономический ущерб в большинстве стран мира. В обзоре приведены сведения об эпидемиях стеблевой ржавчины пшеницы и причинах их возникновения в мире. В последние годы отмечаются эпидемии стеблевой ржавчины пшеницы в северных регионах Казахстана и на территориях, сопредельных Омской области России. Установлено, что сильные эпидемии стеблевой ржавчины в основном происходят в связи с появлением новых вирулентных рас возбудителя болезни и возделыванием восприимчивых сортов пшеницы. Рассматриваются методы определения расового состава гриба, в том числе старые и современные наборы сортов-дифференциаторов для определения расовой принадлежности *P. graminis* f. sp. *tritici*. Представлены результаты разработки молекулярных маркеров и оценки эффективности их использования в изучении рас стеблевой ржавчины. Описаны доминирующие расы стеблевой ржавчины пшеницы и их характерные особенности в основных зерносеющих странах мира. Приведены данные по идентификации расы Ug99 и ее вариантов, включая их распространение и вирулентность к сортам с ранее эффективными генами устойчивости *Sr*, и информация о существовании и появлении других высоковирулентных рас *P. graminis* f. sp. *tritici*, отличающихся от расы Ug99 по признаку вирулентности и молекулярным маркерам. Обобщены исторические и современные данные по изучению расового состава патогена в Казахстане. Отмечается, что проведение экспериментов с использованием старого стандартного набора сортов-дифференциаторов и неполного набора североамериканской системы номенклатуры рас не позволяет оценить степень сходства казахстанских рас с известными расами гриба в мире. В Казахстане необходимо продолжить изучение внутривидовой структуры популяции возбудителя болезни с использованием современного набора сортов-дифференциаторов, а также определение расового состава и путей возникновения новых рас, потенциально опасных для коммерческих сортов пшеницы.

Ключевые слова: пшеница; стеблевая ржавчина; устойчивость; раса; гены *Sr*; вирулентность.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Rsaliyev A.S., Rsaliyev Sh.S. Principal approaches and achievements in studying race composition of wheat stem rust. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):967-977. DOI 10.18699/VJ18.439

Received July 18, 2018
Revised October 9, 2018
Accepted October 10, 2018

✉ e-mail: aralbek@mail.ru

Stem (or black) rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, an obligate biotrophic fungus, occurs wide where its hosts (wheat or other cereals) grow (Roelfs et al., 1992). Currently because of its scientific and economical significance the stem rust enters the top 10 of the fungal diseases of plants and the pathogen is able to cause the greatest damage in case of an epidemic/epiphytoty (Dean et al., 2012). All over the globe the stem rust occurs mainly in the regions with the continental climate where summer temperatures regularly exceed 25 °C (Singh et al., 2015). The disease caused wheat yield losses in different historical periods in Canada (Peturson, 1958), in South America (German et al., 2007), in the countries of the European continent and Indian subcontinent, in Australia (Park, 2007), South Africa (Pretorius et al., 2007), East Africa (Wanyera et al., 2006) and in China (Roelfs et al., 1992). Severe stem rust epidemics took place in the United States in years 1919, 1920, 1923, 1927, 1935, 1953, 1954 (Knott, 1971). Average losses of wheat yield because of these epidemics were 25.4 % in Minnesota, 28.4 % in North Dakota, and 19.3 % in South Dakota (Singh et al., 2015). It is specified that the epidemics of this disease in the United States have been associated with emergence and spread of stem rust races 56, 15 and 15B that are virulent to widely cultivated wheat varieties Ceres, Kanred (Sr5), Kubanka (Sr9g, c), Arnautka (Sr9d, a), Hope (Sr7b, Sr17) (Knott, 1971). Since 1954 only local epidemics occurred in the USA and in the whole North America (Singh et al., 2015).

Over the last 20 years reasonable worry is caused by spread of the aggressive race of *P. graminis* f. sp. *tritici*, that has been first detected in 1998 in Uganda and named Ug99 (abbreviation from "Uganda 1999") (Pretorius et al., 2000; Singh et al., 2008, 2011). Over the course of several years, it has rapidly captured wheat cultivation areas in the countries of Eastern and Southern Africa, in Zimbabwe, Sudan, Yemen, Iran, and Egypt. The studies have shown that 90 % of commercial varieties being a part of the global wheat gene fund are susceptible to different races of Ug99 lineage and this fact allows considering the pathogen as a major threat to the current world wheat production and to food security (Singh et al., 2011, 2015). Moreover, during last years severe epidemics of stem rust occur in European countries due to emergence of new virulent races of the pathogen different from race Ug99 (Mert et al., 2012; Bhattacharya, 2017; Olivera Firpo, 2017; Lewis et al., 2018).

In Kazakhstan, like in many grain-producing regions of the world, stem rust is a very dangerous disease of wheat that threats food security of the country. Mainly it is spread in the forest-steppe and steppe areas of the northern region. For instance, in 1964 mass epiphytoty of the disease on wheat resulted in the yield loss varying from 20–30 % through 50 % and over (Plakhotnik, 1969; Koishybayev, 2018). In 1967 the stem rust epiphytoty in the northern regions of Kazakhstan and in Western Siberia covered over 5 million hectars of area planted with wheat. The intensity of wheat affection was 70–90 %, and yield loss exceeded 50 % (Plakhotnik, 1969). The epiphytoty was caused by mass proliferation of races 17 and 21 of the pathogen and by high air humidity (Kulikova, Yurchikova, 1971).

Since 1990 till 2005 in Kazakhstan stem rust displayed itself on wheat rather late and spread on small area. Local evolvement of the disease was recorded only in years 2006–2008 (Rsaliyev, 2008; Kokhmetova et al., 2011; Koishybayev, 2018). Particularly, in Kostanai and North-Kazakhstan Regions in 2006–2007 foci with moderate and heavy progress of stem rust on spring wheat were reported. Spread of the disease varied within 20–40 %; on some fields this figure reached 80–100 % (Kokhmetova et al., 2011; Koishybayev, 2018). Races of the stem rust agent isolated in 2006–2007 in Kazakhstan were highly virulent to *Sr*-lines that were previously effective under conditions of the republic (Rsaliyev, 2008, 2011; Rsaliyev et al., 2010).

Recently in the northern regions of Kazakhstan and in the Western Siberia where spring wheat is mainly cultivated stem rust has turned to be one of the major diseases. In 2015 in Kostanai and North-Kazakhstan Regions as well as in adjacent Omsk Region of Russia stem rust epidemic affected over one million hectars of lands under wheat (Lapochkina et al., 2016; Shamanin et al., 2016; Koishybayev, 2018). The situation had repeated both in years 2016 and 2017; in 2016 the pathogen was detected on all the fields surveyed in North-Kazakhstan Region, especially on late-planted wheat crops, and it resulted not only in marked yield reduction but in lower grain quality (Koishybayev, 2018). It has been noted that such a severe epidemic in Western Siberia may evidence either of penetration of highly virulent races of the pathogen to the territory of the Russian Federation or of existence in the region of own aggressive races with wide range of virulence genes (Lapochkina et al., 2016).

So, mass evolvement of wheat stem rust worldwide is promoted both by social-economic changes as a whole and by the other evolution and selection-genetic factors. They include extension of lands under old susceptible wheat varieties, lost resistance of commercial wheat varieties, emergence of new virulent races, poor monitoring of rust populations and so on. Analyzing race composition and monitoring natural *P. graminis* f. sp. *tritici* populations on the basis of their virulence to differential wheat varieties and to the sources of resistance is the most topical task. Change in frequency only of a single virulence gene may cause dramatic consequences such as severe affection of the previously resistant variety by the disease.

Methods for analyzing race composition of wheat stem rust

Current research of race composition of the wheat stem rust includes several steps: (1) collecting rust samples, (2) isolating and reproducing single pustule isolates of the fungus, (3) differentiating races on the basis of virulence and molecular markers, (4) storing urediniospores of races.

Collecting rust samples. Method for sampling affected wheat organs depends on the assigned task. For comparative study of the stem rust populations samples are collected from production fields under commercial wheat varieties in different geographical areas and in the areas where the alternate host of rust grows as well as from wild cereals in nature.

Time of sampling the pathogen populations is very important because the race composition varies depending on vegetation period of plants. Size of sampling also depends on the assigned tasks. For instance, to determine genetic distance between populations at least 30–40 isolates of the fungus are

needed, and over 1000 isolates are necessary to detect races with rare virulence (Mironenko, 2004).

Collection of vegetative organs from plants with the disease symptoms along the diagonal of the field at the certain intervals depending on the size of the field is the most common method. At each point several samples are collected. It is considered, that in absence of original data on the population structure the hierarchical sampling scheme is the best to be used (McDonald, 1997). The essence of the hierarchical sampling of the population lies in marking-out the surveyed field into smaller uniformly distributed plots and in collecting the vegetative material in several uniformly distributed points on each plot (Mironenko, 2004). Examples of the hierarchical sampling of the population are described by McDonald (1997). Each of the collected samples is placed into a special packet with a form to indicate obligatory data: place (region, district, farm and geographical coordinates), wheat variety and sampling date. It should be noted that minimal humidity must be provided in the course of storing the herbarium specimen of the infected plant organ thus preventing loss of germination ability by the spores of the pathogen. The collected urediniospore material should be reproduced as far as possible for a week according to the adequate procedure (Konovalova et al., 1977).

Isolating and reproducing single pustule isolates of the fungus. One of the major steps in studying race composition of stem rust is isolating pure single pustule isolates of the fungus and their reproduction. Isolation of single pustule isolates of rust is associated with a number of issues: choice of substrate varieties, purification of the isolates of the pathogen from spores of other fungus species, choice of methods for inoculation of plants, etc. (Rsaliyev, 2008).

Substrate varieties are wheat varieties for reproduction of the pathogen population, purification from the other pathogens and for isolation of single pustule isolates. They must meet a number of requirements: high susceptibility to the pathogen under study, resistance or low susceptibility to the other rust species, immunity against powdery mildew, easy seed threshing, fast growth of seedlings, wide leaf lamina, weak sensitivity of plants to growing under conditions of low temperature, etc. (Rsaliyev, 2008). Earlier in Kazakhstan the studies were carried out to create and maintain the collection of rust fungi races on cereal crops. Wheat varieties good for biological purification of one rust species from the other one were detected as the result. For instance, wheat varieties K-RIBSP-66400 and 66454 are resistant to yellow rust and susceptible to stem rust, respectively they can be used for purification of stem rust from yellow rust. Universally susceptible varieties are used to reproduce stem rust spores. Maleic hydrazide (MH) in proportion 1 L of 0.1 % MH solution per 220–250 pots was used to slow down growth of plants, to improve their lodging resistance and to raise sporulating ability of the fungus (Rsaliyev, Savinkov, 1998; Rsaliyev, 2008).

Reproductive ability of *P. graminis* f. sp. *tritici* depends on resistance of the host plant. The higher is the resistance and respectively lower the type of infection the smaller is the number of spores produced by the pathogen. One urediniapustule of the stem rust agent produces from 10.000 to 24.000 spores per day at the infection type of 4 points. At the infection type of 2–3 points daily productivity of the pustule is 3.000–12.000 spores and only 100–1.000 spores at type 1 of infection. On one stem of the resistant variety the number of forming spores is 4–10.3 times less than on a stem of a moderately susceptible variety, and 5–12.4 times less than on a stem of a susceptible variety (Sanin et al., 1978).

Methods and techniques of isolating and reproducing single pustule isolates of the wheat stem rust, including care of experimental plants and optimal temperature-time regime during the experiments are described in details in different publications (Konovalova et al., 1977; Jin et al., 2008, 2009; Rsaliyev, 2008; Olivera et al., 2015). Most effective is isolation and reproduction of single pustule isolates of the fungus on a susceptible variety under greenhouse conditions for 2–3 months before their use.

The isolates with spores can be collected from the surface of the host plant onto a piece of smooth dry paper or aluminium foil. After that the spores are dried (20–30 % relative humidity) and stored in a container. There are different types of cyclone collectors for spore collection. With their help one can collect spores both in very small (from a separate uredinia) and in large amounts (Rsaliyev, 2008). Studying race composition of *P. graminis* f. sp. *tritici* is illustrated on Fig. 1.

Storing urediniospores of the fungus. There are different ways of storing spores depending on the requisite storage duration and amount of available spores:

- Stem rust urediniospores can be stored at room temperature for several weeks depending on humidity. Duration of spore storing can be increased via their drying and keeping at 20–30 % relative humidity (Roelfs et al., 1992).
- Freezing. After drying urediniospores can be stored at 5–8 °C for different periods (weeks or months) depending on basic conditions. They may be sealed in a hermetic airproof container and stored in an exiccator (a moist chamber). The spores on a dried stem or leaf may be stored in a fridge for a month, but in this case their relative humidity should not exceed 30 % (Konovalova et al., 1977; Zhapparova, Rsaliyev, 2012).
- Vacuum drying. Vacuum drying of urediniospores in ampoules allows their storing up to 10 years and even longer. The spores are dried under low air pressure (40–50 % vacuum) conditions for 2–2.5 h followed by sealing ampoules with spores in the burner flame. After sealing the ampoules are checked for vacuum, because its absence leads to loss of spore viability. In the course of long-term storage (over 1 year) the ampoules with spores are usually stored at +4…+8 °C (Roelfs et al., 1992). According to Roelfs et al. (1992) vacuum drying ensures spore storing up to 10 years. The major disadvantage of vacuum drying is the fact that at the moment of ampoule sealing micro cracks can be formed allowing humid air into ampoules and it can decrease germinating ability of spores.
- Liquid nitrogen. In many laboratories around the world spores are stored in liquid nitrogen. They are first dried till 20–30 % relative humidity and then sealed into glass ampoules or aluminium foil packets. Prior to usage the stem rust spores are processed with warm (40 °C) water for 5–7 min to interrupt hibernation caused by cold. While working with liquid nitrogen one should follow the standard precaution measures (Loegering et al., 1966).

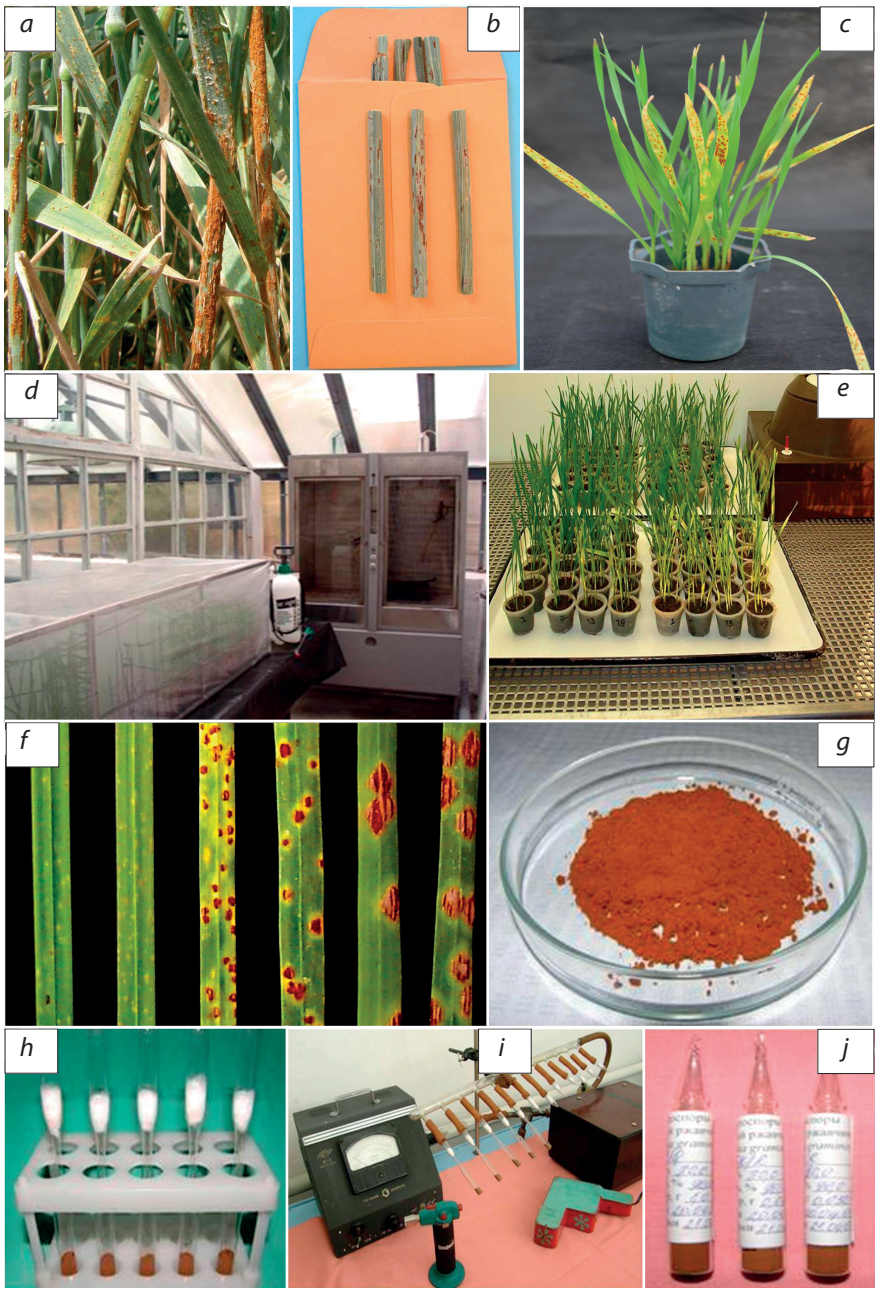


Fig. 1. Order of studying wheat stem rust race composition from collecting the fungal specimens till storing *P. graminis* f. sp. *tritici* spores:

a, the affected wheat variety in the field; *b*, the herbarium specimen of the infected plant organ; *c*, the isolated and purified pathogen on the susceptible wheat variety; *d*, inoculation of the differential varieties with the monopustule fungus isolates; *e*, the differential wheat varieties after inoculation; *f*, various infection types on the differential varieties; *g*, the collected urediniospores of the fungus; *h*, packing spores into ampules; *i*, vacuum drying (in ampules, vacuum unit, vacuummeter, gas burner, d'Arsonval apparatus, Tesla apparatus); *j*, the urediniospores of the stem rust races ready for use.

- Ultralow freezing. The spores neither change their virulent properties for 10 years and longer in the process of their storage at temperatures below –50 °C. They are dried up to 20–30 % relative humidity and then sealed into plastic bags, glass or plastic ampoules (Zhapparova, Rsaliyev, 2012).

Regeneration of spores after storage. After long-term storage urediniospores require additional processing for rehabilitation of their viability. There are two most simple methods of spore regeneration after storage (Konovalova et al., 1977):

a) gradual spore moisturing: the urediniospores are transferred from ampoules into test tubes and finely dispersed on their walls, then the tubes are placed into an exiccator with high relative humidity (100 %) above water, and in 24 h the material is ready for using;
b) thermal treatment of spores: the urediniospores are transferred from ampoules into test tubes and heated in an ultra thermostat at 50 °C for 30 min, then the tubes are transferred into a moist chamber with 100 % relative air humidity and held there during 2–3 hours.

Thus currently there are different ways of storing rust spores. At the same time, knowledge of the minimum and maximum storage periods of urediniospores provides additional information on the viability of rust and helps to organize the work on the differentiation of *P. graminis* f. sp. *tritici* races.

Race differentiation based on virulence and molecular markers. By present time various differential wheat varieties or ways of differentiating *P. graminis* f. sp. *tritici* races have been developed. Stakman and Piemeical were the first to describe in 1917 the races of wheat stem rust. Later the method of differentiation of the pathogen races proposed by Stakman et al. (1962) appeared to be a significant event in the field of population biology of rust fungi. In this method a type of reaction of the differential varieties was the major key of the pathogen race determination. The differential set includes the following wheat varieties: Little Club, Marquis (Sr5, 7b, 18, 19, 20), Reliance (Sr5, 16, 18, 20), Kota (Sr7b, 18, 19, 28), Arnautka (Sr9d, a), Mindum (Sr9d, a, b), Spelmar (Sr9d, a, b), Kubanka (Sr9g, c), Acme (Sr9g, d), Einkorn (Sr21), Vernal (Sr9e), Khapli (Sr7a, 13, 14). In many cases the reduced number of differential wheat varieties, the so called half set consisting of 6 varieties (Marquis, Reliance, Kota, Arnautka, Kubanka and Einkorn) showed identical results. Later the similar differentiation system was developed in Canada (Green, 1981), Australia (Watson, Luig, 1963) and modified in the USA (Roelfs, 1984).

In 1977 "Methodological recommendations on studying race composition of the cereal rust pathogens" assigned for differentiation of cereal rust populations

were adopted in the USSR (Konovalova et al., 1977). The race identification was based on determination of types of infection on differential varieties or tester cultivars. All isolates that similarly affect the wheat varieties of the differential set are identified as one race. Using the differentiation method the population of the species is split into subunits that differ in virulence, the ratio of these subunits in the population is determined and the regularity of its variability is traced (Konovalova et al., 1977). Kazakhstanean researchers Kulikova and Kurbatova (1977b) proposed to add test varieties Lee, Selkirk, Mironovskaya 808 and Bezostaya 1 to the basic set for identification of biotypes within the stem rust races.

Genetic differentiation that use isogenous *Sr* lines as differentiators has appeared to be an improved method of studying race composition of the fungus (Roelfs, Martens, 1988; Knott, 1990). It means that if a new race infects the line containing *Sr5* gene, it will infect all the varieties that possess only this resistance gene, and at high concentration of this race in the populations this gene should not be used in development of new varieties because they will be infected by rust. In 1988 US phytopathologists Roelfs and Martens have developed a unified international system for identification of *P. graminis* f. sp. *tritici* races. The authors have included three sets containing the isogenous lines with separate resistance genes into their system of differentiators. The first set contains *Sr5*, *Sr21*, *Sr9e*, *Sr7b*; the second one: *Sr11*, *Sr6*, *Sr8a*, *Sr9g*; and the third set contains *Sr36*, *Sr9b*, *Sr30*, *Sr17*. According to this system the responses of plants to infection with stem rust are divided into two types: resistant (R) and susceptible (S). On the basis of the plant responses (R and S) each group is assigned a letter code. As a result each race is characterized by an index consisting of three consonant letter of English alphabet (Roelfs, Martens, 1988).

Later Roelfs et al. (1993) included in this system the fourth extra set with the isogenous lines containing *Sr9a*, *Sr9d*, *Sr10* and *SrTmp* for detailed study of the stem rust population. However in 2008 Jin et al. (2008) have found that the differential set used in the North American system of the stem rust race nomenclature fails to identify the unique virulence of race Ug99 to *Sr31*, as well as variations inside race TTKS. Revision of the existing system for identification of *P. graminis* f. sp. *tritici* races resulted in adding four extra genes (*Sr24*, *Sr31*, *Sr38* and *SrMcN*) as a fifth set. The proposed differential set identifies virulence of the new race to *Sr31* and differentiates TTKS race as two separate races: TTKSK and TTKST. With a few exceptions the races virulent to *Sr24*, *Sr31* or *Sr38* rarely occur in the stem rust populations worldwide (Jin et al., 2008).

So, extension of the set by extra isogenous lines resulted in improvement of the process of identification of the stem rust races. The last system of race differentiation (Table 1) currently is the most complete and is used to determine race composition of the wheat stem rust population in many countries of the world.

During the last decade molecular markers are widely used in genetic study of *P. graminis* f. sp. *tritici* populations. Selective-neutral SSR-markers (simple sequence repeats) have been developed for genotyping the pathogen isolates (Visser et al., 2009; Zhong et al., 2009). Molecular polymorphism of the regional populations of *P. graminis* f. sp. *tritici* was studied with the help of selected SSR-markes in Etyhiopia (Admassu et al., 2010) and in South Africa (Visser et al., 2009). The markers of this type were used to assay race Ug99 and its variations (Jin et al., 2009; Visser et al., 2009). However these SSR-markers have not been very useful in differentiating different members of the Ug99 race group (Singh et al., 2015).

Complete genome sequencing of *P. graminis* f. sp. *tritici* isolate in the USA (Duplessis et al., 2011) and reuse of several additional isolates served a powerful tool for genetic study of the fungus and development of new molecular diagnostic methods. Use of data on genome sequence from ta PCR-based diagnostic method was developed for the Ug99 lineage (Szabo, 2012). The method is very specific for assessment of genetic variability in the stem rust populations and is able to discriminate between several of the members of the Ug99 race group (Singh et al., 2015).

For assay of *P. graminis* f. sp. *tritici* isolates the other methodological approach with use of SNP-markers has been developed. For instance, SNP assay for genotyping the fungus isolates in Germany was carried out (Olivera Firpo et al., 2017). However, currently it is possible to detect new aggressive races and to study effectiveness of *Sr* genes only on the basis of information on their virulence.

Ug99 race group

Ug99 lineage comprises several races that differ from each other in one or several virulence/avirulence genes. By present 13 races of Ug99 group have been detected in 13 countries (TTKSK, TTKSF, TTKST, TTTSK, TTKSP, PTKSK, PTKST, TTKSF+, TTKTT, TTKTK, TTHSK, PTKTK, TTHST). It shows that the pathogen continues progressing and expanding geographically (Singh et al., 2015, http://rusttracker.cimmyt.org/?page_id=22). A peculiar feature of the first race Ug99 (TTKSK) is its virulence to varieties and lines with *Sr31* gene inherited from rye (*Secale cereale* L.) as a chromosome translocation 1BL/1RS (Pretorius et al., 2000; Wanyera et al., 2006). *Sr31*, rust resistance gene, inherited from 'Petkus' rye is used worldwide in spring, facultative and winter wheat owing to spread of Aurora, Kavkaz and Lovrin varieties (Zeller, Hsam, 1983). However in many wheat-growing regions wheat resistance to leaf and yellow rust as well as to powdery mildew became ineffective soon after 1BL/1RS translocation realization. Only *Sr31* gene stayed a major component of wheat resistance to stem rust until a virulent race of *P. graminis* f. sp. *tritici* was isolated in Uganda in 1998 (Pretorius et al., 2000).

In 2006 and 2007 new variations of race Ug99 affecting wheat varieties with *Sr24* (TTKST) and *Sr36* (TTTSK) genes were found in Kenya (Jin et al., 2008, 2009). In 2009 race PTKST with combined virulence genes *Sr31* and *Sr24* was identified in South Africa (Pretorius et al., 2010). In each review, an update on the latest known status of the Ug race group and highlights of all major changes since 2010 are provided. Since 2010, specific races of Ug99 group have been identified in an expanded range. Particularly, race TTTSK was detected in three more countries, namely in Ethiopia, Uganda and Ruanda, as well as race PTKST identified in three more countries such as Eritrea, Mozambique and Zimbabwe (Singh et al., 2015). Race TTKSF is one of the most intriguing in Ug99 group as it is avirulent to *Sr31* gene. It has been first identified in South Africa in 2000 (Boshoff et al., 2002) and differs in virulence to genes *Sr8b* and *Sr38* versus the local races.

Table 1. International set of differential wheat varieties for races of *P. graminis* f. sp. *tritici*

Sets	Genes	Differential lines and varieties	Pedigree
1[a]	*Sr5*	ISr5-Ra CI 14159	Thatcher/Chinese Spring
	Sr21	T. monococcum/8*LMPG-6 DK13	Einkorn CI 2433
	Sr9e	Vernstein PI 442914	Little Club//3* Gabo/2* Charter/3/3* Steinwedel/CI 7778
	Sr7b	ISr7b-Ra CI 14165	Hope/Chinese Spring
2[a]	*Sr11*	Yalta PI 155433	Kenya C6402/Pusa4//Dundee
	Sr6	ISr6-Ra CI 14163	Red Egyptian/Chinese Spring
	Sr8a	Mentana W1124 PI 221154	Rieti/Wilhelmina//Akagomughi
	Sr9g	Acme CI 5284	Selection from Kubanka (CI 1516)
3[a]	*Sr36*	W2691SrTt-1 CI 17385	CI 12632 *T. timopheevii*
	Sr9b	Prelude*4/2/Marquis*6/Kenya 117A	Kenya 117A
	Sr30	Festiguay W2706 PI 330957	Festival/Uruguay C10837
	Sr17	Prelude/8*Marquis*2/2/Esp 518/9	Esp 518/9
4[б]	*Sr9a*	ISr9a-Ra CI 14169	Red Egyptian/Chinese Spring
	Sr9d	ISr9d-Ra CI 14177	Hope/Chinese Spring
	Sr10	W2691Sr10 CI 17388	Marquis*4/Egypt NA95/2/2*W2691
	SrTmp	CnsSrTmp	Triumph 64 (CI 13679)/Chinese Spring
5[в]	*Sr24*	LcSr24Ag	Little Club/Agent (CI 13523)
	Sr31	Kavkaz/Federation4	Kavkaz
	Sr38	Trident	Spear*4/VPM (PI 519303)
	SrMcN	McNair 701 (CI 15288)	Unknown

[a] Recommended by (Roelfs, Martens, 1988); [b] (Roelfs et al., 1993); [c] (Jin et al., 2008).

By present time race Ug99 and its variations have identified in Egypt, Ethiopia, Eritrea, Iran, Kenya, Mozambique, Ruanda, South Africa, Sudan, Tanzania, Uganda, Yemen, and Zimbabwe (Singh et al., 2015; http://rusttracker.cimmyt.org/?page_id=22). Among these countries Egypt is the most recent country where race Ug99 has been detected (Singh et al., 2015; Patpour et al., 2016).

In review articles at regular intervals Singh et al. (2008, 2011, 2015) showed the significance, emergence, evolution, and geographical distribution of the racial group Ug99. Each review presented update information on the last known statute of Ug99 group and major instants in alteration of the pathogen since 2010.

The rest widespread races of stem rust

Currently the phytopathologists are actively busy in detecting and monitoring other races dangerous for commercial wheat varieties and it has resulted in identification of various races within wide geographical range. In 2013–2014 a serious epidemic of stem rust occurred in the southern part of Ethiopia in the result of emergence of a new race (TKTTF) on a widely grown wheat variety Digalu (Olivera et al., 2015), and in connection with that the race is sometimes called 'Digalu'. The point is that race TKTTF absolutely differs from Ug99 in genetic structure and has the following virulence formula (avirulent/virulent): *Sr11*, *Sr24*, *Sr31/Sr5*, *Sr6*, *Sr7b*, *Sr8a*, *Sr9a*, *Sr9b*, *Sr9d*, *Sr9e*, *Sr9g*, *Sr10*, *Sr17*, *Sr21*, *Sr30*, *Sr36*, *Sr38*, *SrTmp* and *SrMcN*. Some wheat varieties and lines resistant to race Ug99 variations are susceptible to race TKTTF (Olivera et al., 2015). Race TKTTF and its closely related races have been detected in Turkey (Mert et al., 2012), Germany (Olivera Firpo, 2017), Iran, Lebanon, Ethiopia and Egypt (Singh et al., 2015). German TKTTF isolates phenotypically differ from TKTTF isolated in Ethiopia and Turkey (Olivera Firpo, 2017). This race was last recorded in United Kingdom, so it had been supposed that race TKTTF was disseminated all around Europe with air flows (Lewis et al., 2018).

In 2016 another virulent race TTTTF was identified in Italy (Sicily) on durum wheat (Bhattacharya, 2017). The researchers from the Global Rust Research Center shared a major concern in the warning report that TTTTF could infect not only durum wheat and bread wheat. Race TTTTF has complex virulence, but neither is it associated with race Ug99 and is avirulent to genes *Sr31*, *Sr24* and *Sr25*.

Currently the origin of races TKTTF and TTTTF is unknown and in this connection it is necessary to assay the fungal isolates in Africa, in the Middle East and in the Central Asia (Singh et al., 2015; Bhattacharya, 2017).

On the territory of the former Soviet Union the race composition of wheat stem rust was studied since 1937. Particularly, during two seasons Barmenkov (1939) detected 9 physiological races of the fungus in various regions of the USSR. After that the studies stopped for a long period of time and restarted only in 1959 (Konovalova et al., 1970).

In Kazakhstan during a long time the gene fund of virulence and race composition of stem, yellow and leaf rust is studied by the specialists of the Research Institute for Biological Safety Problems (RIBSP). From 1965 through 2005 at the institute

Table 2. Race composition of the *P. graminis* f. sp. *tritici* population in Kazakhstan during years 1985–2005

Origin of infection (crop, variety, wild cereal)	Reaction on the differential varieties, points												Race
	Little club	Marquis	Reliance	Kota	Arnautka	Mindum	Spelmar	Kubanka	Acme	Eincorn	Vernal	Khapli	
Soft wheat, Tselinnaya 3S	4	4	0	3	1	1	1	3	3	3	0	1	1
Soft wheat, Saratovskaya 29	4	4	3+	3	4	4	4	3	3	3	1	1	11
Soft wheat, Kazakhstanskaya 4	4	4	4	3–	4	4	4	3–	3–	4	4	1	15
Soft wheat, Omskaya 19, Akmola 2	4	4	0	3	4	4	4	3–	4	3	0–1	0–1	17
Soft wheat, Tselinnaya yubileinaya, Akmola 2	4	4	0	3	4	4	4	4	3	1+	0	1	21
Durum wheat, Bezenchukskaya 139	4	4	0	2	4	4	4	3	3	3	1	0	24
Soft wheat, Akmola 2	4	4	4	4	4	4	4	4	3	1	0–1	0–1	34
Soft wheat, Kazakhstanskaya 17, Akmola 2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4	1–	40
Quack grass	4	2+	0	1	4	4	4	4	4	3+	3+	1	53
Soft wheat, Kazakhstanskaya 19	4	4	3–	3–	3–	3–	3–	4–	3+	1+	X	1	77
Russian wild rye	4	1+	3–	1–	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	1	83
Quack grass	4	2	3+	1	4	4	4	4	3+	1	1	1	95
Slender wheat grass	4	4	3	3–	3+	3+	3+	3+	3+	3	X	1	110
Soft wheat, Tselinnaya 3S, Akmola 2	4	4	0	0;	4–	4–	4–	4–	4	3+	3+	1–	117
Soft wheat, Omskaya 19	4	2–	0	3–	4	4	4	4	4	1–	1–	1–	207
Soft wheat, Kazakhstanskaya 10	4	2	3	0	4	4	4	1	1	3	0	0	228

the old standard differential set was used to identify the stem rust races (Stakman et al., 1962; Konovalova et al., 1977). As the result in 1965 and 1966 the wheat stem rust population in the regions of Kazakhstan and West Siberia has been presented by a great number of races, though races 17, 21, 34, 40, 77 that are characterized by substantial aggressiveness to the zonal varieties of spring wheat have prevailed (Kulikova, Yurchikova, 1971). Studies on survival ability of the stem rust races in mixture on various wheat varieties have shown an ability of races 17 and 21 to force out the rest races in population, and that explains their permanent and everywhere prevalence (Kulikova, Kurbatova, 1977a).

Assay of the spores of the stem rust pathogen collected in 1985–2005 in the grain-growing regions of Kazakhstan has shown relative identity of the race composition of the fungal populations. Races 11, 17, 21, 34 were recorded in the aecidiopopulation. Uredopopulation of the fungus was diverse in its race composition: apart from 4 already mentioned races the following races were differentiated: 1, 15, 24, 40, 53, 77, 83, 95, 110, 117, 207 and 228. Thus on the territory of Kazakhstan during years 1985–2005 16 races of stem rust (Table 2) were differentiated following the old technique (Rsaliyev et al., 2005; Rsaliyev, 2008).

In 1985–2005 races 11, 17, 21 and 34 prevailed on wheat fields in Kazakhstan; sometimes shares of races 40 and 117 increased. In addition, the other races shown in Table 2 occurred in populations of years 1985–1990 and 1991–1995; frequency of their occurrence was within 5 % each (Fig. 2).

Since 2006 races of the wheat stem rust are differentiated in Kazakhstan following the method of Roelfs and Martens (1988) according to which race composition of the pathogen is determined with use of 12 isogenous lines with genes *Sr5*,

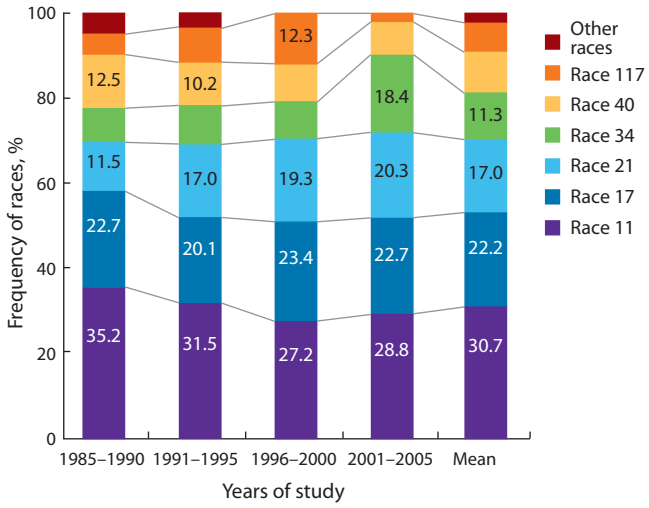


Fig. 2. Occurrence of *P. graminis* f. sp. *tritici* races on wheat in Kazakhstan.

Sr21, *Sr9e*, *Sr7b*, *Sr11*, *Sr6*, *Sr8a*, *Sr9g*, *Sr36*, *Sr9b*, *Sr30* and *Sr17*. In Kazakhstan an extra, the fourth, set of differential wheat varieties (*Sr24*, *Sr25*, *Sr27*, *Sr32*) was added for higher differentiating ability. The results of studies with use of the above method are shown in our previous publications (Rsaliyev, 2008, 2011; Rsaliyev et al., 2010). Particularly in 2006–2007 it has been found that Kazakhstanean population of stem rust contains strongly virulent races dangerous for the commercial wheat varieties in the republic. As it was stated before marked progress of the pathogen was observed in the northern regions of Kazakhstan during that period (Rsaliyev, 2008; Kokhmetova et al., 2011; Koishybayev, 2018). Some

races were virulent to all tested isogenous *Sr*-lines (Rsaliyev, 2008) available in North American nomenclature of *P. graminis* f. sp. *tritici* races (Roelfs, Martens, 1988). The analogous results were obtained by the other researchers; in particular, race TTTT with virulence to all 16 genes-differentiators (*Sr5*, *21*, *9e*, *7b*, *11*, *6*, *8a*, *9g*, *36*, *9b*, *30*, *17*, *9a*, *9d*, *10*, *Tmp*) of wheat stem rust was identified in 2003 in Texas, USA (Jin, 2005).

Skolotneva et al. (2013) have shown that in the central regions of Russia races of the pathogen virulent to lines *Sr – 5*, *21*, *9e*, *7b*, *6*, *8a*, *9g*, *36*, *30*, *9a*, *9d*, *10*, *Tmp*, *38*, *Wld* are frequent. It should be noted that in Kazakhstan till present time the basic isogenous lines (*Sr9a*, *Sr9d*, *Sr10*, *SrTmp*, *Sr31*, *Sr38* and *SrMcN*) that differentiate races Ug99, TKTTF and TTTTF according to Jin et al. (2008) were not used in studying race composition of the fungus (Rsaliyev, 2008, 2011; Rsaliyev et al., 2010). Due to that it is so far impossible to attribute to any group Kazakhstanean races of the fungus or to determine their similarity to the known races of the pathogen (Ug99, TKTTF, TTTTF or any other). To solve this problem and taking into account the deteriorating phytopathological situation associated with stem rust epidemics in major wheat-growing regions of Kazakhstan we initiated the study of the collection and modern isolates of the fungus with use of the latest differential set according to North American nomenclature of *P. graminis* f. sp. *tritici* races (Jin et al., 2008).

By present time the collection of rust fungi has been created in the RIBSP as the result of many years efforts. It contains historical and modern isolates of *P. graminis* f. sp. *tritici* that have been collected at different time from ten regions of Kazakhstan, seven regions of Russia and two regions of Kyrgyzstan. To determine similarity of Kazakhstanean races to new virulent races TKTTF and TTTTF the differential set has been supplemented with lines possessing *Sr13* gene that is absent in North American nomenclature of *P. graminis* f. sp. *tritici* races (Roelfs, Martens, 1988; Roelfs et al., 1993; Jin et al., 2008). *Sr13* gene was initially identified from durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum* (Desf.) Husn.), and then introgressed into genome of soft wheat (Knott, 1990). It is localized on chromosome 6AL, originates in Khapli variety (*T. durum*), and its testing line is Khapstein/9*LMPG (Knott, 1990). The gene demonstrates resistance to many races in Ug99 group (types of infection vary within 2–2+) (Jin et al., 2007).

Role of barberry in generation of new *P. graminis* f. sp. *tritici* races

In some countries composition of the fungal populations is studied on barberry species (*Berberis* spp.) that serve as the alternate hosts of the wheat stem rust for sexual recombination resulting in emergence of new virulent races of the pathogen (Jin, 2011; Skolotneva et al., 2013). Some North American races of stem rust, namely races 56, 15B and QCC, were initially found on barberry and afterwards were responsible for large-scale epidemics of the disease (Jin, 2011). However not all barberry species are susceptible to stem rust. As one knows among barberry species identified previously in Southern Africa only *B. holstii* and *B. vulgaris* are susceptible to stem rust (Glen, 2002). Recently in this country two foreign species of barberry (*B. julianae* and *B. aristata*) spreading in the natural ecosystems have been found, but their resistance to the pathogen is not studied yet (Keet et al., 2016).

In Kazakhstan rye and oat forms of the stem rust pathogen occur on the barberry species, and wheat form is utterly rare. Due to that barberry is immaterial here to spread of the infection on wheat fields (Dzhiyembayev et al., 1974). According to (Abiyev, Yesengulov, 1995) out of 10 barberry species growing in Kazakhstan only five demonstrated development of the fungus. At the same time according to observations of Koishybayev (2018) in 1996–2000 in arboretum near Shortandy (Akmola Region) spermogonia and aecia of stem rust developed on the barberry in the 2nd and 3rd decades of May. In spite of weak development of stem rust on the alternate host in 1999 Russian wild rye was severely affected by the disease (up to 50–75 %) (Koishybayev, 2018). Except wheat and barberry the major feeding plants for stem rust are *Hordeum vulgare* L., *Elytrigia repens* L., *E. geniculata* Nevski, *E. intermedia* Nevski, *Elymus sibiricus* L., *El. junceus* L., *Agropyron cristatum* L. (Koishybayev, 2018). So, high infectious potential of the fungus maintained in nature on wild cereals does not eliminate mass manifestation of stem rust under favorable conditions. Regular monitoring of the pathogen's progress on the alternate host (barberry species) is also necessary.

Thus, analysis of the published data evidences the topicality of studying populations of the agent causing stem rust of wheat, mechanisms of variability of the fungus for elaboration of the science-based genetic protection of wheat against the disease. Currently large-scale research is conducted in many countries of the world and the certain progress concerning identification of races of *P. graminis* f. sp. *tritici* has been achieved. New data will allow the researchers of wheat breeding and biotechnological centers to more effectively work towards obtaining forms of wheat resistant to the most virulent races of the pathogen and select the most promising donors of resistance in the wheat breeding process.

Acknowledgements

The work was carried out under financial support of the RK Ministry of Education and Science in the frames of the program of grant financing for years 2018–2020 (grant No. AP05132236) and of the RK Ministry of Agriculture in the frames of the program-target financing for years 2018–2020 (IRN BR06249329).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Абиев С.А., Есенгулова Б.Ж. Роль промежуточных хозяев ржавчинных грибов злаков. Вестн. с.-х. науки Казахстана. 1995;8:36-47. [Abiyev S.A., Esengulova B.Zh. The role of intermediate hosts of cereal rust fungi. Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki Kazakhstana = Bulletin of Agricultural Sciences of Kazakhstan. 1995;8:36-47. (in Russian)]

Барменков А.С. Выявление физиологических рас *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Докл. ВАСХНИЛ. 1939;10:20-22. [Barmenkov A.S. Identification of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* physiological races. Doklady VASKHNIL = Reports of the Academy of Agricultural Sciences. 1939;10:20-22. (in Russian)]

Джиембаев Ж.Т., Бубенцов С.Т., Турапин В.П. Барбарис и его роль как промежуточника стеблевой ржавчины злаков. Вестн. с.-х. науки Казахстана. 1974;7:110-112. [Dzhiyembayev Zh.T., Bubensov S.T., Turapin V.P. Barberry and its

role as an intermediate host of cereal stem rust. Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki Kazakhstana = Bulletin of Agricultural Sciences of Kazakhstan. 1974;7:110-112. (in Russian)]

Жаппарова Г.А., Рсалиев Ш.С. Криоконсервация и сохранение биологических свойств фитопатогенных грибов. Исследование, результаты. 2012;4:12-17.
[Zhapparova G.A., Rsaliyev Sh.S. Cryopreservation and preservation of the biological properties of fungal plant pathogens. Issledovanie, Rezultaty = Research, Results. 2012;4:12-17. (in Russian)]

Койшыбаев М. Болезни пшеницы. Анкара: ФАО, 2018.
[Koishybaev M. Wheat Diseases. Ankara: FAO, 2018. (in Russian)]

Коновалова Н.Е., Семенова Л.П., Сорокина Г.К., Щекоткова Т.В., Суздальская М.В., Буканова В.К., Жемчужина А.И., Горбунова Ю.В., Рогожина Э.М., Соломатин Д.А., Королева Л.А., Щелко Л.Г. Методические рекомендации по изучению расового состава возбудителей ржавчины хлебных злаков. М.: ВАСХНИЛ, 1977.
[Konovalova N.Ye., Semenova L.P., Sorokina G.K., Shchekotkova T.V., Suzdalskaya M.V., Bukanova V.K., Zhemchuzhina A.I., Gorbunova Yu.V., Rogozhina E.M., Solomatin D.A., Koroleva L.A., Shchelko L.G. Guidelines for studying the race range of the causative agents of cereal rusts. Moscow: VASKHNIL, 1977. (in Russian)]

Коновалова Н.Е., Суздальская М.В., Жемчужина А.И. Динамика расового состава возбудителей ржавчинных заболеваний хлебных злаков в СССР. Микология и фитопатология. 1970;4(2): 107-121.
[Konovalova N.Ye., Suzdalskaya M.V., Zhemchuzhina A.I. Changes in the race range of cereal rusts in the USSR. Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 1970;4(2):107-121. (in Russian)]

Куликова Г.Н., Курбатова В.Ш. Выживаемость рас стеблевой ржавчины в смеси на различных сортах пшеницы. Вестн. с.-х. науки Казахстана. 1977а;6:40-42.
[Kulikova G.N., Kurbatova V.Sh. The survival rate of stem rust races in a mixture of different wheat varieties. Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki Kazakhstana = Bulletin of Agricultural Sciences of Kazakhstan. 1977a;6:40-42. (in Russian)]

Куликова Г.Н., Курбатова В.Ш. Определение биотипов стеблевой ржавчины пшеницы из разных географических зон. Вестн. с.-х. науки Казахстана. 1977б;7:38-40.
[Kulikova G.N., Kurbatova V.Sh. Identification of stem rust biotypes of wheat from different geographical areas. Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki Kazakhstana = Bulletin of Agricultural Sciences of Kazakhstan. 1977b;7:38-40. (in Russian)]

Куликова Г.Н., Юрчикова Т.И. О расах стеблевой ржавчины пшеницы в 1965–1966 гг. Вестн. с.-х. науки Казахстана. 1971;3:118-123.
[Kulikova G.N., Yurchikova T.I. On the races of wheat stem rust in 1965–1966. Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki Kazakhstana = Bulletin of Agricultural Sciences of Kazakhstan. 1971;3:118-123. (in Russian)]

Лапочкина И.Ф., Баранова О.А., Шаманин В.П., Волкова Г.В., Гайнуллин Н.Р., Анисимова А.В., Галингер Д.Н., Лазарева Е.Н., Гладкова Е.В., Ваганова О.Ф. Создание исходного материала яровой мягкой пшеницы для селекции на устойчивость к стеблевой ржавчине (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), в том числе и к расе UG99, в России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(3):320-328. DOI 10.18699/VJ16.167.
[Lapochkina I.F., Baranova O.A., Shamanin V.P., Volkova G.V., Gainullin N.R., Anisimova A.V., Galinger D.N., Lazareva E.N., Gladkova E.V., Vaganova O.F. The development of initial material of spring common wheat for breeding for resistance to stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), uncluding the Ug99 race, in Russia. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2017;7(3):308-317. DOI 10.1134/S207905971703008X.]

Мироненко Н.В. Современные достижения в изучении генетической структуры популяций фитопатогенных грибов. Успехи соврем. биологии. 2004;124(3):234-245.
[Mironenko N.V. Advances in the study of the genetic structure of phytopathogenic fungi populations. Uspekhi Sovremennoy Biologii = Biology Bulletin Reviews. 2004;124(3):234-245. (in Russian)]

Плахотник В.В. Стеблевая ржавчина на севере Казахстана и устойчивость к ней образцов коллекции яровой пшеницы. Труды V Всесоюз. совещ. по иммунитету растений. Киев, 1969;3:72-75.
[Plakhotnik V.V. Stem rust in Northern Kazakhstan and resistance to it in accessions of a spring wheat collection. Proceedings of the 5th All-Union Workshop on Plant Immunity. Kiev, 1969;3:72-75. (in Russian)]

Рсалиев А.С. Патотипы стеблевой ржавчины пшеницы в Казахстане. Защита и карантин растений. 2011;10:41.
[Rsaliyev A.S. Pathotypes of wheat stem rust in Kazakhstan. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2011; 10:41. (in Russian)]

Рсалиев Ш.С. Новые патотипы стеблевой ржавчины пшеницы в Казахстане и их вирулентность к зерновым культурам. Защита и карантин растений в Казахстане. 2008;1:7-12.
[Rsaliyev Sh.S. New wheat stem rust pathotypes in Kazakhstan and their virulence to cereals. Zashchita i Karantin Rasteniy v Kazakhstane = Plant Protection and Quarantine in Kazakhstan. 2008;1:7-12. (in Russian)]

Рсалиев Ш.С., Койшыбаев М.К., Моргунов А.И., Колмер Дж. Анализ состава популяции стеблевой и листовой ржавчины пшеницы на территории Казахстана. Современные проблемы защиты и карантина растений: Сб. статей междунар. науч.-практ. конф. Алматы, 2005;267-272.
[Rsaliyev Sh.S., Koyshybayev M.K., Morgunov A.I., Kolmer Dzh. Analysis of the composition of wheat stem and leaf rust population in Kazakhstan. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference “Current Issues in Plant Protection and Quarantine”. Almaty, 2005;267-272. (in Russian)]

Рсалиев Ш.С., Савинков А.Ф. Коллекции фитопатогенных грибов и пути их использования в биотехнологических программах. Биотехнология. Теория и практика.1998;1-2:142.
[Rsaliyev Sh.S., Savinkov A.F. Collections of phytopathogenic fungi and ways of their use in biotechnological programs. Biotekhnologiya. Teoriya i Praktika = Biotechnology. Theory and Practice. 1998; 1-2:142. (in Russian)]

Санин С.С., Кайдаш А.С., Чуприна В.П., Бабина Ф.А. Репродуктивная способность гриба *P. graminis* f. sp. *tritici* на сортах пшеницы с разной устойчивостью к стеблевой ржавчине. Микология и фитопатология. 1978;12(2):68-71.
[Sanin S.S., Kaydash A.S., Chuprina V.P., Babina F.A. Reproductive ability of the fungus *P. graminis* f. sp. *tritici* on wheat varieties differing in stem rust resistance. Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 1978;12(2):68-71. (in Russian)]

A Global Wheat Rust Monitoring System. Available at http://rusttracker.cimmyt.org

Admassu B., Friedt W., Ordon F. Genetic characterization of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* populations from Ethiopia by SSRs. J. Phytopathol. 2010;158:806-812. DOI 10.1111/j.1439-0434.2010.01702.x.

Bhattacharya S. Deadly new wheat disease threatens Europe’s crops. Nature. 2017;542:145-146. DOI 10.1038/nature.2017.21424.

Boshoff W.H.P., Pretorius Z.A., Van Niekerk B.D., Komen J.S. First report of virulence in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* to wheat stem rust resistance genes *Sr8b* and *Sr38* in South Africa. Plant Dis. 2002; 86:922. DOI 10.1094/PDIS.2002.86.8.922B.

Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K., Di Pietro A., Spanu P., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 2012;13:414-430. DOI 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.

Duplessis S., Cuomo C.A., Lin Y.-C., Aerts A., Tisserant E., Veneault-Fourrey C., Joly D.L., Hacquard S., Amselem J., Cantarel B.L., Chiu R., Coutinho P.M., Feau N., Field M., Frey P., Gelhaye E., Goldberg J., Grabherr M.G., Kodira C.D., Kohler A., Kües U., Lindquist E.A., Lucas S.M., Mago R., Mauceli E., Morin E., Murat C., Pangilinan J.L., Park R., Pearson M., Quesneville H., Rouhier N., Sakthikumar S., Salamov A.A., Schmutz J., Selles B.,

Shapiro H., Tanguay P., Tuskan G.A., Henrissat B., van de Peer Y., Rouzé P., Ellis J.G., Dodds P.N., Schein J.E., Zhong S., Hamelin R.C., Grigoriev I.V., Szabo L.J., Martin F. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011;108:9166-9171. DOI 10.1073/pnas.1019315108.

German S.E., Barcellos A., Chaves M., Kohli M., Campos P., de Viedma L. The situation of common wheat rusts in the Southern Cone of America and perspectives for control. Aust. J. Agric. Res. 2007;58: 620-630. DOI 10.1071/AR06149.

Glen H.F. Cultivated Plants of Southern Africa. Jacana, Johannesburg, 2002.

Green G.J. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis tritici* in Canada. Can. J. Plant Pathol. 1981;3:33-39. DOI 10.1080/07060668109501400.

Jin Y. Races of *Puccinia graminis* identified in the United States during 2005. Plant Dis. 2005;89(10):1125-1127. DOI 10.1094/PD-89-1125.

Jin Y. Role of *Berberis* spp. as alternate hosts in generating new races of *Puccinia graminis* and *P. striiformis*. Euphytica. 2011;179:105-108. DOI 10.1007/s10681-010-0328-3.

Jin Y., Singh R.P., Ward R.W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Fetch T., Pretorius Z.A., Yahyaui A. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Plant Dis. 2007;91:1096-1099. DOI 10.1094/ PDIS-91-9-1096.

Jin Y., Szabo L.J., Pretorius Z.A., Singh R.P., Ward R., Fetch T., Jr. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Plant Dis. 2008;92:923-926. DOI 10.1094/ PDIS-92-6-0923.

Jin Y., Szabo L.J., Rouse M., Fetch T., Pretorius Z.A., Singh R.P., Wanyera R., Njau P. Detection of virulence to resistance gene *Sr36* within race TTKS lineage of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Plant Dis. 2009;93:367-370. DOI 10.1094/ PDIS-93-4-0367.

Keet J.-H., Cindi D.D., du Preez P.J. Assessing the invasiveness of *Berberis aristata* and *B. julianae* (Berberidaceae) in South Africa: Management options and legal recommendations. S. Afr. J. Bot. 2016; 105:288-298. DOI 10.1016/j.sajb.2016.04.012.

Knott D.R. Can losses from wheat stem rust be eliminated in North America. Crop Sci. 1971;11(1):97-99. DOI 10.2135/cropsci1971.0011183X001100010033x.

Knott D.R. Near-isogenic lines of wheat carrying genes for stem rust resistance. Crop Sci. 1990;30:901-905. DOI 10.2135/cropsci1990.0011183X003000040029x.

Kokhmetova A., Morgunov A., Rsaliev S., Rsaliev A., Yessenvekova G., Typina L. Wheat germplasm screening for stem rust resistance using conventional and molecular techniques. Czech J. Genet. Plant Breed. 2011;47:146-154. DOI 10.17221/3270-CJGPB.

Lewis C.M., Persoons A., Bebber D.P., Kigathi R.N., Maintz J., Findlay K., Bueno-Sancho V., Corredor-Moreno P., Harrington S.A., Kangara N., Berlin A., García R., Germán S.E., Hanzalová A., Hodson D.P., Hovmøller M.S., Huerta-Espino J., Imtiaz M., Mirza J.I., Justesen A.F., Niks R.E., Omrani A., Patpour M., Pretorius Z.A., Roohparvar R., Sela H., Singh R.P., Steffenson B., Visser B., Fenwick P.M., Thomas J., Wulff B.B., Saunders D.G.O. Potential for re-emergence of wheat stem rust in the United Kingdom. Communications Biology. 2018;1:13. DOI 10.1038/s42003-018-0013-y.

Loegering W.O., Harmon D.L., Clark W.A. Storage of urediospores of *Puccinia graminis tritici* in liquid nitrogen. Plant Dis. Rep. 1966; 50:502-506.

McDonald B.A. The population genetics of fungi: tools and techniques. Phytopathology. 1997;87:148-453. DOI 10.1094/PHYTO.1997.87.4.448.

Mert Z., Karakaya A., Dusunceli F., Akan K., Cetin L. Determination of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* races of wheat in Turkey. Turk. J. Agric. For. 2012;36:107-120. DOI 10.3906/tar-1010-1278.

Olivera P., Newcomb M., Szabo L.J., Rouse M., Johnson J., Gale S., Luster D.G., Hodson D., Cox J.A., Burgin L., Gilligan C.A., Patpour M., Justesen A.F., Hovmøller M.S., Woldeab G., Hailu E., Hundie B., Tadesse K., Pumphrey M., Singh R.P., Jin Y. Phenotypic and genotypic characterization of race TKTTF of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* that caused a wheat stem rust epidemic in southern Ethiopia in 2013–14. Phytopathology. 2015;105:917-928. DOI 10.1094/PHYTO-11-14-0302-FI.

Olivera Firpo P., Newcomb M., Flath K., Sommerfeldt-Impe N., Szabo L., Carter M., Luster D., Jin Y. Characterization of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* isolates derived from an unusual wheat stem rust outbreak in Germany in 2013. Plant Pathol. 2017;66:1258-1266. DOI 10.1111/ppa.12674.

Park R.L. Stem rust of wheat in Australia. Aust. J. Agric. Res. 2007; 58:558-566. DOI 10.1071/AR07117.

Patpour M., Hovmøller M.S., Shahin A.A., Newcomb M., Olivera P., Jin Y., Luster D., Hodson D., Nazari K., Azab M. First report of the Ug99 race group of wheat stem rust, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, in Egypt in 2014. Plant Dis. 2016;100(4):863. DOI 10.1094/PDIS-08-15-0938-PDN.

Peturson B. Wheat rust epidemics in western Canada in 1953, 1954 and 1955. Can. J. Plant Sci. 1958;38(1):16-28. DOI 10.4141/cjps58-004.

Pretorius Z.A., Bender C.M., Visser B., Terefe T. First report of a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* race virulent to the *Sr24* and *Sr31* wheat stem rust resistance genes in South Africa. Plant Dis. 2010;94:784. DOI 10.1094/PDIS-94-6-0784C.

Pretorius Z.A., Pakendorf K.W., Marais G.F., Prins R., Komen J.S. Challenges for sustainable control of cereal rust diseases in South Africa. Aust. J. Agric. Res. 2007;58:593-601. DOI 10.1071/AR06144.

Pretorius Z.A., Singh R.P., Wagoire W.W., Payne T.S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. Plant Dis. 2000;84:203. DOI 10.1094/PDIS.2000.84.2.203B.

Roelfs A.P. Race specificity and methods of study. In: Bushnell W.R., Roelfs A.P. (Eds.). The Cereal Rusts. Vol. I. Origins, Specificity, Structure, and Physiology. Orlando, Florida: Acad. Press Inc., 1984; 131-164.

Roelfs A.P., Long D.L., Roberts J.J. Races of *Puccinia graminis* in the United States during 1990. Plant Dis. 1993;77:125-128. DOI 10.1094/PD-77-0125.

Roelfs A.P., Martens J.W. An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology. 1988;78:526-533. DOI 10.1094/Phyto-78-526.

Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. CIMMYT, D.F., Mexico, 1992.

Rsaliyev Sh., Tileubaeva Zh., Agabaeva A., Rsaliyev A. Virulence of wheat leaf, stem and yellow rust pathotypes in Kazakhstan. Asian Australas. J. Plant Sci. Biotechnol. 2010;4(1):71-76.

Shamanin V., Salina E., Wanyera R., Zelenskiy Y., Olivera P., Morgounov A.I. Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. Euphytica. 2016;212(2): 287-296. DOI 10.1007/s10681-016-1769-0.

Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Jin Y., Bhavani S., Njau P., Herrera-Foessel S.A., Singh P.K., Singh S., Govindan V. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. Annu. Rev. Phytopathol. 2011;49:465-481. DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095423.

Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Jin Y., Njau P., Wanyera R., Herrera-Foessel S.A., Ward R.W. Will stem rust destroy the world's wheat crop? Adv. Agron. 2008;98:271-309. DOI 10.1016/S0065-2113(08)00205-8.

Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y., Lagudah E.S., Ayliffe M.A., Bhavani S., Rouse M.N., Pretorius Z.A., Szabo L.J., Huerta-Espino J., Basnet B.R., Lan C., Hovmøller M.S. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: Continued threat to food security and prospects of genetic control. Phytopathology. 2015;10:872-884. DOI 10.1094/PHYTO-01-15-0030-FI.

Skolotneva E.S., Lekomtseva S.N., Kosman E. The wheat stem rust pathogen in the central region of the Russian Federation. Plant Pathol. 2013;62:1003-1010. DOI 10.1111/ppa.12019.

Stakman E.C., Piemeical F.J. Biological forms of *Puccinia graminis* on cereals and grasses. J. Agric. Res. 1917;10:429-495.

Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of Physiologic Races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. USDA ARS Bull. 1962.

Szabo L.J. Development of a rapid molecular assay for the Ug99 race

group of *Puccinia graminis*. (Abstr.) Phytopathology. 2012;102(4): 117.

Visser B., Herselman L., Pretorius Z.A. Genetic comparison of Ug99 with selected South African races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Mol. Plant Pathol. 2009;10:213-222. DOI 10.1111/j.1364-3703.2008.00525.x.

Wanyera R., Kinyua M.G., Jin Y., Singh R.P. The spread of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* with virulence on *Sr31* in Eastern Africa. Plant Dis. 2006;90:113. DOI 10.1094/PD-90-0113A.

Watson I.A., Luig N.H. The classification of *Puccinia graminis* var. *tritici* in relation to breeding resistant varieties. Proc. Lin. Soc. N.S.W. 1963;88:235-258.

Zeller F.J., Hsam S.L.K. Broadening the genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin. In: Sakamoto S. (Ed.). Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp. Kyoto, Japan, 1983;161-173.

Zhong S., Leng Y., Friesen T.I., Faris J.D., Szabo L.J. Development and characterization of expressed sequence tag-derived microsatellite markers for the wheat stem rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology. 2009;99:282-289. DOI 10.1094/PHYTO-99-3-0282.

ORCID ID

A.S. Rsaliyev orcid.org/0000-0002-9921-6076

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):978-986
DOI 10.18699/VJ18.440

Идентификация генотипов-носителей устойчивости к токсинам пиренофороза Ptr ToxA и Ptr ToxB *Pyrenophora tritici-repentis* в коллекции мягкой пшеницы

А.М. Кохметова[1] ✉, С. Али[2], З. Сапахова[1], М.Н. Атишова[1]

[1] Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан
[2] Отдел агрономии, садоводства и растениводства, Университет Южной Дакоты, Брукингс, Южная Дакота, США

Pyrenophora tritici-repentis (Ptr) является возбудителем пиренофороза, одной из болезней пшеницы, которая лимитирует урожай и быстро прогрессирует в странах, возделывающих пшеницу, включая Казахстан. Целью исследования была идентификация генотипов пшеницы, устойчивых к Ptr, расе 1 и расе 5, и их хозяин-селективным эффекторам (токсинам) Ptr ToxA и Ptr ToxB *P. tritici-repentis* (tan spot). Охарактеризована коллекция мягкой пшеницы (41 образец, в том числе 38 экспериментальных и 3 контрольных) с использованием молекулярных маркеров *Xfcp623* и *XBE444541*, диагностических для генов *Tsn1* и *Tsc2*, контролирующих чувствительность к токсинам гриба. Совпадение аллеля маркера *XBE444541* с устойчивостью растения к расе 5 составило 92.11 %, а к токсину Ptr ToxB – 97.37 %. Результаты генотипирования с использованием маркера *Xfcp623* подтвердили ожидаемую реакцию на Ptr ToxA; наличие/отсутствие маркера *Xfcp623* полностью (100 %) совпадало с чувствительностью/устойчивостью к расе 1 и Ptr ToxA. Это свидетельствует о надежности диагностического маркера *Xfcp623* для идентификации генотипов пшеницы с устойчивостью к грибу и нечувствительностью к токсину Ptr ToxA. Изучение реакции генотипов пшеницы на инокуляцию гриба и инфильтрацию токсинов показало, что 30 из 38 проанализированных генотипов (или 78 %) проявили устойчивость к расе 1 и расе 5, а также нечувствительность к токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB. Наибольший интерес представляют восемь генотипов пшеницы, которые показали устойчивость/нечувствительность как к двум расам, так и к двум токсинам. Результаты фенотипирования подтверждены с помощью молекулярных маркеров. Чувствительность к Ptr ToxB не всегда коррелировала с восприимчивостью к расе 5 и зависела от генетического фона хозяина, т. е. от конкретного генотипа пшеницы. Полученные результаты представляют интерес для повышения эффективности селекции на основе элиминации генотипов с доминантными аллелями *Tsn1* и *Tsc2*, чувствительными к токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB. Идентифицированные генотипы необходимо использовать в селекции на устойчивость пшеницы к пиренофорозу.

Ключевые слова: пшеница; *Pyrenophora tritici-repentis*; пиренофороз; *Tsn1*; *Tsc2*; ToxA; ToxB, ПЦР.

Identification of genotypes-carriers of resistance to tan spot Ptr ToxA and Ptr ToxB of *Pyrenophora tritici-repentis* in common wheat collection

A.M. Kokhmetova[1] ✉, Sh. Ali[2], Z. Sapakhova[1], M.N. Atishova[1]

[1] Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan
[2] Agronomy, Horticulture, and Plant Science Department, South Dakota State University, Brookings, SD 57006, USA

Pyrenophora tritici-repentis (Ptr) is the causative agent of tan spot, one of the yield limiting diseases of wheat, rapidly increasing in wheat growing countries including Kazakhstan. The aim of this study was the identification of wheat genotypes with resistance to Ptr race 1 and race 5 and their host-selective effectors (toxins) Ptr ToxA and Ptr ToxB. A common wheat collection of 41 accessions (38 experimental and 3 controls) was characterized using the molecular markers *Xfcp623* and *XBE444541*, diagnostic for the *Tsn1* and *Tsc2* genes conferring sensitivity to fungal toxins. The coincidence of the marker *XBE444541* with resistance to race 5 was 92.11 %, and with Ptr ToxB, 97.37 %. Genotyping results using the marker *Xfcp623* confirmed the expected response to Ptr ToxA; the presence/absence of the marker *Xfcp623* completely (100 %) coincided with sensitivity/resistance to race 1 and Ptr ToxA. This demonstrates the reliability of the diagnostic marker *Xfcp623* for identifying wheat genotypes with resistance to the fungus and insensitivity to Ptr ToxA. The study of the reaction of wheat germplasm to the fungal inoculation and toxin infiltration showed that out of 38 genotypes analyzed 30 (78 %) exhibited resistance to both race 1 and race 5, and insensitivity to toxins Ptr ToxA and ToxB. Of most significant interest are eight wheat genotypes that showed resistance/insensitivity both to the two races and two toxins. The results of phenotyping were reconfirmed by the molecular markers used in this study. Sensitivity to Ptr ToxB is not always correlated with susceptibility to race 5 and is dependent on the host's genetic background of the wheat genotype, i. e. on a specific wheat genotype. The results of the study are of interest for increasing the efficiency of breeding based on the elimination of the genotypes with the dominant alleles *Tsn1* and *Tsc2*

Received September 3, 2018
Revised October 5, 2018
Accepted October 8, 2018

✉ e-mail: gen_kalma@mail.ru

sensitive to the toxins Ptr ToxA and ToxB. The genotypes identified will be used in wheat breeding for resistance to tan spot.

Key words: wheat; *Pyrenophora tritici-repentis*; tan spot; *Tsn1*; *Tsc2*; ToxA; ToxB; PCR.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кохметова А.М., Али С., Сапахова З., Атишова М.Н. Идентификация генотипов-носителей устойчивости к токсинам пиренофороза Ptr ToxA и Ptr ToxB *Pyrenophora tritici-repentis* в коллекции мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):978-986. DOI 10.18699/VJ18.440

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kokhmetova A.M., Ali Sh., Sapakhova Z., Atishova M.N. Identification of genotypes-carriers of resistance to tan spot Ptr ToxA and Ptr ToxB of *Pyrenophora tritici-repentis* in common wheat collection. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):978-986. DOI 10.18699/VJ18.440 (in Russian)

Увеличение производства пшеницы и изменения в практике ее возделывания включают переход от традиционной обработки почвы к минимальной, с сохранением стерни на ее поверхности, и негативно влияют на фитопатологическую ситуацию. Монокультура и возделывание сортов пшеницы с недостаточным уровнем устойчивости к болезням способствуют накоплению инфекционного потенциала и развитию болезней листовых пятнистостей (БЛП) до масштабов эпидемии. Источниками инфекции являются инфицированные семена, растительные остатки посева предыдущего года, пораженные растения и дикорастущие злаки, восприимчивые к БЛП. Повышение температуры и проявление засухи из-за изменения климата приводят к быстрому старению листьев, что увеличивает распространение БЛП и угрожает глобальному производству пшеницы. В условиях, благоприятных для развития пиренофороза, потери урожая могут превышать 50 % (Rees et al., 1988). Вредоносность болезни заключается в уменьшении ассимиляционной поверхности, возрастании транспирации, уменьшении накопления органического вещества, поражении всех надземных органов растений, а также в потере качества зерна из-за формирования мелкого и невыполненного зерна.

Пиренофороз – одно из самых опасных и вредоносных заболеваний мягкой и твердой пшеницы во многих сельскохозяйственных регионах, которое быстро прогрессирует как во всем мире, так и в Казахстане. Эпифитотия этой болезни была ранее обнаружена в Бельгии (Maraite et al., 1992), Англии (Cook, Yarham, 1989), Румынии (Dumitras, Bontea, 1981), Польше, Венгрии, Латвии и Чехии (Šarová et al., 2003). На территории СНГ патоген встречается в России, Молдове, Украине, Белоруссии, Центральной Азии и Казахстане (Поспехов, 1989; Султанова, 2007).

В настоящее время отмечается нарастающее распространение и увеличение вредоносности пиренофороза пшеницы в Казахстане. В 1986 г. в северном регионе Казахстана пиренофороз на яровой пшенице развивался до уровня эпифитотии, с охватом 50–63 % площадей. Последующие эпифитотии с распространением до 40–50 % отмечались в 1993–1994 гг. В предгорной зоне Южного и Юго-Восточного Казахстана эпифитотийное развитие болезней листовых пятнистостей на озимой пшенице наблюдали четыре раза: в 1993, 2002 и 2003 гг. В период 2000–2005 гг. в этом регионе трижды происходило эпифитотийное развитие желтой ржавчины совместно с желтой пятнистостью листьев и септориозом. Установлено, что среди коммерческих и перспективных казахстанских сортов озимой пшеницы отсутствуют образцы, устойчивые к пиренофорозу (Койшибаев, 2002). В Восточном Казахстане заболевание отмечается ежегодно с пораженностью от 10–25 до 50–75 %. С увеличением доли озимой пшеницы в структуре посевов и ее возделыванием в монокультуре поражаемость болезнями листовых пятнистостей в Алматинской области повысилась до 75 % (Койшибаев, 2002).

Каждое совместное взаимодействие между базовой расой и соответствующей ей дифференцирующей линией происходит через посредника – хозяин-специфичный токсин (host selective toxins – HST). К настоящему времени известны четыре HST *Pyrenophora tritici-repentis*, каждый из которых имеет свою характеристику: токсин Ptr ToxA индуцирует некроз; токсины Ptr ToxB и Ptr ToxC – хлорозы; токсин Ptr ToxD индуцирует некроз и хлороз одновременно (Ballance et al., 1989; Ali et al., 2010). Идентифицированы изоляты *P. tritici-repentis*, производящие все возможные комбинации токсинов Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC, которые соответственно ранжированы как расы от 1-й до 8-й (Lamari, Bernier, 1989; Strelkov, Lamari, 2003).

Токсин Ptr ToxA – продукт одиночного гена, отвечает за развитие некрозов в тканях чувствительных образцов пшеницы, является рибосомально-синтезируемым белком с молекулярной массой 13.2 кДа, длиной 117 аминокислотных остатков (Tuori et al., 1995). Ptr ToxA вызывает некроз, контролируется доминантным геном *Tsn1* и способен синтезироваться в расах 1, 2, 7 и 8 (Strelkov, Lamari, 2003). Второй HST, токсин Ptr ToxB, синтезируется в расах 5 (Orolaza et al., 1995), 6, 7 и 8 (Martinez et al., 2001). Это низкомолекулярный водорастворимый, относительно термостабильный хозяин-специфичный белок (6.61 кДа) длиной в 63–64 аминокислотных остатка, представленный множественными копиями в геноме изолятов *P. tritici-repentis*. Ptr ToxB вызывает хлороз и контролируется доминантным геном *Tsc2* (Friesen, Faris, 2004). Третий токсин, Ptr ToxC, также вызывает хлорозы, синтезируется расами 3, 6 и 8 (Lamari, Bernier, 1991). Некротрофные эффекторы (NE) рассматриваются как факторы вирулентности, и было выдвинуто предположение, что чувствительность к NE приводит к восприимчивости к болезням (Anderson et al., 1999).

Расовый состав *P. tritici-repentis* был изучен ранее в Казахстане (Lamari et al., 2005; Zhanarbekova et al., 2005; Maraite et al., 2006). Анализ вирулентности *P. tritici-repentis*, распространенного в странах, расположенных по направлению Великого шелкового пути, показал широкое разнообразие патогена в Азербайджане и Сирии, где обна-

ружено по шесть и восемь рас соответственно, в то время как в Казахстане, Кыргызстане и Узбекистане выявлено только по две расы (Lamari et al., 2005). В Северном Казахстане наиболее распространенной оказалась раса 1. К ней относятся 87 % изолятов *P. tritici-repentis* из Центральной Азии и Казахстана, и только 7, 5 и 1 % были идентифицированы как расы 2, 3 и 4 соответственно (Zhanarbekova et al., 2005; Maraite et al., 2006). В результате сравнительного изучения расового состава *P. tritici-repentis* в России идентифицированы расы 1, 2, 4 и 8, а в Казахстане обнаружены расы 1, 3, 4, 6 и 8. На территории Северного Кавказа России доминировали расы 1 и 2, в Казахстане – расы 1 и 8 (Кохметова и др., 2016). Е.И. Гультяева с соавт. (2018) обнаружили высокое генетическое сходство омской популяции с североказахстанской и челябинской, что говорит о единой эпидемиологической зоне и возможности генного потока между изученными популяциями. Это следует учитывать при размещении в данных регионах генетически устойчивых сортов пшеницы.

Молекулярные исследования генов, контролирующих реакцию на хозяин-специфичные токсины *P. tritici-repentis*, позволили разработать молекулярные диагностики отдельных токсинов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Михайлова и др., 2012). Первые праймеры для генов устойчивости к токсинам ToxB и toxB предложены в статье (Martinez et al., 2004). В 2007 г. была разработана множественная (мультиплексная) ПЦР, позволяющая одновременно выявлять аллели генов *ToxA*, *ToxB* и *toxB* при наличии внутреннего контроля – гена «домашнего хозяйства» *CHS-1*, контролирующего хитинсинтетазу (Andrie et al., 2007). Исследование по позиционному клонированию *Tsn1* с использованием маркирующей популяции тетраплоидной пшеницы привело к созданию SSR-маркеров *Xfcp1* и *Xfcp2*, расположенных в интервале 0.8 cM от гена *Tsn1* (Lu, Faris, 2006; цит. по: Михайлова и др., 2012). В последующем были получены другие SSR-маркеры: *Xfcp620* и *Xfcp394*, локализованные в интервале 0.07 cM от гена *Tsn1*, а также *Xfcp623*, локализованный в длинном плече хромосомы 5B в интроне 5, в позиции 4901…5280 локуса *Tsn1*, тесно сцепленный с геном устойчивости к болезни (Zhang et al., 2009; Faris et al., 2010). Для идентификации носителей гена устойчивости к токсину Ptr ToxB (ген *Tsc2*) использовался STS-маркер *XBE444541*, локализованный в коротком плече хромосомы 2B, который сцеплен с геном устойчивости к пиренофорозу пшеницы на расстоянии 0.6 cM (Abeysekara et al., 2010). Наличие эффективных молекулярных маркеров, тесно сцепленных с генами устойчивости к токсинам, позволяет проводить молекулярный скрининг селекционного материала пшеницы.

Целью исследования была идентификация генотипов-носителей устойчивости к *P. tritici-repentis* с использованием рас и токсинов Ptr ToxA и Ptr ToxB, а также молекулярных маркеров, сцепленных с генами *Tsn1* и *Tsc2*, контролирующими чувствительность к токсинам гриба.

Материалы и методы

Исследования проводили на коллекции из 41 образца мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, включающей перспективные линии и сорта казахстанской и зарубежной селекции, в том числе 17 казахстанских, 4 российских, 17 образцов из CIMMYT и ICARDA, 1 сорт из Египета и 2 линии из Канады (см. таблицу). Сорт Salamouni использован в качестве невосприимчивого контроля для рас 1 и 5 пиренофороза и токсинов Ptr ToxA и Ptr ToxB; сорт Glenlea – в качестве восприимчивого контроля для расы 1 и токсина Ptr ToxA (Faris et al., 2010); линия 6B662 – в качестве восприимчивого контроля для расы 5 и токсина Ptr ToxB (Singh et al., 2010).

Изоляты рас Ptr 1 и 5 были предоставлены Dr. S. Ali (Университет Южной Дакоты, США) и использовались для оценки устойчивости коллекции образцов пшеницы к *P. tritici-repentis*. Размножение культуры гриба *P. tritici-repentis* выполняли по методике Л.А. Михайловой и др. (2012). Токсин Ptr ToxA индуцирует образование некрозов у растений сорта пшеницы Glenlea, а токсины Ptr ToxB и Ptr ToxC индуцируют образование хлорозов у растений линии 6B662.

Изучение устойчивости образцов пшеницы к *P. tritici-repentis* проводили в теплице при температуре 21 °C с 16-часовым фотопериодом. Растения пшеницы выращивали до фазы двух листьев в 25 мл пластиковых вазонах, заполненных песком, на гидропонике с применением питательного раствора Кнопа. Листья растений, взятых в качестве контроля, вместо токсинов инфильтровали 25 мкл стерильной дистиллированной воды (Чесноков и др., 1960). В каждый вазон помещали по пять растений каждого сорта. Опыт проводили в трехкратной повторности. Растения заражали определенной расой возбудителя болезни (водно-конидиальной суспензией спор) путем опрыскивания из пульверизатора. Концентрация спор в суспензии составляла 3 000–5 000 спор/мл. Влажный период в течение 18 ч поддерживали с помощью полиэтиленовых изоляторов. Учет степени развития заболевания проводили на 7–8-е сутки по шкале Lamari, Bernier (1989), согласно которой сорта с проявлением некротической реакции 1–2 балла относили к устойчивым (R) образцам, а с типом реакции некроза 3–5 баллов – к восприимчивым (S). На линии 6B662 оценивали наличие или отсутствие хлороза по той же шкале.

Инфильтрацию токсинами проводили на проростках пшеницы на стадии двух листочков (Lamari et al., 2003; Xu et al., 2004). Условия выращивания растений описаны выше. Второй лист (три растения из каждого образца) подвергали инфильтрации 25 мкл очищенных токсинов Ptr ToxA и Ptr ToxB (предоставлены Dr. S. Ali, Университет Южной Дакоты, США) с использованием шприца на 1 мл. Четыре листа каждого сорта/линии обрабатывали дважды культуральным фильтратом каждого из тестируемых токсинов. Затем инфильтрированные растения помещали в ростовую камеру при температуре 21 °C с 16-часовым фотопериодом. Растения оценивали через 4 дня после инфильтрации. Листья растений, взятых в качестве контроля, вместо токсинов инфильтровали 25 мкл стерильной дистиллированной воды. По присутствию/отсутствию симптомов некроза для ToxA или хлороза для ToxB на инфильтрованной стороне листа оценивали образцы как чувствительные или нечувствительные к HST.

Выделение геномной ДНК из растительного материала осуществляли из листьев 5-дневных проростков пше-

The allelic states of the *Tsn1* and *Tsc2* genes in wheat accessions and their responses to infection with *P. tritici-repentis*

Accession	Origin	Allelic state of molecular markers		Response to isolates of Ptr races and HST toxins			
		Xfcp623, *Tsn1*	*XBE444541*, *Tsc2*	Race 1	ToxA	Race 5	ToxB
Alikhan	Kazakhstan	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
Astana	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Dostyk	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	2	I
Derbes	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Kazakhstanskaya 25	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Kazakhstanskaya rannespelaya	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
Keremet	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Kokbiday	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Konditerskaya	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
Lazzat	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Lutescens 90	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
428g/MK-122A	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Albidum 31	Russia	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Omskaya 28	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Omskaya 35	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Omskaya 36	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Chum/8/jup/bjy	CIMMYT	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
SOMO/SORO/ACTS5	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
DOMOJNJA	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	2	I
CORYDON	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	2	I
BR14/CEP847-1	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
BR14/CEP847-2	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
BR17/CNT8//BR17/PF80 1004	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
F3.71/TRM/VORONA/3/OC14	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
NANJTNG82149 KAUZ	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
ECHA/LI115	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
TRAP#1/BOW	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	2	I
CROC 1AE	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
EFED/LE2150	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
Bunyodkor	CIMMYT-ICARDA-IWWIP	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Aray	Kazakhstan	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	3	I
Koksu	»	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	2	S
Ramin	»	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	3	S
428/Umanka-17	»	*Tsn1*	*Tsc2*	3	S	4	S
428/Umanka-18	»	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	4	S
KR11-20	CIMMYT-ICARDA-WWIP	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	2	S
ZM23524	CIMMYT	*Tsn1*	*Tsc2*	3	S	1	S

End of the table

Accession	Origin	Allelic state of molecular markers		Response to isolates of Ptr races and HST toxins			
		Xfcp623, *Tsn1*	*XBE444541*, *Tsc2*	Race 1	ToxA	Race 5	ToxB
JAS58/JAS55//ALD/3/MRNG/4/ALD	CIMMYT	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	3	S
Salamouni	Египет	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Glenlea	Канада	*Tsn1*	No data	5	S	No data	No data
6B662	»	No data	*Tsc2*	No data	No data	4	S

Notes: *Xfcp623* is the SSR marker to the *Tsn1* locus sensitive to Ptr ToxA, amplifies a 380 bp DNA fragment; *XBE444541*, the STS marker to the *Tsc2* locus, amplifies a 340 bp DNA fragment in wheat samples sensitive to ToxB and 505 bp in insensitive; Salamouni, the insensitive control for races 1 and 5, toxins Ptr ToxA, and Ptr ToxB, carrier of the recessive genes *tsn1* and *tsc2*; Glenlea, the susceptible control for race 1 and Ptr ToxA, carrier of the dominant *Tsn1* gene; 6B662, susceptible control for race 5 and Ptr ToxB, carrier of the dominant *Tsc2* gene. Numerals 1–5 are lesion scores based on the Lamari and Bernier (1989) scale; 1–2 indicates resistance, and 3–5, susceptibility. The reaction to HST toxin infiltration: I, insensitivity; S, susceptibility.

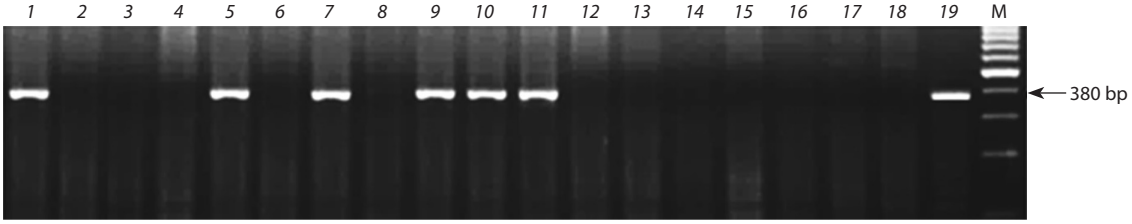
ницы с помощью CTAB-метода (Riede, Anderson, 1996). Качество выделенных проб ДНК проверяли в 1 % агарозном геле. Вторичный контроль на чистоту и качество выполняли на спектрофотометре SmartSpecTMPlus (Bio-RAD). После количественной оценки концентрация ДНК была нормализована до 30 нг/мкл для последующей ПЦР. Количество ДНК соответствовало протоколу ПЦР для идентификации соответствующего гена устойчивости. Для идентификации носителей генов устойчивости использовали метод ПЦР с праймерами, фланкирующими диагностические маркеры генов, и пробами ДНК коллекции из 41 образца мягкой пшеницы. Генотипы с аллелем гена *Tsn1*, чувствительного к токсину Ptr ToxA, выявляли с помощью SSR-маркера *Xfcp623* (Zhang et al., 2009), носители аллеля гена *Tsc2*, чувствительного к токсину Ptr ToxB, – с использованием STS-маркера *XBE444541* (Abeysekara et al., 2010). Маркер имеет два аллеля: 380 п. н. (доминантный аллель гена *Tsn1*, сцепленный с чувствительностью) и нуль-аллель (рецессивный аллель гена *tsn1*, сцепленный с устойчивостью к токсину Ptr ToxA) (Zhang et al., 2009). Сиквенс праймеров маркера *Xfcp623* (5′–3′): F – CTATTCGTAATCGTGCCTTCCG; R – CCTTCTCTCTCACCGCTATCTCATC (Faris et al., 2010). *XBE444541* – STS-маркер к локусу *Tsc2*, чувствительному к Ptr ToxB. Маркер имеет два аллеля: 340 п. н. (доминантный аллель гена *Tsc2*, сцепленный с чувствительностью к токсину Ptr ToxA) и 505 п. н. (рецессивный аллель гена *tsc2*, сцепленный с устойчивостью к токсину Ptr ToxB). Сиквенс праймеров маркера *XBE444541* (5′–3′): F – TGGACCAGTATGAGA; R – TTCTGGAGGATGTTGAGCAC (Abeysekara et al., 2010).

Объем реакционной смеси для ПЦР с маркерами *Xfcp623* и *XBE444541* составлял 25 мкл и содержал 2.5 мкл геномной ДНК (30 нг), 1 мкл каждого праймера (1 pM/мкл) (Sigma-Aldrich), 2.5 мкл смеси dNTP (2.5 мМ, водный раствор dCTP, dGTP, dTTP и dATP) (ЗАО «Силекс», Россия), 2.5 мкл $MgCl_2$ (25 мМ), 0.2 мкл Taq-полимеразы (5U, 5 ед/мкл) (ЗАО «Силекс», Россия), 2.5 мкл 10X ПЦР-буфера, 12.8 мкл ddH_2O. ПЦР-амплификацию с маркерами проводили на амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Режим ПЦР-амплификации с *Xfcp623*: начальная денатурация при 94 °C в течение 3 мин; 45 циклов: 94 °C в течение 1 мин, отжиг при 60 °C в течение 1 мин, 72 °C в течение 2 мин; финальная элонгация при 72 °C в течение 10 мин. ПЦР с маркером *XBE444541* выполняли при следующем режиме: начальная денатурация при 94 °C в течение 5 мин; 45 циклов: 94 °C в течение 30 с, отжиг при 58 °C в течение 30 с, 72 °C в течение 2 мин; финальная элонгация при 72 °C в течение 7 мин. Для разделения амплифицированных фрагментов проводили электрофорез в 2 % агарозном геле в TBE-буфере (45 мМ трис-борат, 1 мМ EDTA, pH 8) (Chen et al., 1998) с добавлением этидиум бромида и в присутствии маркера размеров фрагментов Gene-RulerTM, 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Визуализацию гелей осуществляли в гельдокументирующей системе Mega Bio-Print 1100/26M (Vilber Lourmat).

Результаты

Поиск генотипов-носителей аллелей генов устойчивости к пиренофорозу *P. tritici-repentis* был осуществлен в результате молекулярного анализа и скрининга коллекции образцов пшеницы, основанного на реакции к изолятам расы 1 и расы 5 гриба и к хозяин-специфичным токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB. Реакции генотипов пшеницы на изоляты рас и токсины Ptr ToxA и Ptr ToxB представлены в таблице.

В целом частота устойчивых к расе 1 и расе 5 образцов в коллекции пшеницы была достаточно высокой и составила 79 %. Наибольший интерес представляют восемь образцов пшеницы: Kokbiday, 428g/MK-122A, Lutescens 90, Lazzat, Omskaya 28, Omskaya 36, SOMO/SORA/ACTS5, BR14/CEP847-1 и BR14/CEP847-2, которые показали высокую устойчивость (1 балл) как к двум расам (1 и 5), так и к двум токсинам (Ptr ToxA и Ptr ToxB), а также подтвердили невосприимчивость HST к токсинам при молекулярном скрининге (см. таблицу). Умеренная степень устойчивости к расам и токсинам *P. tritici-repentis* отмечена у 21 образца пшеницы. Наиболее устойчивые к пиренофорозу образцы представлены в линиях из CIMMYT (36.8 % образцов) и Казахстана (31.6 %). Восприимчивость практически ко всем изученным расам и токсинам обнаружена у восьми образцов пшеницы, включая пять казахстанских образцов и три зарубежные линии. Изоляты расы 5 не всегда вызывали хлороз у генотипов пшеницы, для которых выявлено наличие аллеля гена *Tsc2*, чувствительного к токсину



DNA amplification products of wheat accessions with primers to the diagnostic marker *Xfcp623* linked to the *Tsn1* gene, controlling sensitivity to Ptr ToxA. Resolved in 2 % agarose gel.

1, 428/Umanka-17; *2*, 428g/MK-122A; *3*, Kokbiday; *4*, Lazzat; *5*, 428/Umanka-18; *6*, Omskaya 28; *7*, KR11-20; *8*, Omskaya 36; *9*, JAS58/JAS55//ALD/3/MRNG/4/ALD; *10*, Koksu; *11*, ZM23524; *12*, SOMO/SORO/ACTS5; *13*, BR14/CEP847; *14*, Astana; *15*, Kazakhstanskaya 25; *16*, Kazakhstanskaya Rannespelaya; *17*, Keremet; *18*, Salamouni; *19*, Glenlea; M, molecular weight marker (Gene-RulerTM; 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Lithuania)).

Ptr ToxB. Так, устойчивая реакция к расе 5 обнаружена у линий ZM23524 и KR11-20. У этих генотипов отмечена устойчивая реакция на изолят расы 5 при наличии аллеля гена чувствительности *Tsc2*, обнаруженного в результате ПЦР, и реакция хлороза на токсин Ptr ToxB. При инфильтрации растений сорта пшеницы Aray токсином Ptr ToxB и заражении изолятом расы 5 наблюдали нечувствительность к токсину и восприимчивость к изоляту гриба.

Генотипирование образцов пшеницы с использованием молекулярных маркеров было направлено на идентификацию носителей генов, контролирующих чувствительность и устойчивость к токсинам HST Ptr ToxA и Ptr ToxB. Маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент 380 п. н., ассоциированный с геном *Tsn1*, чувствительным к токсину Ptr ToxA у восьми образцов пшеницы и контроля Glenlea, носителя гена *Tsn1* (см. таблицу, рисунок). Выделенные восемь образцов пшеницы были чувствительны к расе 1 и токсину Ptr ToxA. Нуль-аллель маркера *Xfcp623* оказался сцепленным с нечувствительностью к токсину в 30 образцах пшеницы и в контроле Salamouni. Степень сцепления маркера *Xfcp623* с фенотипированием по устойчивости к расе 1 и Ptr ToxA составила 100 %. По результатам скрининга образцов пшеницы, основанного на реакции к изоляту расы 1 и инфильтрату HST Ptr ToxA, все 30 образцов проявили нечувствительность к расе 1 и токсину Ptr ToxA. На рисунке представлен пример электрофореграммы с данными ПЦР, отражающей наличие/отсутствие в исследуемых образцах локуса *Tsn1*, чувствительного к Ptr ToxA.

Маркер *XBE444541* амплифицировал фрагмент 340 п. н., сцепленный с аллелем гена *Tsc2*, контролирующим чувствительность к токсину в восьми образцах пшеницы и в контроле 6B662 (см. таблицу). Пять из этих восьми образцов были чувствительны к расе 5; семь из восьми образцов показали также чувствительность к токсину Ptr ToxB. В случаях амплификации фрагмента длиной 505 п. н., маркер *XBE444541* указывал на сцепление с нечувствительностью (устойчивостью) к токсину у 30 образцов пшеницы и в контроле Salamouni. Все отмеченные образцы проявили нечувствительность к расе 5 и токсину Ptr ToxB при скрининге генотипов с помощью изолята расы 5 и инфильтрата HST Ptr ToxB. Степень сцепления маркера *XBE444541* с нечувствительностью к расе 5 составила 92 %, а к Ptr ToxB – 97 %.

Частота встречаемости аллеля маркера *Xfcp623*, сцепленного с геном *tsn1*, а также аллеля маркера *XBE444541*, сцепленного с геном *tsc2*, контролирующих нечувствительность к токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB соответственно, составила в обоих случаях 79 % (30 образцов). Встречаемость аллелей маркеров, сцепленных с доминантными аллелями генов *Tsn1* и *Tsc2*, контролирующих чувствительностью к Ptr токсинам, составила 21 % (8 образцов).

SSR-маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент размером 380 п. н., сцепленный с доминантным аллелем *Tsn1* и определяющий чувствительность к Ptr ToxA у шести образцов: 428/Umanka-17, 428/Umanka-18, KR11-20, JAS58/JAS55//ALD/3/MRNG/4/ALD, Koksu, ZM23524 и у контроля Glenlea. Другой аллель, обнаруженный с помощью маркера *Xfcp623* у остальных образцов пшеницы, представлял собой нуль-аллель, характерный для нечувствительных к ToxA генотипов и указывающий на рецессивное состояние аллеля *tsn1*.

Обсуждение

Несмотря на то что пиренофороз – чрезвычайно важное заболевание пшеницы, в научной литературе по-прежнему недостаточно информации об устойчивости к болезни и преобладающим расам *P. tritici-repentis* среди сортов пшеницы, возделываемых в Казахстане. Предложенное исследование является одним из первых в этом регионе и включает комплексный скрининг с использованием рас и очищенных токсинов, а также молекулярный анализ на присутствие известных генов, контролирующих устойчивость к болезни. В последнее время проведены исследования, направленные на оценку устойчивости гермоплазмы пшеницы к пиренофорозу (Chu et al., 2008; Singh et al., 2010, 2016; Kokhmetova et al., 2017; Dinglasan et al., 2018). Известно, что *Tsn1* и *Tsc2* вместе с другими генами играют большую роль в патогенезе; выявлены аддитивные эффекты, которые показали эффективность аккумуляции аллелей генов устойчивости для селекции на устойчивость к пиренофорозу (Kollers et al., 2014). Некротрофные эффекторы (NE) *P. tritici-repentis* ToxA и ToxB вызывают развитие пятнистости листьев при распознавании доминантными аллелями генов *Tsn1* и *Tsc2* (Virdi et al., 2016). В ряде работ показаны статистически значимые взаимосвязи между чувствительностью к NE

и восприимчивостью к *P. tritici-repentis* (Lamari, Bernier, 1989; Friesen, Faris, 2004; Abeysekara et al., 2010). В нашем исследовании NE *P. tritici-repentis* ToxA и ToxB использованы как факторы вирулентности для скрининга гермоплазмы пшеницы с NE-содержащими культурами, чтобы предсказывать их реакцию на пиренофороз.

Настоящее исследование обусловлено необходимостью расширения генетического полиморфизма с привлечением разнородных источников устойчивости, которые могут применяться в селекции устойчивых к *P. tritici-repentis* сортов пшеницы. Эту задачу удалось решить на основе использования ПЦР, изолятов рас и токсинов Ptr ToxA и Ptr ToxB. С помощью молекулярных маркеров *Xfcp623* и *XBE4444541*, диагностических для генов *Tsn1* и *Tsc2*, связанных с чувствительностью к Ptr ToxA и Ptr ToxB, была охарактеризована коллекция из 41 образца мягкой пшеницы. Результаты генотипирования гермоплазмы пшеницы с использованием молекулярного маркера *XBE444541* соответствовали фенотипическим реакциям к расе 5 со степенью сцепления 92.11 %, а к Ptr ToxB – со степенью сцепления 97.37 %. Результаты генотипирования с использованием молекулярного маркера *Xfcp623* соответствовали фенотипическим реакциям нечувствительности или чувствительности к токсину ToxA со 100 % степенью сцепления. Это позволяет сделать заключение об адекватности и надежности диагностического маркера *Xfcp623* для идентификации носителей устойчивости к токсину ToxA пиренофороза. Эффективность маркера *Xfcp623* обусловлена его локализацией внутри гена *Tsn1*, в интроне 5 этого локуса, в позиции 4901…5280 (Faris et al., 2010). В базе данных Komugi (Wheat Genetic Resources DataBase) ген *Tsn1*, зарегистрированный как ген чувствительности к HST ToxA, характеризуется наличием 8 экзонов и S/TPK-NBS-LRR структурой. Указывается, что для функционирования гена *Tsn1* необходимы все три домена, при этом белок TSN1 не взаимодействует напрямую с ToxA.

Изучение реакции гермоплазмы пшеницы на инокуляцию и инфильтрацию позволило выявить более 78 % образцов, устойчивых одновременно как к расам 1 и 5, так и к токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB. Полученные данные совпадают с более ранними результатами изучения коллекции пшеницы, где нечувствительная реакция к Ptr ToxA наблюдалась у большинства (64.5 %) изученных генотипов пшеницы (Kokhmetova et al., 2017). С практической точки зрения, наибольший интерес представляют восемь образцов пшеницы, продемонстрировших самую высокую устойчивость одновременно к двум расам (1 и 5) и двум токсинам (Ptr ToxA и Ptr ToxB), а также подтвердивших невосприимчивость к HST при молекулярном скрининге. Однако изолят расы 5 не всегда вызывал хлороз у генотипов пшеницы, для которых предполагалось наличие доминантного аллеля гена *Tsc2*, чувствительного к токсину Ptr ToxB. Так, устойчивая реакция к расе 5 вместо ожидаемой восприимчивой обнаружена у линий пшеницы ZM23524 и KR11-20. При инфильтрации токсином Ptr ToxB у сорта пшеницы Aray также вместо ожидаемой восприимчивой реакции наблюдалась нечувствительность к Ptr ToxB. Это согласуется с результатами ряда исследований, посвященных взаимодействию *Tsn1*–Ptr ToxA, где показано, что чувствительность к NE не всегда определяет чувствительность к *P. tritici-repentis*, а влияние взаимодействия *Tsn1*–Ptr ToxA в развитии болезни зависит от генетического фона хозяина, т. е. от конкретного генотипа пшеницы (Chu et al., 2008; Faris et al., 2012; Kariyawasam et al., 2016). В статье (Мироненко, Коваленко, 2018) на примере взаимодействия аллелей гена *Tsn1* и гена-эффектора *P. tritici-repentis* ToxA в конкретных парах генетически охарактеризованных образцов пшеницы и изолятов патогена показано, что один и тот же признак «образование некроза на листьях» в сочетаниях различных генотипов сорт–изолят имеет разную генетическую природу. Эффекты взаимодействия *Tsn1*–ToxA на пиренофороз у мягкой пшеницы могут варьировать от незначительных до очень значительных в зависимости от генетического фона хозяина (Virdi et al., 2016). Авторы последней работы предположили, что некоторые генотипы пшеницы обладают факторами, которые приводят к изменению уровней экспрессии гена ToxA через эпистаз или каким-то образом ингибируют распознавание токсина ToxA геном *Tsn1* в растениях, зараженных спорами гриба.

Для успешной селекции на иммунитет большое значение имеет международное сотрудничество с CIMMYT. Согласно нашим исследованиям, сорта, устойчивые к пиренофорозу, следует создавать с использованием разнообразных источников гермоплазмы. В качестве доноров устойчивости необходимо привлекать к гибридизации образцы из коллекции CIMMYT, России и Казахстана. Полученные нами результаты создают возможность для перехода селекционного процесса в Казахстане на новый научный уровень за счет комплексного применения молекулярно-генетических и фитопатологических методов. Данные генотипирования и скрининга с использованием некротрофных эффекторов представляют интерес для повышения эффективности селекции на основе элиминации из селекционного материала носителей доминантных аллелей генов *Tsn1* и *Tsc2*, чувствительных к агрессивным токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB. Носители идентифицированных рецессивных аллелей *tsn1* и *tsc2* генов устойчивости к токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB *P. tritici-repentis* необходимо использовать в селекционных программах по повышению устойчивости к пиренофорозу пшеницы.

Acknowledgements

This study was supported by the Kazakhstan Ministry of Education and Science, project AP05132540.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Гультяева Е.И., Коваленко Н.М., Шаманин В.П., Тюнин В.А., Шрейдер Е.Р., Шайдаюк Е.Л., Моргунов А.И. Структура популяций листовых патогенов яровой пшеницы в западноазиатских регионах России и Северном Казахстане в 2017 г. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(3):363-369. DOI 10.18699/VJ18.372.

[Gultyaeva E.I., Kovalenko N.M., Shamanin V.P., Tyunin V.A., Shreyder E.R., Shaydayuk E.L., Morgunov A.I. Population structure of leaf pathogens of common spring wheat in the West Asian regions

of Russia and Northern Kazakhstan in 2017. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(3):363-369. DOI 10.18699/VJ18.372. (in Russian)]

Койшибаев М.К. Болезни растений. Алматы, 2002.
[Koyshibaev M.K. Diseases of Plants. Almaty, 2002. (in Russian)]

Кохметова А.М., Кремнева О.Ю., Кейшилов Ж.С., Султанова Н.Ж. Расовый состав и вирулентность изолятов *Pyrenophora tritici-repentis* в Республике Казахстан и Северо-Кавказском регионе России. Eurasian J. Appl. Biotechnol. 2016;3:57-66.
[Kokhmetova A.M., Kremneva O.Yu., Keyshilov Zh.S., Sultanova N.Zh. Race range and virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates in the Republic of Kazakhstan and the North Caucasus region of Russia. Eurasian J. Appl. Biotechnol. 2016;3:57-66. (in Russian)]

Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Особенности взаимодействия генов *Tsn1* и *ToxA* в патосистеме *Triticum aestivum – Pyrenophora tritici-repentis.* Вестн. защиты растений. 2018;2(96):12-16.
[Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Interaction of the *Tsn1* and *ToxA* genes in the *Triticum aestivum – Pyrenophora tritici-repentis* pathosystem. Vestnik Zaschity Rasteniy = Plant Protection News. 2018; 2(96):12-16. (in Russian)]

Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Желтая пятнистость пшеницы. Методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов. СПб., 2012.
[Mihaylova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Tan Spot of Wheat. Guidelines for the study of populations of the tan spot causative agent *Pyrenophora tritici-repentis* and resistance of varieties. St. Petersburg, 2012. (in Russian)]

Поспехов Г.В. Особенности роста и плодоношения гриба *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. в культуре. Микология и фитопатология.
[Pospekhov G.V. Features of the growth and fruiting of the cultured fungus *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. Mikologia i Fitopatologia = Mycology and Phytopathology.1989;23(2):117-121. (in Russian)]

Султанова Н.Ж. Биологические особенности возбудителя желтой пятнистости листьев озимой пшеницы на юго-востоке Казахстана. Вестн. с.-х. науки Казахстана.
[Sultanova N.Zh. Biological features of the causative agent of tan spot of winter wheat leaves in southeastern Kazakhstan. Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki Kazakhstana = Bulletin of Agricultural Sciences of Kazakhstan. 2007;3:4-6. (in Russian)]

Чесноков В.А., Базырина Е.Н., Бушуева Т.М., Ильинская Н.Л. Выращивание растений без почвы. Л., 1960.
[Chesnokov V.A., Bazyrina E.N., Bushueva T.M., Il'inskaja N.L. Growing of Plants without Soil. Leningrad, 1960. (in Russian)]

Abeysekara N.S., Friesen T.L., Liu Z., McClean P.E., Faris J.D. Marker development and saturation mapping of the tan spot Ptr ToxB sensitivity locus *Tsc2* in hexaploid wheat. Plant Genome. 2010;3:179-189. DOI 10.3835/plantgenome2010.07.0017.

Ali S., Gurung S., Adhikar T.B. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas. Plant Dis. 2010;94:229-235. DOI 10.1094/pdis-94-2-0229.

Anderson J.A., Effertz R.J., Faris J.D., Francl L.J., Meinhardt S.W., Gill B.S. Genetic analysis of sensitivity to a *Pyrenophora tritici-repentis* necrosis-inducing toxin in durum and common wheat. Phytopathology. 1999;89:293-297.

Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti I.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. Phytopathology. 2007;97:694-701.

Ballance G.M., Lamari L., Bernier C.C. Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1989;35:203-213.

Chen X., Line R., Leung H. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis. Theor. Appl. Genet. 1998;97:345-355.

Chu C.G., Friesen T.L., Faris J.D., Xu S.S. Evaluation of seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in tetraploid wheat. Crop Sci. 2008;48:1107-1116. DOI 10.2135/cropsci2007.09.0516.

Cook R.J., Yarham D.J. Occurrence of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* on wheat in England and Wales in 1987. Plant Pathol. 1989;38(1):101-102. DOI 10.1111/j.1365-3059.1989.tb01434.x.

Dinglasan E.G., Godwin I.D., Phan H.T.T., Tan K.-C., Platz G.J., Hickey L.T. Vavilov wheat accessions provide useful sources of resistance to tan spot (syn. yellow spot) of wheat. Plant Pathol. 2018; 67(5):1076-1087. DOI 10.1111/ppa.12822.

Dumitras L., Bontea V. Data noi privinol parasitul foliar al griulu *Helminthosporium repentis* Diedicke. Studii si Cercetari de Biologie Vegetala. 1981;33:169-172.

Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu S., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107:13544-13549. DOI 10.1073/pnas.1004090107.

Faris J.D., Zhang Z., Rasmussen J.B., Friesen T.L. Tan spot susceptibility governed by the *Tsn1* locus and race nonspecific resistance quantitative trait loci in a population derived from the wheat lines Salamouni and Katepwa. Mol. Breed. 2012;30:1669-1678. DOI 10.1007/s11032-012-9750-7.

Friesen T.L., Faris J.D. Molecular mapping of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 and sensitivity to Ptr ToxB in wheat. Theor. Appl. Genet. 2004;109:464-471. DOI 10.1007/s00122-004-1678-9.

Kariyawasam G.K., Carter A.H., Rasmussen J.B., Faris J.D., Xu S.S., Mergoum M., Liu Z. Genetic relationships between race-nonspecific and race specific interactions in the wheat-*Pyrenophora tritici-repentis* pathosystem. Theor. Appl. Genet. 2016;129:897-908. DOI 10.1007/s00122-016-2670-x.

Kokhmetova A., Kremneva O., Volkova G., Atishova M., Sapakhova Z. Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot. J. Plant Pathol. 2017;99(1):161-167. DOI 10.4454/jpp.v99i1.3812.

Kollers S., Rodemann B., Ling J., Korzun V., Ebmeyer E., Argillier O., Hinze M., Plieske J., Kulosa D., Gana M.W., Roder M.S. Genome-wide association mapping of tan spot resistance (*Pyrenophora tritici-repentis*) in European winter wheat. Mol. Breed. 2014;34(2):363-371. DOI 10.1007/s11032-014-0039-x.

Lamari L., Bernier C.C. Evalution of wheat lines and cultivars to tan spot [*Perynophora tritici-repentis*] based on lesion type. Can. J. Plant Sci. 1989;11(1):49-56.

Lamari L., Bernier C.C. Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. Phytopathology. 1991;81:1092-1095.

Lamari L., Strelkov S.E., Yahyaoui A., Amedov M., Saidov M., Djunusova M., Koichibayev M. Virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the countries of the Silk Road. Can. J. Plant Pathol. 2005; 27:383-388. DOI 10.1080/07060661.2012.695750.

Lamari L., Strelkov S.E., Yahyaoui A., Orabi J., Smith R.B. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. Phytopathology. 2003;93(4):391-396. DOI 10.1094/phyto.2003.93.4.391.

Lu H.J., Faris J.D. Macro- and microcolinearity between the genomic region of wheat chromosome 5B containing the *Tsn1* gene and the rice genome. Funct. Integr. Genomics. 2006;6(2):90-103. DOI 10.1007/s10142-005-0020-1.

Maraite H., Berny J.F., Goffi A. Epidemiology of tan spot in Belgium. Proc. of the 2nd Int. Tan Spot Workshop. Fargo, North Dakota State Univ., 1992;73-79.

Maraite H., Mercado-Vergnes D., Renard M.-E., Zhanarbekova A., Duveiller E. Relevance of pathogen diversity in management of leaf spot and leaf blight diseases on wheat in Central Asia. Agromeridian. 2006;2:105-114.

Martinez J.P., Oesch N.W., Ciuffetti L.M. Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, *ToxB*, in pathogenic and nonpathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. Mol. Plant Microbe Interact. 2004;17:467-474. DOI 10.1094/MPMI.2004.17. 5.467.

Martinez J.P., Ottum S.A., Ali S., Francl L.J., Ciuffetti L.M. Characterization of the *ToxB* gene from *Pyrenophora tritici-repentis*. Mol. Plant Microbe Interact. 2001;14:675-677. DOI 10.1094/mpmi.2001. 14.5.675.

Orolaza N.P., Lamari L., Ballance G.M. Evidence of a hostspecific chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot of wheat. Phytopathology. 1995;85:1282-1287.

Rees R.G., Platz G.J., Mayer R.J. Susceptibility of Australian wheats to *Pyrenophora tritici-repentis*. Aust. J. Agric. Res. 1988;39:141-151.

Riede C.R., Anderson J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. Crop Sci. 1996;36(4):905-909.

Šarová J., Hanzalová A., Bartoš P. Incidence of wheat leaf spot pathogens in the Czech Republic. Cereal Res. Commun. 2003;31:145-151.

Singh P.K., Crossa J., Duveiller E., Singh R.P., Djurle A. Association mapping for resistance to tan spot induced by *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 in CIMMYTs historical bread wheat set. Euphytica. 2016;207(3):515-525. DOI 10.1007/s10681-015-1528-7.

Singh P.K., Mergoum M., Ali S., Adhikari T.B., Elias E.M. Genetics of wheat – *Pyrenophora tritici-repentis* interactions. Euphytica. 2010; 171:1-13. DOI 10.1007/s10681-009-0074-6.

Strelkov S.E., Lamari L. Host-parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat. Can. J. Plant Pathol. 2003;25:339-349. DOI 10.1080/07060660309507089.

Tuori R.P., Wolpert T.J., Ciuffetti L.M. Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. Mol. Plant Microbe Interact. 1995;8:41-48.

Virdi S.K., Liu Z., Overlander M.E., Zhang Z., Xu S.S., Friesen T.L., Faris J.D. New insights into the roles of host gene-necrotrophic effector interactions in governing susceptibility of durum wheat to tan spot and *Septoria nodorum* Blotch. G3 (Bethesda). 2016;6(12):4139-4150. DOI 10.1534/G3.116.036525.

Xu S.S., Friesen T.L., Mujeeb-Kazi A. Seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in synthetic hexaploid wheats. Crop Sci. 2004;44:2238-2245.

Zhanarbekova A.B., Koishibayev M., Maraite H., Duveiller E., Mercado D.M., Sliamova N.D. The distribution of tan spot on wheat and race structure of *Drechslera tritici-repentis* in Kazakhstan and neighboring countries of CIS. Proc. Int. Sci. Conf. "Modern Problems of Plant Protection and Quarantine". Almaty, 2005;371-376.

Zhang Z., Friesen T.L., Simons K.J., Xu S.S., Faris J.D. Development, identification, and validation of markers for marker assisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2* in wheat. Mol. Breed. 2009;23:35-49. DOI 10.1007/s11032-008-9211-5.

ORCID ID

A.M. Kokhmetova orcid.org/0000-0002-0186-7832

Z. Sapakhova orcid.org/0000-0002-8007-5066

M. Atishova orcid.org/0000-0002-2270-571X

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):987-991
DOI 10.18699/VJ18.441

Ribonuclease activity as a new prospective disease resistance marker in potato

E.A. Trifonova ✉, S.M. Ibragimova, O.A. Volkova, V.K. Shumny, A.V. Kochetov

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

Disease resistance is an important characteristic for each variety of potato, and the search for pathogen resistance markers is one of the primary tasks of plant breeding. Higher plants possess a wide spectrum of enzymes catalyzing the hydrolysis of nucleic acids; it is believed that protection against pathogens is the most probable function of the enzymes. RNases are actively involved in several immune systems of higher plants, for example, systemic acquired resistance (SAR) and genetic silencing, hence RNase activity in plant leaves, as a relatively easily measured parameter, can serve as a good marker for the selection of pathogen resistant varieties. We have analyzed sixteen varieties of potatoes permitted for use on the territory of the Russian Federation and tested the correlation of the level of variety-specific ribonuclease (RNase) activity with such economically valuable traits as maturity and resistance to viruses, late blight and common scab. In general, the level of RNase activity was variety-specific, which was confirmed by very small values of average squared error for the majority of tested varieties. We have detected a statistically significant positive correlation of RNase activity in potato leaves with increased resistance of varieties to phytopathogenic viruses, a negative correlation with resistance to scab and an absence of a significant connection with maturity and resistance to late blight, regardless of the organ affected by the oomycete. Thus, the level of RNase activity in potato leaves can be used as a selective marker for resistance to viruses, while varieties with increased RNase activity should be avoided when selecting resistance to scab.

Key words: *Solanum tuberosum*; phytopathogenic viruses; late blight; common scab; RNase activity.

Рибонуклеазная активность как потенциальный новый маркер устойчивости к фитопатогенам у картофеля

Е.А. Трифонова ✉, С.М. Ибрагимова, О.А. Волкова, В.К. Шумный, А.В. Кочетов

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

Устойчивость к фитопатогенам является важной характеристикой для каждого сорта картофеля, а поиск маркеров устойчивости к патогенам – одна из приоритетных задач селекции растений. Высшие растения обладают широким спектром ферментов с нуклеазной активностью. Основной наиболее вероятной функцией этих ферментов считается защита растений от патогенов. РНКазы активно участвуют в иммунных системах растений, например таких, как системная приобретенная устойчивость и генетический сайленсинг, следовательно, РНКазная активность в листьях растений, как относительно легко измеряемый параметр, может служить хорошим маркером для отбора устойчивых к патогенам сортов. В настоящей работе проанализированы шестнадцать сортов картофеля, включенных в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на территории Российской Федерации. Проверена корреляция уровня рибонуклеазной (РНКазной) активности сортов с такими хозяйственно ценными признаками, как сроки созревания и устойчивость к вирусам, фитофторе и парше обыкновенной. В целом уровень РНКазной активности оказался сортоспецифичным параметром, что было подтверждено очень малыми значениями средней квадратичной ошибки для большинства тестируемых сортов. Выявлена статистически значимая позитивная корреляция РНКазной активности в листьях картофеля с повышенной устойчивостью сортов к фитопатогенным вирусам, негативная корреляция с устойчивостью к парше обыкновенной и отсутствие значимой связи с устойчивостью к фитофторозу вне зависимости от органа, поражаемого оомицетом. Таким образом, уровень РНКазной активности в листьях картофеля может быть использован как селективный маркер устойчивости к вирусам, в то время как при селекции устойчивости к парше сортов с повышенной РНКазной активностью следует избегать.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*; рибонуклеазная активность; фитопатогенные вирусы; фитофтороз; парша обыкновенная.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Trifonova E.A., Ibragimova S.M., Volkova O.A., Shumny V.K., Kochetov A.V. Ribonuclease activity as a new prospective disease resistance marker in potato. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):987-991. DOI 10.18699/VJ18.441

Received July 30, 2018
Revised October 4, 2018
Accepted October 12, 2018

✉ e-mail: trifonova.k@rambler.ru

Potatoes are the third most important crop and the first of non-cereals, annually more than 300 million tons of potatoes are produced in the world, and about 1 billion people consider potatoes to be the basis of their diet (Barrell et al., 2013). Currently, more than 3 000 varieties of potatoes are grown in 60 countries of the world with different resistance to pathogens and unfavorable climatic conditions, with different taste and maturity. Resistance to late blight, viral infections and other phytopathogens is an important characteristic for each variety of potato, and the search for pathogen resistance markers is one of the primary tasks of plant breeding and genetics. It is known that higher plants have a large spectrum of enzymes with nuclease activity, 16 ribonucleases (RNase) with a molecular weight from 9 to 41 kDa in *Arabidopsis thaliana* (Yen, Green, 1991), 15 RNase in wheat and 14 RNase in barley with molecular weights from 16.3 to 40.1 kDa (Yen, Baenziger, 1993). Several RNase were detected in wild potato *Solanum chacoense* (Qin et al., 2005) in connection with studies of the mechanisms of gametophytic self-incompatibility in Solanaceae, but a systematic study of RNase activity in potatoes has not yet been carried out.

Although the specific functions of each plant RNase are only clarified, it is believed that protection from pathogens is the most likely function of these enzymes in higher plants (Kao, McCubbin, 1996). It was reported that RNase activity was higher in diseased plants (Green, 1994; Lusso, Kuc, 1995; Galiana et al., 1997; Hugot et al., 2002). Wounding, senescence, and phosphate starvation also cause induction of RNase expression (Galiana et al., 1997; Lers et al., 1998; Kurata et al., 2002). The direct involvement of phosphate starvation-inducible RNase in the acquired resistance to *Phytophthora parasitica* was shown in *N. tabacum* (Galiana et al., 1997; Hugot et al., 2002). Previously, we have demonstrated that the transgenic plants with an increased level of RNase activity were more resistant to at least two different unrelated viruses (Trifonova et al., 2007b; Sugawara et al., 2016). For buckwheat varieties with different resistance to the buckwheat burn virus (BBV), a positive correlation between resistance to virus and RNase activity was shown, the authors have analyzed two varieties, Roksolana and Kara-Dag (Sindarovska et al., 2014).

In the present work, we have analyzed sixteen varieties of potatoes presented in the State Register of Selection Achievements Admitted to Use in the Russian Federation and tested the correlation of ribonuclease activity level of varieties with such economically valuable features as maturity and resistance to viruses, late blight and common scab.

Materials and methods

Plants material. Thirteen potato varieties were used from the *in vitro* collection of the Genetic engineering laboratory of the Instite of Cytology and Genetics of the SB RAS (Novosibirsk) and three potato varieties of the Siberian selection (Tuleevskiy, Kemerovchanin and Safo) from the *in vitro* variety collection of Bio Collection Center "GenAgro". The original plants free from viral and viroid infections were cultivated in sterile conditions *in vitro*, at a temperature of 20 ± 2 °C in the daytime and 18 ± 2 °C at night, with an illumination of 8.000 lux. To prepare the material, apical shoots measuring 2.5–3 cm in length were placed in test tubes 200 × 23 mm and cultured on Murashige and Skoog medium (Murashige, Skoog, 1962). To the main medium of Murashige and Skoog, 20 g/L of sucrose and 6 g/L of agar were added and cultivated for three to four weeks, until the plants were formed. The tubes were covered with cotton-gauze stoppers. For each variety, no less than 5 test plants were grown in each experiment. All procedures for the cultivation of the starting material were carried out according to generally accepted procedures (Pershina, 2005).

Ribonuclease assay. For one RNase activity measurement, leaves from the entire 4–6 weeks old potato plant grown *in vitro* under standard conditions were used. The level of RNase activity in crude leaf extracts of plants was evaluated by the change in the amount of acid-soluble matter in total yeast RNA (Trifonova et al., 2007b). Leaf tissue 1 g, was ground in liquid nitrogen, suspended in 1 ml of 50 mM Tris–HCl (pH 7.0) and centrifuged for 10 min (12.000 g, 4 °C). The total protein was assayed in the supernatant according to Bradford (Bradford, 1976). The extracts, containing 25 g of total protein, were added to the reaction mixture containing 0.4 % total yeast RNA, 0.1 % bovine serum albumin, and 0.1 M Tris–HCl (pH 7.0). The total volume of the reaction mixture was 300 µl. The reaction was stopped by adding 1 ml of 3.4 % $HClO_4$. The test tubes were cooled at 4 °C for 10 min and centrifuged at 12.000 g and 4 °C for 5 min. The optical densities of the supernatants were measured at 260 nm relative to the control (reaction mixture without leaf extract).

To assess the correlation of the level of RNase activity in varieties with economically valuable traits, we adopted the following notation: 1 – the cultivar is resistant to late blight or viruses (resistance index 6–9 at http://www.kartofel.org/cultivars/main_cult/sorta.htm) or the "+" sign in the World Catalogue of Potato Varieties (Hamester, Hils, 2004) for one or more viruses, 0 – the variety is susceptible (resistance index 1–5 or "–" in the above catalogue). We considered in our study only potato viruses with ssRNA genomes, such as PVX, PVY, PVM, and PVS. For the maturity period, we took the "1" for late and the medium maturity, and "0" for early. Parameters of varieties and RNase activity in leaf extracts are shown in Table 1. The evaluation of the direction and tightness of the relationship of the parameters was made using the Pearson's parametric correlation criterion.

Results and discussion

Potato varieties differ among themselves for a large number of characteristics, starting from the shape of the tuber and taste qualities and ending with resistance to phytopathogens. In our previous research of the expression of heterologous nucleases in transgenic plants, we noticed that different potato varieties have different intrinsic levels of RNase activity (Trifonova et al., 2004). In this study, we first assessed this level for 16 varieties listed in the Federal State Register of Breeding Achievements Admitted to Use in the Russian Federation (2017) and checked whether the level of RNase activity is related to some important agricultural characteristics such as maturity, potato resistance to viral diseases, late blight and common scab.

The results of RNase activity measurements in leaf extracts of different potato varieties are shown in Table 1. Note that, in general, this feature is variety-specific, which is confirmed by very small values of average squared error for the majority of tested varieties. The highest average squared error was

Table 1. RNase activity in leaves and agriculturally valuable parameters of potato varieties

ID	RNase activity	Maturity	Late blight tubers	Late blight leaves	Viruses	Common scab
Arkhideya N	0.318 ± 0.004	0	0	0	1	–
Beloyarskiy ranniy	0.459 ± 0.033	0	0	0	1	–
Vytok	0.291 ± 0.000	1	1	1	1	1
Golubizna	0.271 ± 0.002	1	0	0	1	1
Desiree	0.462 ± 0.005	1	0	0	1	0
Zhukovskiy ranniy N	0.210 ± 0.001	0	0	0	0	1
Ilinskiy	0.443 ± 0.000	0	0	0	1	1
Kemerovchanin	0.258 ± 0.004	0	0	0	0	1
Kolorit	0.472 ± 0.059	1	–	–	1	–
Lugowskoy	0.498 ± 0.014	1	1	1	1	1
Odissey	0.440 ± 0.009	0	1	0	1	0
Sante	0.401 ± 0.000	0	0	0	1	1
Safo	0.233 ± 0.021	0	0	0	0	–
Skoroplodniy	0.286 ± 0.000	0	0	0	0	–
Tuleevskiy	0.466 ± 0.069	0	0	0	1	0
Kapris	0.236 ± 0.007	0	0	0	0	–

Notes: RNase activity is presented as optical density at 260 nm.

Table 2. Interrelation of RNase activity with pathogen resistance in potato (Pearson correlation)

Pearson's correlation parameter	Maturity	Late blight tubers	Late blight leaves	Viruses	Common scab
r	0.1758	0.2923	0.1695	0.7590	–0.5388
p	0.531	0.290	0.546	0.001	0.106

recorded in the Tuleevskiy variety, which also proved to be the most variable in the number of shoots formed per explant, which, apparently, is due to the genetic characteristics of the variety (Ibragimova et al., 2018).

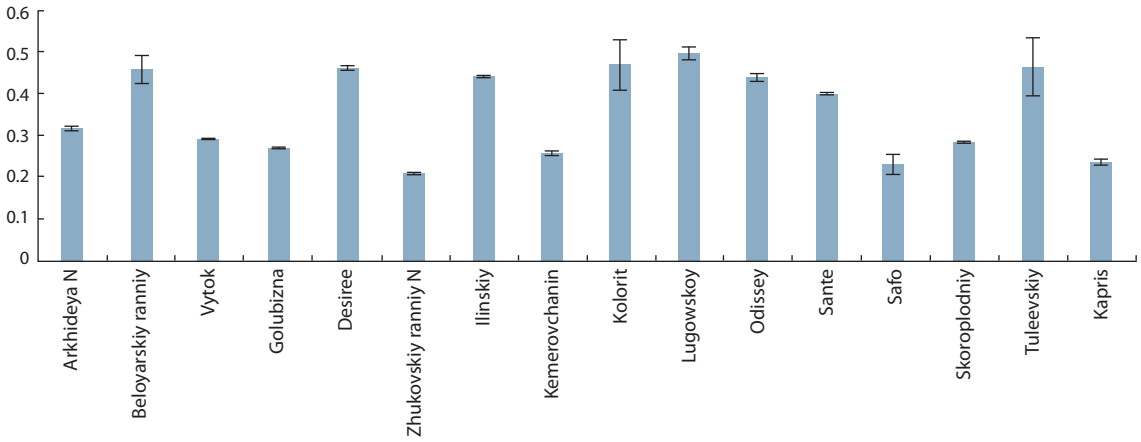
RNases are actively involved in several immune systems of higher plants, for example, systemic acquired resistance (SAR) and genetic silencing (Trifonova et al., 2007a), hence RNase activity in plant leaves, as a relatively easily measured parameter, can serve as a good marker for the selection of pathogen resistant varieties. Most of all, we were interested in the correlation of the level of RNase activity with resistance to the late blight of tubers and leaves, the general increased resistance to viruses and common scab. The results of the correlation analysis are presented in Table 2.

We found a statistically significant positive correlation of RNase activity in potato leaves with increased resistance of varieties to phytopathogenic viruses ($r = 0.7590$, $p = 0.001$).

It was hypothesized that RNase activity may play a protective role in plants (Green, 1994; Galiana et al., 1997; Trifonova et al., 2015), RNase activity increases in diseased plants (Green, 1994; Lusso, Kuc, 1995; Galiana et al., 1997; Hugot et al., 2002; Šindelářová et al., 2002), and injury causes an increase in this activity in tobacco (Kurata et al., 2002) and tomato (Lers et al., 1998). Among the 17 identified proteins associated with pathogenesis (PR proteins), some of the PR-4 and PR-10 proteins are nuclease (Van Loon et al., 2006).

Previously, we have demonstrated that elevated extracellular RNase activity in the transgenic tobacco modulates the resistance of these plants to phytopathogenic viruses, with an increase in resistance proportional to the level of RNase activity (Trifonova et al., 2015; Sugawara et al., 2016). The molecular mechanisms of RNase antiviral effects are still poorly understood. It may be hypothesized that higher level of nuclease activity provides for plant DNA fragmentation during the hypersensitive response or direct pathogen DNA/RNA degradation (Kim et al., 2011), while lower level of nuclease activity or binding without hydrolytic activity explores alternative mechanisms, such as binding DNA/RNA of pathogens and interfering their life cycles (Zhang et al., 2001). However, the level of resistance provided by the second method is lower, as we showed earlier (Trifonova et al., 2015) and most likely does not protect varieties with low RNase activity in the leaves from viruses in the field.

We did not find a statistically significant correlation of the RNase activity in leaves with resistance to late blight of tubers and leaves, as well as the maturity of various potato varieties. RNases involvement in resistance to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* was proved by Galiana et al. (1997) who demonstrated that induction of SAR with elicitin is accompanied by a rapid induction of RNase activity and by the increase in the activity of at least two different extracellular RNases. Moreover, exogenous application of RNase activity



RNase activity in leaves of potato varieties.

RNase activity is presented as optical density at 260 nm.

in the extracellular space of leaves led to a reduction of the fungus development by up to 90 %, independently of any elicitin treatment and in the absence of apparent necrosis. We assume that the lack of a link between the RNase activity level and the resistance to late blight in potato is due to the insufficiently high level of the activity in the analyzed varieties. This assumption is supported by the fact that Lugowskoy with the highest level of all the varieties studied is characterized by increased resistance to both viruses and late blight of tubers and leaves (Figure).

One of the unexpected results of our study was a statistically insignificant negative correlation of the level of RNase activity in leaves with resistance to common scab. The main causative agent of this disease is the soil bacterium *Streptomyces scabies*, which affects only tubers (Lerat et al., 2009), therefore, the level of RNase activity in leaves could not impact significantly the infection process. A negative correlation may also be due to the fact that plants with a higher RNase activity are less affected by other types of pathogens and *S. scabies* appears in more favorable competitive conditions. However, for a final conclusion on the effect of RNase activity on the resistance to common scab in potato, more data on resistant varieties is needed, since this type of resistance is very rarely reflected in potato catalogues, despite meaningful crop losses due to infection with the pathogen. Thus, of the 16 varieties studied by us, only 10 of them, we were able to find information on scab susceptibility.

Thus, the level of RNase activity in potato leaves can be used as a prospective selective marker for resistance to viruses, but a systematic study of pathogenesis-related RNase activities in potatoes is needed to find out the specific genes responsible for the function. To create late blight resistant varieties, in our opinion, a greater increase in RNase activity is required than classical methods of selection can provide, and perhaps the best results will be achieved through the methods of transgenesis or editing of the potato genome (Korotkova et al., 2017).

Acknowledgements

The work was supported by the Russian Science Foundation (grant 16-16-04073). The Center for Plant Cultivation was supported in the framework of the budget project (0324-2018-0018). The authors are grateful to Bio Collection Center "GenAgro" for providing plant material.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Barrell P.J., Meiyalaghan S., Jacobs J.M., Conner A.J. Applications of biotechnology and genomics in potato improvement. Plant Biotechnol. J. 2013;11:907-920. DOI 10.1111/pbi.12099.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:248-254.

Federal State Budgetary Institution "The State Commission of the Russian Federation for Testing and Protection of Selection Achievements". Available at: http://reestr.gossort.com

Galiana E., Bonnet P., Conrod S., Keller H., Panabieres F., Ponchet M., Poupet A., Ricci P. RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitin. Plant Physiol. 1997;115: 1557-1567.

Green P.J. The ribonucleases of higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994;45:421-445.

Hamester W., Hils U. (Eds.) World Catalogue of Potato Varieties. Hamburg: Agrimedia, 2003.

Hugot K., Ponchet M., Marais A., Ricci P., Galiana E. A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens. Mol. Plant Microbe Interact. 2002;15:243-250. DOI 10.1094/MPMI.2002.15.3.243.

Ibragimova S.M., Romanova A.V., Myzgina G.Kh., Kochetov A.V. The morphogenic potential of Siberian potato cultivars in tissue cultures. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(3):316-320. DOI 10.18699/VJ18.366. (in Russian)

Kao T.H., McCubbin A.G. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996;93:12059-12065.

Kim S.G., Kim S.T., Wang Y., Yu S., Choi I.S., Kim Y.C., Kim W.T., Agrawal G.K., Rakwal R., Kang K.Y. The RNase activity of rice probenazole-induced protein1 (PBZ1) plays a key role in cell death in plants. Mol. Cells. 2011;31:25-31. DOI 10.1007/s10059-011-0004-z.

Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. Crop genes modified using the CRISPR/Cas system. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2017;7(8):822-832. DOI 10.1134/S2079059717050124.

Kurata N., Kariu T., Kawano S., Kimura M. Molecular cloning of cDNAs encoding ribonuclease-related proteins in *Nicotiana glutinosa* leaves, as induced in response to wounding or to TMV-infection. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002;66:391-397. DOI 10.1271/bbb.66.391.

Lerat S., Simao-Beaunoir A.M., Beaulieu C. Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. Mol. Plant Pathol. 2009;10:579-585. DOI 10.1111/j.1364-3703.2009.00561.x.

Lers A., Khalchitski A., Lomaniec E., Burd S., Green P.J. Senescence-induced RNases in tomato. Plant Mol. Biol. 1998;36:439-449.

Lusso M., Kuc J. Evidence for transcriptional regulation of beta-1,3-glucanase as it relates to induced systemic resistance of tobacco to blue mold. Mol. Plant Microbe Interact. 1995;8:473-475.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962;15:473-497.

Pershina L.A. Basic Methods of *in vitro* Cultivation in Plant Biotechnology. Novosibirsk: Novosibirsk State University, 2005. (in Russian)

Qin X., Soulard J., Laublin G., Morse D., Cappadocia M. Molecular analysis of the conserved C4 region of the S_{11}-RNase of *Solanum chacoense*. Planta. 2005;221:531-537. DOI 10.1007/s00425-004-1470-8.

Sindarovska Y.R., Guzyk O.I., Yuzvenko L.V., Demchenko O.A., Didenko L.F., Grynevych O.I., Spivak M.Y. Ribonuclease activity of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) cultivars with different sensitivities to buckwheat burn virus. Ukr. Biochem. J. 2014;86: 33-40.

Šindelářová M., Šindelář L., Burketová L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, ribonucleases and esterases upon tobacco mosaic virus infection and benzothiodiazole treatment in tobacco. Biol. Plant. 2002;45:423-432.

Sugawara T., Trifonova E.A., Kochetov A.V., Kanayama Y. Expression of an extracellular ribonuclease gene increases resistance to *Cucumber mosaic virus* in tobacco. BMC Plant Biol. 2016;16(3):147-152. DOI 10.1186/s12870-016-0928-8.

Trifonova E.A., Komarova M.L., Leonova N.S., Shcherban A.B., Kochetov A.V., Malinovskii V.I., Shumnyi V.K. Transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants expressing the gene of secretory nuclease from *Serratia marcescens*. Dokl. Biochem. Biophys. 2004; 394:39-41.

Trifonova E.A., Kochetov A.V., Shumny V.K. Molecular mechanisms of system resistance of plants to infections and strategy of raising virus resistance through transgenesis. Biol. Bulletin Reviews. 2007a;127:13-24 (in Russian)

Trifonova E.A., Sapotsky M.V., Komarova M.L., Scherban A.B., Shumny V.K., Polyakova A.M., Lapshina L.A., Kochetov A.V., Malinovsky V.I. Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus. Plant Cell Rep. 2007b;26:1121-1126. DOI 10.1007/s00299-006-0298-z.

Trifonova E.A., Savelyeva A.V., Romanova A.V., Filipenko E.A., Sapotsky M.V., Malinovsky V.I., Kochetov A.V. Transgenic expression of *Serratia marcescens* native and mutant nucleases modulate tobacco mosaic virus resistance in *Nicotiana tabacum* SR1. Russ. J. Genet. 2015;51:715-719.

Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. Significance of inducible defense related proteins in infected plants. Annu. Rev. Phytopathol. 2006;44:135-162. DOI 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.

Yen Y., Baenziger P.S. Identification, characterization, and comparison of RNA-degrading enzymes of wheat and barley. Biochem. Genet. 1993;31:133-145.

Yen Y., Green P.J. Identification and properties of the major ribonucleases of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 1991;97:1487-1493.

Zhang L., French R., Langenberg W.G., Mitra A. Accumulation of barley stripe mosaic virus is significantly reduced in transgenic plants expressing a bacterial ribonuclease. Transgenic. Res. 2001;10:13-19.

ORCID ID

E.A. Trifonova orcid.org/0000-0001-7095-0560

S.M. Ibragimova orcid.org/0000-0003-2817-067X

O.A. Volkova orcid.org/0000-0003-3357-3297

A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):992-999
DOI 10.18699/VJ18.442

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена фактора *B* роста эндотелия сосудов (*VEGFB*) с развитием интракраниальных аневризм

Р.И. Султанова[1, 3] ✉, Р.И. Хусаинова[1, 2, 3], Е.Р. Лебедева[4, 5], М.А. Янкина[2], Д.В. Гилев[6], Э.К. Хуснутдинова[1, 2, 3]

[1] Башкирский государственный университет, Уфа, Россия
[2] Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия
[3] Республиканский медико-генетический центр, Уфа, Россия
[4] Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия
[5] Международный центр лечения головных болей «Европа-Азия», Екатеринбург, Россия
[6] Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Интракраниальная аневризма (ИА) – тяжелое заболевание, приводящее вследствие разрыва аневризмы к субарахноидальным кровоизлияниям (САК). Распространенность этого заболевания в мире составляет в среднем около 2–5 %, из которых 50 % случаев заканчиваются летальным исходом либо неврологическими расстройствами различной степени тяжести, с высокой вероятностью рецидива кровоизлияния в течение первого полугодия после разрыва аневризмы. В России субарахноидальные кровоизлияния ежегодно регистрируют не менее чем у 18 тыс. человек. Проведен поиск ассоциаций полиморфных вариантов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* с развитием интракраниальных аневризм у жителей Волго-Уральского региона Российской Федерации с учетом наличия симптомокомплекса недифференцированной дисплазии соединительной ткани (нДСТ) и артериальной гипертензии (АГ). Аллель *C** *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* является маркером повышенного риска развития ИА в целом ($p = 0.025$; $\chi^2 = 5.052$; OR = 1.32), а также у женщин в общей выборке ($p = 0.001$; $\chi^2 = 10.124$; OR = 1.70) и в коморбидном состоянии с нДСТ ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9.501$; OR = 2.34) и АГ ($p = 0.006$; $\chi^2 = 7.385$; OR = 2.109). Обнаружено, что генотип **C*C* локуса *rs594942* ассоциирован с риском развития ИА в общей группе ($p = 0.017$; $\chi^2 = 5.702$; OR = 1.49), а также у женщин с ИА ($p = 0.0005$; $\chi^2 = 12.078$; OR = 2.25) и с симптомокомплексом нДСТ ($p = 0.007$; $\chi^2 = 7.173$; OR = 2.67) и АГ ($p = 0.010$; $\chi^2 = 6.471$; OR = 2.51). Генотип **T*T* *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* снижает риск развития ИА в сочетании с нДСТ и АГ ($p = 0.014$; $\chi^2 = 6.013$; OR = 0.10). Нами получены новые результаты о роли полиморфных вариантов гена *VEGFB* в формировании интракраниальных аневризм с учетом наличия симптомокомплекса недифференцированной дисплазии соединительной ткани и артериальной гипертензии у жителей Волго-Уральского региона России. Отягощенный коморбидный фон и наличие нДСТ и АГ могут способствовать повышенному риску развития интракраниальных аневризм, что подтверждается результатами нашего исследования.

Ключевые слова: интракраниальные аневризмы; фактор роста эндотелия сосудов VEGFB; недифференцированная дисплазия соединительной ткани; артериальная гипертензия.

Association of vascular endothelial growth factor *B* (*VEGFB*) gene polymorphisms with intracranial aneurysms

R.I. Sultanova[1, 3] ✉, R.I. Khusainova[1, 2, 3], E.R. Lebedeva[4, 5], M.A. Yankina[2], D.V. Gilev[6], E.K. Khusnutdinova[1, 2, 3]

[1] Bashkir State University, Ufa, Russia
[2] Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, RAS, Ufa, Russia
[3] Republican Medical Genetics Center, Ufa, Russia
[4] Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia
[5] International Center for the Treatment of Headaches "Europe-Asia", Ekaterinburg, Russia
[6] Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

Intracranial aneurysm (IA) is a complex disease resulting in subarachnoid hemorrhage (SAH) due to a rupture. The average worldwide prevalence of this disease is about 2–5 %, with 50 % of them ending in death or neurological disorders of varying severity, with a high probability of recurrence of hemorrhage during the first half of the year after rupture. Subarachnoid hemorrhage is annually registered in at least 18 thousand people in Russia. Associations of polymorphic variants *rs594942* and *rs11603042* of the *VEGFB* gene in intracranial aneurysm development in the Volga-Ural region of the Russian Federation with the presence of the symptom complex of undifferentiated connective tissue dysplasia (uDST) and arterial hypertension (AH) were investigated. The *C** allele *rs594942* and *rs11603042* of the *VEGFB* gene is a marker of an increased risk of IA as a whole ($p = 0.025$; $\chi^2 = 5.052$; OR = 1.32) in women as a whole ($p = 0.001$; $\chi^2 = 10.124$; OR = 1.70) and in comorbid state with uDCT ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9.501$; OR = 2.34) and AG ($p = 0.006$; $\chi^2 = 7.385$; OR = 2.109). We found that the genotype **C*C* of locus *rs594942* of the *VEGFB* gene is a marker of an increased risk of intracranial aneurysm in general ($p = 0.017$; $\chi^2 = 5.702$; OR = 1.49) and among women in general ($p = 0.0005$; $\chi^2 = 12.078$; OR = 2.25) and with the symptomatic complex uCTD ($p = 0.007$; $\chi^2 = 7.173$; OR = 2.67) and AH ($p = 0.010$; $\chi^2 = 6.471$; OR = 2.51). We have obtained new results on the role of polymorphic variants of the *VEGFB* gene in the formation of intracranial aneurysm, taking into account the presence of the symptom complex uDCT and AH among the residents of the Volga-Ural region of Russia. A burdened comorbid back-

Received February 3, 2018
Revised September 5, 2018
Accepted September 28, 2018

✉ e-mail: r-ka_@mail.ru

ground and the presence of undifferentiated connective tissue dysplasia and arterial hypertension can contribute to an increased risk of intracranial aneurysm, as evidenced by the results of our study.

Key words: intracranial aneurysm; vascular endothelial growth factor VEGFB; undifferentiated connective tissue dysplasia; arterial hypertension.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Султанова Р.И., Хусаинова Р.И., Лебедева Е.Р., Янкина М.А., Гилев Д.В., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена фактора *B* роста эндотелия сосудов (*VEGFB*) с развитием интракраниальных аневризм. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):992-999. DOI 10.18699/VJ18.442

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sultanova R.I., Khusainova R.I., Lebedeva E.R., Yankina M.A., Gilev D.V., Khusnutdinova E.K. Association of vascular endothelial growth factor *B* (*VEGFB*) gene polymorphisms with intracranial aneurysms. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):992-999. DOI 10.18699/VJ18.442 (in Russian)

Аневризма сосудов головного мозга (интракраниальная аневризма) (МКБ-10 172) – это патологическое локальное расширение просвета артерии головного мозга, чаще в области бифуркаций, приводящее вследствие разрыва к субарахноидальным кровоизлияниям (САК). Распространенность данного заболевания в мире в среднем составляет около 2–5 % (Cai et al., 2018), 50 % случаев из которых заканчиваются летальным исходом либо неврологическими расстройствами различной степени тяжести, с высокой вероятностью рецидива кровоизлияния в течение первого полугодия после разрыва аневризмы (Peters et al., 2001; Dority et al., 2016). В России САК ежегодно регистрируют не менее чем у 18 тыс. человек (Крылов и др., 2008). Этиология и патогенез интракраниальной аневризмы (ИА) до сих пор до конца не установлены, известно, что данное многофакторное заболевание имеет генетическую основу. Доказана роль ряда факторов, таких как артериальная гипертензия, курение, потребление алкоголя, наркотических веществ, наличие сопутствующих заболеваний соединительной ткани, наследственная отягощенность (Qureshi et al., 2001; Zhang, Claterbuck, 2008; Tromp et al., 2014; Behrouz et al., 2016; Grant et al., 2016; Qian et al., 2016).

Зачастую ИА встречается у людей с различными клиническими проявлениями недифференцированной дисплазии соединительной ткани (нДСТ), которая является генетически гетерогенным симптомокомплексом, без четких клинико-генеалогических критериев, с различным набором количественных и качественных фенотипических симптомов, обусловленных степенью выраженности структурно-функциональных нарушений твердой и рыхлой соединительной ткани и осложнениями, формирующимися в процессе онтогенеза (Яковлев, Нечаева, 2011). В отличие от дифференцированных форм дисплазии соединительной ткани (ДСТ), вызываемых серьезным дефектом определенного гена с высокой пенетрантностью, нДСТ характеризуется мультигенностью генетической составляющей. Как правило, заболевание возникает при сочетании нескольких дефектов различных генов, причем каждый из них в отдельности не приводит к выраженным фенотипическим проявлениям (Mosca et al., 2012, 2014). Недифференцированная ДСТ может способствовать формированию ИА, так как в основе патогенеза аневризм также лежат изменения структуры соединительной ткани (Яковлев, Нечаева, 2011).

Гемодинамическая нагрузка на сосуды в виде артериальной гипертензии также является ключевым фактором в развитии ИА. Стенка аневризмы утрачивает трехслойное строение, присущее артерии, в ней, как правило, нет мышечного слоя, отсутствует (или сильно недоразвита) внутренняя мембрана и присутствует рубцовая (фиброзная) ткань. Область дна аневризмы – наиболее тонкий участок, который значительно подвержен разрывам, так как представлен одним слоем интимы (Ostergaard et al., 1987; Prockop, Kivirikko, 1995; Schievink, 1999; Скороход, Бричковская, 2007). Постоянное повышение артериального давления или его периодические подъемы могут привести к разрыву измененной стенки сосуда и развитию САК.

Семейство факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) считается основным в сосудистом новообразовании среди всех ангиогенных факторов (Ferrara, 2009). VEGF действует селективно на сосудистый эндотелий, обеспечивая его стабильность, способствуя пролиферации, миграции и формированию эндотелиальных клеток (Losordo, Diommeler, 2004). Ген *VEGFB* кодирует одноименный белок, участвующий в эмбриональном ангиогенезе, нарушения в котором в конечном итоге также могут привести к изменению строения стенок сосудов, а те, в свою очередь, – к развитию симптомокомплекса нДСТ и ИА.

Аневризма сосудов головного мозга в условиях поздней диагностики или некорректного лечения сопряжена с высоким уровнем смертности и инвалидизации. Поиск маркеров с высокой диагностической значимостью и способов прогнозирования возникновения заболевания до развития САК – актуальная социальная проблема. С учетом значимости наследственных факторов в формировании ИА поиск ДНК-маркеров заболевания позволит диагностировать заболевание до развития осложнений.

Целью настоящей работы стало изучение роли полиморфных вариантов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* в патогенезе аневризм сосудов головного мозга у жителей Волго-Уральского региона России при наличии симптомокомплекса нДСТ и АГ.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 311 больных интракраниальными аневризмами русской этнической принадлежности и 285 практически здоровых индивидов, соответствующих по полу, возрасту и этниче-

Table 1. Age ranges in the studied groups

Groups	*n* m/f	Age		
		Overall for the group	Men	Women
Patients	311 152/159	48.3 ± 0.72	45.7 ± 1.03	50.9 ± 0.98
IA + UCTD	108 57/51	48.1 ± 1.1	44.8 ± 1.56	51.8 ± 1.39
IA+AH	101 47/54	49.2 ± 1.1	47.6 ± 1.44	50.7 ± 1.62
Control	283 127/156	35.0 ± 0.64	36.4 ± 0.97	34.0 ± 0.85
Control without UCTD	183 102/81	33.4 ± 0.68	36.6 ± 1.01	36.4 ± 1.15
Control without AH	175 96/79	36.4 ± 0.78	32.5 ± 0.85	32.5 ± 1.6

Notes: *n*, number of individuals; M ± m, mean value ± standard error (standard error = standard deviation/$\sqrt{n}$).

ской принадлежности, Волго-Уральского региона России в качестве контрольной выборки.

В исследование были включены пациенты Регионального сосудистого центра нейрохирургии на базе нейрохирургических отделений городской клинической больницы № 40 г. Екатеринбурга, у которых диагностирована аневризма, а также пациенты после разрыва аневризмы и хирургического лечения в соответствии со стандартами, разработанными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (WMA) «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» и с одобрения локальных биоэтических комитетов. Исследуемые выборки тестированы по специально составленному протоколу, включающему сведения об этнической принадлежности, количестве аневризм, их локализации, наследственном статусе, потреблении алкоголя, курении. Критериями исключения были: наличие веретенообразных или фузиформных аневризм, наличие сопутствующих заболеваний и состояний, которые могут предрасполагать к сосудистой патологии (атеросклероз, наследственные заболевания соединительной ткани). Возраст больных варьировал от 2 до 76 лет, средний возраст составил 48.3 ± 0.72 года (табл. 1).

Дизайн исследования состоял из следующих этапов:

Сбор данных катамнеза заболевания, анамнеза жизни больных и их родословных осуществлялся в процессе интервью, при клиническом осмотре больных, а также при анализе медицинской документации, данных магниторезонансной и компьютерной томографий головного мозга и результатов дополнительных обследований, включающих клинический осмотр, измерение артериального давления, пульса. С целью определения признаков соединительнотканной патологии у всех больных с интракраниальными аневризмами и пациентов контрольной группы общий осмотр проведен по особой методике (Lebedeva, Sakovich, 2013). Он включал определение конституции, роста, веса, растяжимости кожи над серединой ключицы в положении стоя и толщины кожной складки на тыле кисти. Растяжимость кожи считалась повышенной, если величина кожной складки над наружными концами ключиц была не менее 4.0 см. Кроме того, определялось наличие видимых мелких сосудов на лице, груди и других участках тела, телеангиоэктазий, ангиом, липом, стрий, варикозного расширения вен; выявлялись деформации грудной клетки, сколиоз, плоскостопие, арахнодактилии, диастаз прямых мышц живота, грыж; проводились пробы для выявления гипермобильности суставов. Индекс массы тела (I) был рассчитан по формуле: вес (кг) разделить на рост (м) в квадрате: $I = m/h^2$.

Число маркеров нДСТ среди больных с ИА не менее трех имели 62.8 и 11.8 % людей из контрольной группы ($p < 0.0001$, OR = 12.5, 95 % ДИ = 7.45–21.1). Среднее число маркеров дисплазии оказалось равным 3.07 в группе больных с аневризмами и 1.17 в контрольной группе, поэтому наличие дисплазии соединительной ткани констатировали у лиц, имеющих не менее трех маркеров дисплазии.

Артериальная гипертензия обнаружена у 57.8 % больных аневризмами, в контроле АГ выявлена у 9 % ($p < 0.0001$, OR = 13.38, 95 % ДИ 7.64–23.4). Большинство случаев АГ встречалось в возрасте от 41 до 50 лет (65.8 %). Длительность существования АГ до диагностики аневризмы составила в большинстве случаев пять-десять лет. Для сбора данных использовалась специально разработанная анкета.

Инструментальные исследования. Для выявления аневризм сосудов головного мозга производилась церебральная ангиография на аппарате PHILIPS BW 300, МР-ангиография или КТ-ангиография – на аппаратах PHILIPS TOMOSCAN NT и PHILIPS JIYROSCAN T5. Церебральная ангиография выполнялась под местной анестезией путем зондирования магистральных артерий головы через бедренную артерию по способу Сельдингера. Кроме того, выполнялась компьютерная или магнитно-резонансная томография головного мозга, а также транскраниальная допплерография на аппарате APOGEE 800 PLUS, ATL (США). В качестве скринингового исследования сосудов головного мозга выполнялась МР-ангиография.

Молекулярно-генетические исследования. Выделение ДНК из цельной крови проводилось методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1985). Генотипирование локусов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* проводили с помощью метода ПЦР в реальном времени с применением TaqMan технологии и разработанных нами праймеров и зондов, несущих флуорофор и тушитель, комплементарный средней части амплифицируемого фрагмента на ДНК-амплификаторе CFX96 Touch Deep Well Real-time PCR Detection System (Bio-Rad), обладающей возможностью детекции и анализа флуоресценции по конечной точке с использованием встроенных средств программного обеспечения (Bio-Rad CFX Manager V1.6.541.1028). Характеристика использованных локусов гена *VEGFB* представлена в табл. 2.

Статистический анализ результатов. Для всех рассматриваемых групп проводили оценку соответствия эмпирических распределений частот генотипов ожидаемому,

Table 2. Characteristics of the studied loci of the *VEGFB* gene

Locus	Primer sequence (5′→3′)	Detection method	Reference
rs594942 c.*487 T>C	FJ, CCAACCCTGATAAAAGAGA RJ, CCTCATTTCCTCCATCTG FAM-ttgTcAcTgTcCag-BHQ-1 VIC-ttgTcAcTgCcCag-BHQ-2	TaqMan	Domestic protocol
rs11603042 c.374+44G>T	FJ,CCCTGTTCTTCTCCTGAGCA RJ, GGTCCCCAGTTCTGTGGA FAM-agcaccCccAaaGcct-BHQ-1 VIC-agcaccCccCaaGcct-BHQ-2	»	»

согласно уравнению Харди–Вайнберга. Был проведен сравнительный анализ аллелей и генотипов с использованием таблиц сопряженности 2 × 2 Version 4.12.14. Различия считались статистически значимыми при уровне $p > 0.05$.

При анализе группы пациентов с аневризмами с группой контроля, а затем отдельно выделенных подгрупп мужчин и женщин используются одни и те же данные при выполнении двух сравнений. Поэтому мы применили поправку Бонферрони, считая значимыми результаты, для которых значение p-value < 0.05/2 = 0.025. Поправка на множественность введена с учетом числа сравнений в рамках одной модели. Аналогично сравнение групп пациентов с дисплазией и без дисплазии и проведение сравнений подгрупп мужчин и женщин, затем при сравнении групп пациентов с гипертензией и без гипертензии, при сравнении групп пациентов с гипертензией + дисплазия и без обоих сопутствующих заболеваний.

Результаты

Ген *VEGFB* локализован на 11-й хромосоме в области q13.1 и имеет семь экзонов. Исследованные нами полиморфные варианты *rs11603042* и *rs594942* расположены в четвертом интроне и в 3′-нетранслируемой области гена соответственно.

В ходе исследования проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* между выборками больных ИА и контроля с учетом гендерных различий, наличия признаков нДСТ и артериальной гипертензии, а также выполнен поиск ассоциаций изученных локусов с ИА в изолированном и коморбидном состояниях.

Согласно базе данных 1000 геномов для европейской популяции, сцепленность между двумя выбранными полиморфизмами полная: D’ = 1, R2 = 0.9911 (https://analysistools.nci.nih.gov/LDlink/?tab = ldpair). При проведении нашего исследования эти данные подтвердились, что позволило рассмотреть локусы *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* как один локус с идентичным распределением частот аллелей и генотипов, аллели также оказались идентичными. Подробная характеристика изученных локусов представлена в табл. 3.

При исследовании полиморфного варианта *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* частота аллеля **C* составила 0.693 в выборке с ИА и оказалась выше, чем в группе контроля, где ее частота не превышала 0.631, различия достигли статистической значимости ($p = 0.025$; $\chi^2 = 5.052$). Аллель **C* является маркером повышенного риска развития ИА

Table 3. Characteristics of the *rs594942* and *rs11603042* loci of the *VEGFB* gene in groups of patients with AI in general and with comorbid AH and UCTD as compared to the control group

Patient group	H_{pred}	H_{obs}	HW_{pval}	MAF
Overall	0.447	0.462	0.481	(**T*) 0.337
IA + UCTD	0.449	0.486	0.212	(**T*) 0.340
IA + AH	0.447	0.474	0.388	(**T*) 0.337
Control	0.466	0.500	0.284	(**T*) 0.370

Notes: H_{obs}, observed heterozygosity; H_{pred}, expected heterozygosity; HW_{pval}, index *p* for assessing the compliance with the Hardy–Weinberg equilibrium ($p > 0.05$); MAF, the frequency of the minor allele.

(OR = 1.32; 95 % ДИ 1.04–1.68). Частота гомозиготного генотипа **C*C* была также выше в группах больных с ИА по сравнению с группой контроля, у носителей гомозиготного варианта рискового аллеля риск развития ИА был еще выше ($p = 0.017$; $\chi^2 = 5.702$; OR = 1.49; 95 % ДИ 1.07–2.07) (табл. 4).

В нашей выборке пациентов с ИА оказалось 51.13 % женщин и 48.87 % мужчин. При рассмотрении выборки с учетом гендерных различий выявленная ассоциация подтвердилась только у женщин. Частота аллеля **C* в группе женщин с ИА составила 0.698, тогда как в группе контроля не превышала 0.576 ($p = 0.001$; $\chi^2 = 10.124$; OR = 1.70; 95 % ДИ 1.22–2.36). Генотип **C*C* также оказался рисковым ($p = 0.0005$; $\chi^2 = 12.078$; OR = 2.25; 95 % ДИ 1.42–3.57).

Проведен анализ исследуемых выборок с учетом наличия клинических признаков нДСТ и АГ в коморбидном состоянии с ИА для выявления роли изученных локусов в формировании ИА в комплексе с фоновыми заболеваниями.

Оказалось, что у 25.78 % женщин и 19.08 % мужчин с ИА встречается симптомокомплекс нДСТ в сочетании с АГ. При этом у 33.96 % женщин и 30.92 % мужчин ИА сопровождается наличием только АГ, а у 37.5 % мужчин и 32.08 % женщин – клиническими проявлениями нДСТ, без АГ. Только у 12.5 % мужчин и 8.18 % женщин выявлена ИА в изолированном состоянии, без клинических проявлений АГ и нДСТ, что свидетельствует о важной роли этих патологий в качестве факторов, способствующих развитию аневризм сосудов головного мозга. Мы провели анализ ассоциаций изученных локусов гена *VEGFB* с ИА с учетом наличия АГ и нДСТ в отдельности и в со-

Table 4. Comparison of frequency distributions of alleles and genotypes for *rs594942* and *rs11603042* in the *VEGFB* gene between groups of patients with AI and control with regard to gender

Sample	*n*	Allele frequencies		Genotype frequencies		
		**T*	**C*	**T*T*	**C*T*	**C*C*
Patients with IA	309	(190) 0.307 $p = 0.025$ $\chi^2 = 5.052$ OR = 0.76 (0.60–0.97)	(428) 0.693 $p = 0.025$ $\chi^2 = 5.052$ OR = 1.32 (1.04–1.68)	(29) 0.094	(132) 0.427	(148) 0.479 $p = 0.017$ $\chi^2 = 5.702$ OR = 1.49 (1.07–2.07)
Control without IA	283	(209) 0.369	(357) 0.631	(34) 0.120	(141) 0.498	(108) 0.382
Men with IA	150	(94) 0.313	(206) 0.687	(14) 0.093	(66) 0.440	(70) 0.467
Control men without IA	126	(76) 0.301	(176) 0.698	(11) 0.087	(54) 0.429	(61) 0.484
Women with IA	159	(96) 0.301 $p = 0.001$ $\chi^2 = 10.124$ OR = 0.59 (0.42–0.82)	(222) 0.698 $p = 0.001$ $\chi^2 = 10.124$ OR = 1.70 (1.22–2.36)	(15) 0.094	(66) 0.415 $p = 0.013$ $\chi^2 = 6.12$ OR = 0.57 (0.37–0.89)	(78) 0.491 $p = 0.0005$ $\chi^2 = 12.078$ OR = 2.25 (1.42–3.57)
Control women without IA	157	(133) 0.424	(181) 0.576	(23) 0.146	(87) 0.544	(47) 0.299

Notes: *n*, number of subjects.

четании. Так, женщины с аллелями **C* локусов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* оказались более подвержены риску развития ИА при наличии симптомокомплекса нДСТ ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9.501$; OR = 2.34; 95 % ДИ 1.35–4.05) (табл. 5).

При носительстве гомозиготных генотипов **C*C* по обоим исследованным локусам гена *VEGFB* риск развития ИА в сочетании с нДСТ у женщин также возрастает ($p = 0.007$; $\chi^2 = 7.173$; OR = 2.67; 95 % ДИ 1.29–5.53). Генотип **T*T* оказался протективным маркером развития ИА у женщин с нДСТ ($p = 0.023$; $\chi^2 = 5.150$; OR = 0.10; 95 % ДИ 0.01–0.83).

Аллель **C* исследуемых локусов также оказался рисковым у женщин с ИА с симптомокомплексом АГ ($p = 0.006$; $\chi^2 = 7.385$; OR = 2.09; 95 % ДИ 1.22–3.59).

Генотипы **C*C rs594942* и *rs11603042* оказались маркерами повышенного риска развития ИА в сочетании с АГ у женщин ($p = 0.010$; $\chi^2 = 6.471$; OR = 2.51; 95 % ДИ 1.23–5.12).

Учитывая, что у достаточно большого числа пациентов с ИА встречаются оба фоновых состояния, мы провели анализ результатов исследования при наличии как АГ, так и нДСТ в сочетании с ИА и сравнили с контрольной выборкой с отсутствием таковых признаков.

Генотип **T*T rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* снижает риск развития ИА в сочетании с нДСТ и АГ ($p = 0.014$; $\chi^2 = 6.013$; OR = 0.10; 95 % ДИ 0.01–0.76) (см. табл. 5).

Таким образом, аллель *C* rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* – маркер повышенного риска развития ИА в целом ($p = 0.025$; $\chi^2 = 5.052$; OR = 1.32; 95 % ДИ 1.04–1.68), у женщин в целом ($p = 0.001$; $\chi^2 = 10.124$; OR = 1.70; 95 % ДИ 1.22–2.36) и в коморбидном состоянии с нДСТ ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9{,}501$; OR = 2.34; 95 % ДИ 1.35–4.05) и АГ ($p = 0.006$; $\chi^2 = 7.385$ OR = 2.109; 95 % ДИ 1.22–3.59).

Генотип **C*C* локусов *rs594942* и *rs11603042* ассоциирован с риском развития ИА в целом ($p = 0.017$; $\chi^2 = 5.702$; OR = 1.49; 95 % ДИ 1.07–2.07), а также у женщин в целом ($p = 0.0005$; $\chi^2 = 12.078$; OR = 2.25; 95 % ДИ 1.42–3.57) и с симптомокомплексом нДСТ ($p = 0.007$; $\chi^2 = 7.173$; OR = 2.67; 95 % ДИ 1.29–5.53) и АГ ($p = 0.010$; $\chi^2 = 6.471$; OR = 2.51; 95 % ДИ 1.23–5.12).

Обсуждение

Ангиогенез – многоступенчатый процесс образования новых кровеносных сосудов, который стимулируется гипоксией и ангиогенными факторами, такими как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), ангиогенин, трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) и др. Нарушения на любых этапах ангиогенеза могут привести к сосудистым патологиям, в том числе к развитию ИА.

Белки, относящиеся к семейству VEGF, – гликопротеины, стимулирующие формирование новых кровеносных и лимфатических сосудов и увеличивающие их проницаемость. Взаимодействие между VEGF и рецептором активирует остаток тирозина, находящегося в интрацитоплазматической части рецептора, и запускает различные сигнальные каскады в эндотелиальных клетках, такие как пролиферация, миграция и увеличение сосудистой проницаемости (Guo et al., 2010).

В исследовании (Liu al., 2016) обнаружено, что концентрация VEGF в сыворотке крови у пациентов на поздней стадии развития аневризмы была значительно выше, чем на более ранних стадиях. Аналогичное исследование было проведено M. Xu с коллегами (2016), в котором выборки пациентов с аневризмой аорты разделили по стадиям заболевания. Результаты показали, что сывороточные концентрации VEGF в группе с поздними стадиями ИА были значительно выше, чем концентрации в группе со средней стадией, а у тех пациентов, в свою очередь, выше, чем у пациентов с ранней стадией, что предполагает клиническую ценность данного маркера для ранней диагностики и

Table 5. Comparison of frequency distributions of alleles and genotypes for *rs594942* and *rs11603042* in the *VEGFB* gene with regard to comorbid UCTD and AH

Sample	*n*	Allele frequency		Genotype frequency		
		**T*	**C*	**C*C*	**C*T*	**T*T*
IA + UCTD	108	(152) 0.717	(60) 0.283	(50) 0.472	(52) 0.491	(4) 0.037 $p = 0.009$ $\chi^2 = 6.693$ OR = 0.26 (0.09–0.77)
Control without UCTD	184	(230) 0.628	(136) 0.372	(71) 0.388	(88) 0.481	(24) 0.131
IA + UCTD women	51	(77) 0.755 $p = 0.002$ $\chi^2 = 9.501$ OR = 2.34 (1.35–4.05)	(25) 0.245 $p = 0.002$ $\chi^2 = 9.501$ OR = 0.43 (0.25–0.74)	(27) 0.529 $p = 0.007$ $\chi^2 = 7.173$ OR = 2.67 (1.29–5.53)	(23) 0.451	(1) 0.020 $p = 0.023$ $\chi^2 = 5.150$ OR = 0.10 (0.01–0.83)
Control women without IA or UCTD	81	(92) 0.568	(70) 0.432	(24) 0.296	(44) 0.543	(13) 0.160
IA + UCTD men	57	(75) 0.682	(35) 0.318	(23) 0.418	(29) 0.527	(3) 0.055
Control men without IA or UCTD	102	(137) 0.678	(65) 0.322	(47) 0.465	(43) 0.426	(11) 0.109
IA + AH	101	(142) 0.703	(60) 0.297	(46) 0.455	(50) 0.495	(5) 0.050
Control without IA or AH	176	(219) 0.626	(131) 0.374	(66) 0.377	(87) 0.497	(22) 0.126
IA+ AH women	54	(81) 0.750 $p = 0.006$ $\chi^2 = 7.39$ OR = 2.09 (1.22–3.59)	(27) 0.250 $p = 0.006$ $\chi^2 = 7.39$ OR = 0.48 (0.28–0.82)	(29) 0.537 $p = 0.010$ $\chi^2 = 6.471$ OR = 2.51 (1.23–5.12)	(23) 0.426	(2) 0.037
Control women without IA or AH	79	(93) 0.589	(65) 0.411	(25) 0.316	(43) 0.544	(11) 0.139
IA + AH men	47	(61) 0.649	(33) 0.351	(17) 0.362	(27) 0.574	(3) 0.064
Control men without IA or AH	96	(125) 0.658	(65) 0.342	(41) 0.431	(43) 0.453	(11) 0.116
IA + UCTD + AH	70	(102) 0.729	(38) 0.271	(1) 0.014 $p = 0.014$ $\chi^2 = 6.013$ OR = 0.10 (0.01–0.76)	(36) 0.514	(33) 0.471
Control without UCTD or AH	167	(210) 0.629	(124) 0.371	(21) 0.126	(82) 0.491	(64) 0.383
IA + UCTD + AH women	41	(62) 0.756	(20) 0.244	(1) 0.024	(18) 0.439	(22) 0.537
Control women without IA, UCTD, or AH	91	(120) 0.066	(62) 0.934	(11) 0.120	(40) 0.440	(40) 0.440
IA + UCTD + AH men	29	(40) 0.690	(18) 0.310	–	18 (0.621)	(11) 0.379
Control men without IA, UCTD, or AH	76	(90) 0.592	(62) 0.408	10 (0.132)	(42) 0.553	24 (0.316)

Notes: *n*, number of subjects. Over three UCTD markers were analyzed in subjects with UCTD.

оценки тяжести заболевания (Xu et al., 2016). M. Wolanska с коллегами (2015) обнаружили повышенную экспрессию гена *VEGFB* (269 ± 31 %) у пациентов с аневризмой брюшной аорты, что предполагает значительную роль данного гена в патологии сосудов и патогенезе аневризм. Однако в доступной литературе не очень много исследований по поиску значимости полиморфных вариантов гена *VEGFB* в развитии аневризм.

Выявлена ассоциация гаплотипов полиморфных вариантов гена *VEGFB* у матери с задержкой роста плода (малый плод для гестационного возраста) у латиноамериканок (Edwards et al., 2011). Согласно данным исследовательской группы из Бельгии, гаплотипы полиморфных вариантов *rs3741403*, *rs1058735* и *rs594942* гена *VEGFB* ассоциированы со II фазой метастатического колоректального рака (Lambrechts et al., 2015). Группой ученых

(Sudhesan et al., 2017) был проведен анализ роли полиморфных вариантов гена *VEGFB* (*rs699947*, *rs833061* и *rs2010963*) в развитии псориаза в южноиндийской популяции тамилов, по данным которого гаплотип **CTC* гена *VEGF* является маркером повышенного риска развития псориаза, а уровень VEGF в плазме крови выше у пациентов с псориазом по сравнению с контролем и значительно коррелирует с тяжестью заболевания (Sudhesan et al., 2017).

Нами получены новые результаты о роли полиморфных вариантов гена *VEGFB* в формировании ИА с учетом наличия симптомокомплекса нДСТ и АГ у жителей Волго-Уральского региона России. Отягощенный коморбидный фон и наличие нДСТ и АГ могут способствовать повышенному риску развития ИА, что подтверждается результатами нашего исследования. Наличие симптомокомплекса нДСТ и АГ в целом и в отдельности у лиц молодого возраста могут быть значимыми прогностическими факторами риска ИА на этапах диспансерного наблюдения при профессиональной ориентации, медицинской экспертизе, определении возможности занятия спортом, оценке противопоказаний при оперативных вмешательствах и служить дополнительными маркерами риска развития и выявления ИА до стадии САК с учетом наличия генетических маркеров заболевания.

Таким образом, в нашем исследовании выявлена значимость полиморфных вариантов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* в формировании ИА в целом и с учетом наличия сопутствующих заболеваний соединительной ткани и артериальной гипертензии. Обнаружены гендерные различия в распределении частот аллелей и генотипов исследуемых локусов, что требует дальнейшего изучения в независимых выборках больных ИА из различных популяций других регионов России и мира. Выявлено, что наличие нДСТ и АГ увеличивает риск развития ИА.

Acknowledgements

Experiments were performed with human tissue samples from the collection of the Institute of Biochemistry and Genetics, Uralian Research Center, Russian Academy of Sciences. This work was supported by the FASO Russia program for the development of bioresource collections.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Крылов В.В., Природов А.В., Петриков С.С. Нетравматическое субарахноидальное кровоизлияние: диагностика и лечение. Неврология и ревматология. 2008;1:14-18.
[Krylov V.V., Prirodov A.V., Petrikov S.S. Nontraumatic subarachnoid hemorrhage: diagnosis and treatment. Nevrologiya i Revmatologiya = Neurology and Rheumatology. 2008;1:14-18. (in Russian)]

Скороход А.А., Бричковская Т.В. Артериальные аневризмы головного мозга: этиология, патогенез. Медицинский журнал (Минск). 2007;3:4-7.
[Skorokhod A.A., Brichkovskaya T.V. Arterial aneurysms of the brain: etiology and pathogenesis. Meditsinskiy Zhurnal (Minsk) = Medical Journal (Minsk). 2007;3:4-7. (in Russian)]

Яковлев В.М., Нечаева Г.И. Системные дисплазии соединительной ткани: актуальность проблемы в клинике внутренних болезней. Сиб. мед. журнал. 2011;3:9-12.
[Yakovlev V.M., Nechaeva G.I. Systemic connective tissue dysplasia: the urgency of the problem in the internal disease clinic. Sibirskiy Meditsinskiy Zhurnal = Siberian Medical Journal. 2011;3:9-12. (in Russian)]

Behrouz R., Birnbaum L., Grandhi R., Johnson J., Misra V., Palacio S., Seifi A., Topel C., Garvin R., Caron J.L. Cannabis use and outcomes in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Stroke. 2016; 47(5):1371-1373. DOI 10.1161.

Cai W., Hu C., Gong J., Lan Q. Anterior communicating artery aneurysm morphology and the risk of rupture. World Neurosurg. 2018; 109:119-126. DOI 10.1016.

Dority J.S., Oldham J.S. Subarachnoid hemorrhage: an update. Anesthesiol. Clin. 2016;34(3):577-600. DOI 10.1016.

Edwards D.R., Romero R., Kusanovic J.P., Hassan S.S., Mazaki-Tovi S., Vaisbuch E., Kim C.J., Erez O., Chaiworapongsa T., Pearce B.D., Bartlett J., Friel L.A., Salisbury B.A., Anant M.K., Vovis G.F., Lee M.S., Gomez R., Behnke E., Oyarzun E., Tromp G., Menon R., Williams S.M. Polymorphisms in maternal and fetal genes encoding for proteins involved in extracellular matrix metabolism alter the risk for small-for-gestational-age. J. Matern. Fetal Neonatal. Med. 2011;24(2):362-380. DOI 10.3109/14767058.

Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. Eur. Cytokine Netw. 2009;20(4):158-163. DOI 10.1684/ecn.

Grant R.A., Cord B.J., Kuzomunhu L., Gilmore E., Matouk C.C. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage and severe, catheter-induced vasospasm associated with excessive consumption of a caffeinated energy drink. Interv. Neuroradiol. 2016;22(6):674-678.

Guo S., Colbert L.S., Fuller M., Zhang Y., Gonzalez-Perez R.R. Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. Biochim. Biophys. Acta. 2010;1806(1):108-121. DOI 10.1016/j.bbcan.

Lambrechts D., Thienpont B., Thuillier V., Sagaert X., Moisse M., Peuteman G., Pericay C., Folprecht G., Zalcberg J., Zilocchi C., Margherini E., Chiron M., Van Cutsem E. Evaluation of efficacy and safety markers in a phase II study of metastatic colorectal cancer treated with aflibercept in the first-line setting. Br. J. Cancer. 2015; 113(7):1027-1034. DOI 10.1038/bjc.2015.329.

Lebedeva E.R., Sakovich V.P. Systemic connective tissue abnormalities in patients with saccular intracranial aneurysms. Acta Neurol. Scand. 2013;128:130-135.

Liu P., Zhou Y., An Q., Song Y., Chen X., Yang G.Y., Zhu W. Erythropoietin stimulates endothelial progenitor cells to induce endothelialization in an aneurysm neck after coil embolization by modulating vascular endothelial growth factor. Stem Cells Transl. Med. 2016; 5(9):1182-1189.

Losordo D.W., Diommeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part 1: angiogenic cytokines. Circulation. 2004;109:2487-2491.

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.

Mosca M., Tani C., Carli L., Bombardieri S. Undifferentiated CTD: a wide spectrum of autoimmune diseases. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 2012;26:73-77. DOI 10.1016/j.berh.

Mosca M., Tani C., Vagnani S., Carli L., Bombardieri S. The diagnosis and classification of undifferentiated connective tissue diseases. J. Autoimmun. 2014;48-49:50-52. DOI 10.1016/j.jaut.

Ostergaard J.R., Oxlund H. Collagen type III deficiency in patients with rupture of intracranial saccular aneurysms. J. Neurosurg. 1987; 67:690-696.

Peters D.G., Kassam A.B., Feingold E., Heidrich-O'Hare E., Yonas H., Ferrell R.E., Brufsky A. Molecular anatomy of an intracranial aneurysm: Coordinated expression of genes involved in wound healing and tissue remodeling. Stroke. 2001;32:1036-1042.

Prockop D.J., Kivirikko K.I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu. Rev. Biochem. 1995;64:403-434.

Qian Z., Kang H., Jiang C., Tang K., Jiang C., Wu Z., Li Y., Liu A. Assessment of risk of aneurysmal rupture in patients with normotensives, controlled hypertension, and uncontrolled hypertension. J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 2016;25(7):1746-1752.

Qureshi A.I., Suri M.F., Yahia A.M., Suarez J.I., Guterman L.R., Hopkins L.N., Tamargo R.J. Risk factors for subarachnoid hemorrhage. Neurosurgery. 2001;49:607-612.

Schievink W.I. Marfan syndrome and intracranial aneurysms. Stroke. 1999;30:2767-2768.

Sudhesan A., Rajappa M., Chandrashekar L. Vascular endothelial growth factor (*VEGF*) gene polymorphisms (*rs699947*, *rs833061*, and *rs2010963*) and psoriatic risk in south indian tamils. Hum. Immunol. 2017;78(10):657-663. DOI 10.1016/j.humimm.2017.08.004.

Tromp G., Weinsheimer S., Ronkainen A., Kuivaniemi H. Molecular basis and genetic predisposition to intracranial aneurysm. Ann. Med. 2014;46(8):597-606. DOI 10.3109/07853890.2014.949299.

Xu M., Zhang Y., Tang L., Huang H. Concentration analysis of hypoxi-inducible factor-1α; and vascular endothelial growth factor in patients with aortic aneurysm at different stages and its clinical significance. Cell Mol. Biol. (Noisy-le-Grand). 2016;62(1):73-76.

Wolanska M., Bankowska-Guszczyn E., Sobolewski K., Kowalewski R. Expression of VEGFs and its receptors in abdominal aortic aneurysm. Int. Angiol. 2015;34(6):520-528.

Zhang J., Claterbuck R.E. Molecular genetics of human intracranial aneurysms. Int. J. Stroke. 2008;3(4):272-287. DOI 10.1111/j.1747-4949.

ORCID ID

R.I. Sultanova orcid.org/0000-0002-5158-0880

R.I. Khusainova orcid.org/0000-0002-8643-850X

E.R. Lebedeva orcid.org/0000-0003-2463-7113

M.A. Yankina orcid.org/0000-0003-0441-5169

D.V. Gilev orcid.org/0000-0003-1040-5696

E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1000-1008
DOI 10.18699/VJ18.443

Генетика и патофизиология низкорениновой артериальной гипертонии

А.Л. Маркель

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

Обзор посвящен рассмотрению вопросов генетической детерминации и патофизиологии одной из форм гипертонической болезни – низкорениновой артериальной гипертонии. На первый взгляд, развитие низкорениновой гипертонии представляется «противоестественным», так как ренин как ключевой фермент ренин-ангиотензиновой системы, играющей важную роль в процессе формирования гипертонической болезни, при низкорениновой гипертонии подавлен. В то же время самые популярные лекарства, используемые при лечении гипертонической болезни, относятся к классу блокаторов ренин-ангиотензиновой системы. Разрешить противоречия позволили исследования генетики и патофизиологии некоторых групп больных с характерными, объединяющими этих больных симптомами. Генетические исследования последних десятилетий с использованием как семейного анализа, так и современных молекулярно-генетических технологий позволили выявить основные механизмы развития низкорениновой гипертонии, которые можно классифицировать в качестве определенных синдромов с вполне изученной патофизиологией их развития. К этим синдромам относятся случаи спорадически возникающих соматических мутаций в клетках коры надпочечников, которые начинают продуцировать повышенное количество альдостерона. Выявлено несколько наследственных олигогенных форм низкорениновых гипертензий, часть из которых также связана с гиперпродукцией альдостерона, другая же часть обусловливает развитие низкорениновой гипертонии за счет нарушений регуляции функции ионных каналов почки. Открытие форм артериальной гипертонии с известными механизмами имеет первостепенное значение для медицины, так как позволяет проводить целевую эффективную терапию и в ряде случаев достигать полного излечения. Тем не менее основной контингент больных с низкорениновой гипертонией принадлежит к группе больных с невыясненной до конца этиологией, так как их развитие связано с полигенными системами и со значительным влиянием средовых факторов. Исследование генетико-физиологических механизмов низкорениновых форм артериальной гипертонии дает показательный пример того, как проникновение в интимные механизмы регуляции артериального давления в каждом конкретном случае позволяет идентифицировать отдельные специфические синдромы и устанавливать исходные причины заболевания. Очевидно, на этом пути обеспечен прогресс в раскрытии причин и механизмов эссенциальной гипертонической болезни человека.

Ключевые слова: артериальное давление; регуляция; гипертоническая болезнь; низкорениновая гипертония; генетическая детерминация; патофизиология; альдостерон; ренин; ионные каналы почки.

Genetics and pathophysiology of low-renin arterial hypertension

A.L. Markel

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The review is devoted to the consideration of genetic determination and pathophysiology of one of the forms of hypertensive disease known as low-renin hypertension. At first glance, the development of low-renin hypertension is "unnatural", as renin, as a key enzyme of the renin-angiotensin system, which plays an important role in the development of hypertensive disease, is suppressed in low-renin hypertension. At the same time, the most important drugs actual in the treatment of hypertensive disease belong to the renin-angiotensin system blockers. This contradiction was resolved by a study of genetic and pathophysiological mechanisms of hypertension in some groups of patients with characteristic symptoms bringing these people together. Genetic studies of some recent decades using both family analysis and modern molecular genetic technologies have revealed the main mechanisms underlying low-renin hypertension, which can be classified as certain syndromes with well-defined genetic and clinical features. These syndromes include cases of sporadically occurring somatic mutations in the cells of the adrenal cortex, which begin to produce aldosterone in increased amounts. Also, several oligogenic forms of low-renin hypertension were studied, some of which are associated with the hyperproduction of aldosterone, but in the others the development of low-renin hypertension was associated with mutations of genes involved in regulation of the functioning of the kidney ion channels. The discovery of some types of arterial hypertension with known mechanisms of their development is of paramount importance for medicine, as it allows for targeted effective therapy and in some cases for achieving a complete cure. However, the main contingent of patients with low-renin hypertension belongs to cases with unexplained etiology, as their development is associated with polygenic systems and with a significant influence of numerous environmental factors. The study of genetic and physiological mechanisms of various forms of low-renin arterial hypertension provides a good example of how penetration into the intimate mechanisms of the blood pressure regulation in each personal case makes it possible to identify some specific syndromes and establish its final causes. It seems

Received September 5, 2018
Revised October 24, 2018
Accepted October 28, 2018

e-mail: markel@bionet.nsc.ru

that progress in understanding the causes and mechanisms of essential hypertension lies along this way.

Key words: arterial blood pressure; regulation; hypertensive disease; low-renin hypertension; genetic determination; pathophysiology; aldosterone; renin; kidney ion channels.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Маркель А.Л. Генетика и патофизиология низкорениновой артериальной гипертонии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1000-1008. DOI 10.18699/VJ18.443

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Markel A.L. Genetics and pathophysiology of low-renin arterial hypertension. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1000-1008. DOI 10.18699/VJ18.443 (in Russian)

В большинстве обзорных публикаций, посвященных гипертонической болезни, можно встретить сформулированное с разной степенью категоричности, но неизменное по своей сути утверждение о том, что этиология гипертонической болезни (эссенциальной гипертонии) до сих пор остается нераскрытой. В лучшем случае приводятся сведения о многофакторном происхождении заболевания с последующим более или менее полным перечислением этих факторов. Например, в книге «Гипертония» (Hypertension. Eds. E.L. Schiffrin, R.M. Touyz. London: Future Medicine Ltd, 2013) перечисляются следующие факторы: генетическая предрасположенность (семейная история), образование, социоэкономический статус, избыточный вес и ожирение, обструктивное апноэ во сне, малоактивный образ жизни, курение, психоэмоциональный стресс, диабет, болезни почек, диета, богатая жирами и солью, и с низким содержанием калия, алкоголь. Вероятно, список можно продолжить, но это не проясняет вопроса об этиологии гипертонической болезни, в связи с чем далее авторы пишут, что очень трудно оценить причинную роль каждого из этих факторов в происхождении болезни у конкретного пациента: «The etiology of long-standing hypertension is generally multifactorial and very poorly appreciated in the individual patient» (p. 209). Таким образом, исходная причина гипертонической болезни остается неопределенной.

Между тем вторичные гипертензивные состояния, в отличие от первичной эссенциальной гипертонии, характеризуются тем, что для каждого больного с диагнозом «вторичная артериальная гипертония» можно установить конкретную причину болезни, что в ряде случаев делает возможным проведение целевой и радикальной терапии. Например, ликвидация стеноза почечной артерии может привести к полному излечению от гипертонии. Число случаев вторичной артериальной гипертонии оценивается разными авторами неодинаково. Если еще не так давно частота вторичных форм гипертонии приводилась в пределах 1–5 % от общего числа больных гипертонической болезнью (Freel, Connell, 2004), то в последнее время эта оценка приблизилась к 10 %, причем у молодых пациентов в возрасте от 18 до 40 лет процент выявляемых вторичных гипертензий повышается до 30 (Jacovic et al., 2016; Charles et al., 2017). Это увеличение связано, скорее всего, с тем, что раннее развитие артериальной гипертонии зачастую обусловлено наличием генов с сильным влиянием, которые при современном развитии техники секвенирования и анализа генома можно установить с высокой достоверностью и, таким образом, перевести болезнь из разряда эссенциальной гипертонии с неизвестной этиологией в группу заболеваний с четко установленной причиной, т. е. в разряд вторичных гипертензий. Увеличение же процента вторичных гипертензий с 1–5 до 10 % в общей популяции больных гипертонической болезнью обусловлено более изощренной диагностикой с привлечением современных методов молекулярной биологии и генетики. Интересно, что значительная часть вновь выявляемых случаев вторичных гипертензий происходит из пула так называемой низкорениновой гипертонии, которая считается разновидностью эссенциальной гипертонии. Описанию этих случаев и природы самой низкорениновой гипертонии посвящен этот обзор.

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система и артериальная гипертония

Рениновая система. Ренин – это фермент, поступающий в системную циркуляцию из почек. Он синтезируется клетками юкстагломерулярного (околоклубочкового) аппарата почки в ответ на снижение перфузионного давления в приносящих артериолах почечных клубочков и/или в ответ на усиление симпатической стимуляции, а также при уменьшении концентраций Na^+ и Cl^- в районе клеток «плотного пятна» (macula densa), входящего в состав юкстагломерулярного аппарата. Субстратом ренина является белок ангиотензиноген, синтезируемый в печени, от которого отрезается декапептид – ангиотензин-I, который, в свою очередь, выступает в качестве предшественника октапептида – ангиотензина-II, образующегося при участии ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) благодаря отщеплению двух С-концевых аминокислот. Ангиотензин-II обладает широким спектром физиологических эффектов, в том числе является мощным вазоконстриктором и стимулятором секреции альдостерона корой надпочечника, обеспечивая задержку натрия и воды и выведение калия почкой. Таким образом, ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) – один из основных механизмов регуляции водно-солевого баланса и артериального давления, причем наряду с внешними регуляторными влияниями (симпатическая нервная система) РААС имеет автономную регуляцию: ренин стимулирует секрецию альдостерона, а альдостерон благодаря задержке натрия и воды угнетает секрецию ренина (отрицательная обратная связь).

Низкорениновая артериальная гипертония

Повышение секреции ренина естественным образом ассоциируется с увеличением продукции альдостерона и

повышением артериального давления (АД). Тем не менее уже давно было замечено присутствие среди больных гипертонической болезнью пациентов с высоким АД и пониженным уровнем ренина, т. е. с так называемой низкорениновой гипертонией (Channick et al., 1969; Jose et al., 1970), частота которой среди больных гипертонической болезнью в разных популяциях колеблется от 25 до 30 % (Sagnella, 2001; Mulatero et al., 2007). Естественно было бы считать, что повышение АД в случаях низкорениновой гипертонии связано с усилением секреции альдостерона, который по механизму отрицательной обратной связи угнетает биосинтез ренина. Это предположение в свое время нашло подтверждение в работах эндокринолога из Мичиганского университета (г. Анн-Арбор) Дж. Кона (Conn, 1960), который описал гипертензивное состояние, сочетающееся с повышением концентрации альдостерона и понижением уровня ренина в плазме крови, получившее название синдром первичного гиперальдостеронизма, или синдром Кона. В случае, описанном Дж. Коном, повышение секреции альдостерона было обусловлено наличием секретирующей альдостерон аденомы коры надпочечника, при этом альдостерон-секретирующая система перестает подчиняться регуляторным влияниям и продолжает усиленно функционировать, несмотря на подавление секреции основного ее стимулятора – ренина. Таким образом, впервые из разряда эссенциальной гипертонии больной был переведен в статус вторичной гипертонии с известной причиной заболевания, которую с помощью односторонней адреналэктомии удалось устранить и полностью вылечить больного.

Первичный альдостеронизм и соотношение альдостерон/ренин

Исторически первичный альдостеронизм рассматривался в качестве редко встречающейся причины артериальной гипертонии (Kaplan, 1967; Calhoun, 2006). Однако исследования последних лет показали, что определенные биохимические критерии наличия первичного альдостеронизма обнаруживаются у 10–15 % больных гипертонической болезнью. У пациентов с резистентной формой гипертонической болезни первичный альдостеронизм регистрируется еще чаще – около 20 % случаев. Наличие первичного альдостеронизма при резистентной форме гипертонической болезни подтверждается эффективностью антиальдостероновой терапии, которая оправдывает себя даже при отсутствии явного увеличения концентраций альдостерона в плазме или моче. В связи с этим для выявления первичного альдостеронизма помимо измерения концентраций альдостерона в плазме крови стали использоваться некоторые динамические тесты, призванные доказать наличие и автономность гиперсекреции альдостерона. Оказалось, что выраженность отклонений в концентрациях ренина и альдостерона необходимо оценивать не только по абсолютному их количеству, но и по соотношению альдостерон/ренин (Funder et al., 2016; Monticone et al., 2018b). Величина этого коэффициента, на основании которого можно с определенной уверенностью говорить о возможном наличии у пациента альдостеронизма, к сожалению, четко не определена, тем не менее считается, что она должна превышать 30, если уровень ренина оценивается по его способности синтезировать ангиотензин-I (ng/ml/h), и этот коэффициент должен быть выше 3.7, если измеряется не активность, а концентрация ренина в плазме (mU/L). Уровень альдостерона, как обычно, измеряется по его концентрации в плазме (ng/dL). К сожалению, этот простой тест не является строго специфичным, и наличие альдостеронизма должно подтверждаться путем проведения дополнительных исследований на возможность подавления уровня альдостерона с помощью таких процедур, как введение обладающего высокой минералокортикоидной активностью флудрокортизона, а также путем солевой нагрузки или блокады ангиотензин-конвертирующего фермента каптоприлом (Mulatero et al., 2006; Vilela, Almeida, 2017; Song et al., 2018). В норме эти воздействия должны подавлять секрецию альдостерона. В случае отсутствия реакции альдостерона на регулирующие и подавляющие его секрецию стимулы окончательная верификация диагноза и установление типа первичного альдостеронизма производятся на основании данных компьютерной томографии и при необходимости с использованием двухсторонней катетеризации надпочечниковых вен для получения образцов оттекающей от надпочечников крови с определением в ней концентраций секретируемых гормонов (Monticone et al., 2015b; Williams et al., 2017). При выявлении односторонней альдостерон-продуцирующей аденомы возможно применение хирургического лечения, если же имеется двухсторонняя гипертрофия надпочечников, используют лекарственную терапию.

Итак, первичный альдостеронизм характеризуется автономной гиперпродукцией альдостерона одним или обоими надпочечниками. Биохимическими признаками, как уже говорилось, являются подавление секреции ренина, повышенный или нормальный уровень альдостерона (но с повышением коэффициента альдостерон/ренин) и гипокалиемия, которая отмечается у 9–37 % больных с первичным альдостеронизмом (Funder et al., 2016; Monticone et al., 2017a). В настоящее время с применением современных методов диагностики установлено, что первичный альдостеронизм в той или иной форме присутствует у 6 % больных гипертонической болезнью (Monticone et al., 2017a), что в разы превышает частоту этого заболевания, по оценкам, даваемым два-три десятилетия назад. Надо иметь в виду, что больные-гипертоники с первичным альдостеронизмом, по сравнению с больными эссенциальной гипертонией, характеризуются значительным повышением риска таких осложнений, как цереброваскулярные нарушения, инфаркт миокарда, метаболический синдром и сахарный диабет (Mulatero et al., 2013; Monticone et al., 2018a). Вот почему ранняя диагностика этого состояния очень важна, тем более что известны методы специфической эффективной терапии, например блокады альдостероновых рецепторов или хирургического удаления аденомы коры надпочечника.

Спорадический первичный гиперальдостеронизм

Первичный альдостеронизм бывает наследственным и приобретенным (спорадический). Хотя спорадический альдостеронизм относится к ненаследственным заболева-

ниям, развитие современных технологий секвенирования ДНК позволило установить связь появления альдостеронсекретирующей аденомы с возникновением соматических мутаций определенных генов. Речь идет о четырех генах: *KCNJ5* – ген потенциал-зависимого калиевого канала подсемейства J5; *ATP1A1* – ген транспортной субъединицы альфа-1 Na^+/K^+-АТФазы; *ATP2B3* – ген кальций-транспортирующей АТФазы-3 и *CACNA1D* – ген альфа-1D субъединицы потенциал-зависимого кальциевого канала. Соматические мутации этих генов встречаются примерно в 60 % случаев спорадически возникающего первичного альдостеронизма (Choi et al., 2011; Azizan et al., 2013; Scholl et al., 2013; Fernandes-Rosa et al., 2014). Общий важный молекулярный эффект этих мутаций – активация внутриклеточных кальций-зависимых сигнальных путей (Monticone et al., 2015a), что стимулирует продукцию альдостерона клетками коры надпочечника. Наличие мутации гена *KCNJ5* в репродуктивных клетках приводит к развитию наследственной формы первичного альдостеронизма. Таким образом, мутация гена *KCNJ* может быть причиной как наследственной, так и вновь возникшей (приобретенной) формы первичного альдостеронизма, при которой имеет место пролиферация клеток клубочковой зоны надпочечников. В результате повышенная секреция альдостерона становится конститутивной (Gianmichele et al., 2014). Имеется описание двух пациентов с соматической мутацией гена *KCNJ*, у которых отмечено отсутствие явных признаков гиперальдостеронизма, но была повышена реакция альдостерона на адренокортикотропный гормон (АКТГ) (Markou et al., 2015). Еще у 3 % больных со спорадическим первичным альдостеронизмом найдена соматическая мутация гена *CTNNB1*, кодирующего бета-катенин (Wang et al., 2017). Эта мутация также отвечает за возникновение альдостерон-продуцирующей опухоли коры надпочечника (Scholl et al., 2015a; Åkerström et al., 2016).

Наследственный (семейный) гиперальдостеронизм

Все наследственные формы первичного альдостеронизма составляют, по разным сведениям, от 1 до 6 % от всех случаев данной патологии. Ясно, что это довольно редкие синдромы, но их выявление имеет принципиальное значение для здоровья больных-гипертоников, так как дает хороший шанс для проведения эффективной целевой терапии.

Всего обнаружено пять наследственных форм первичного альдостеронизма. Наиболее часто встречающийся синдром имеет замысловатое название: альдостеронизм, излечиваемый глюкокортикоидами (glucocorticoid-remediable aldosteronism). Он был описан в 1960-е годы (Sutherland et al., 1966; Salti et al., 1969) и в настоящее время фигурирует под аббревиатурой FH-1 (Familial Hypertension I). Генетическая причина заболевания была раскрыта в 1992 г. и связана с образованием химерного гена, состоящего из промоторной части гена *CYP11B1*, гена фермента биосинтеза глюкокортикоида кортизола и кодирующего района гена *CYP11B2* – альдостеронсинтазы. В результате синтез альдостерона может стимулироваться АКТГ, который в норме должен индуцировать синтез глюкокортикоида кортизола. Так как кортизол в силу отрицательной обратной связи способен подавлять секрецию АКТГ, введение экзогенных глюкокортикоидов (обычно используют синтетический гормон дексаметазон) подавляет секрецию АКТГ и прекращает стимуляцию синтеза альдостерона, т. е. эта форма наследственного альдостеронизма излечивается путем назначения таблеток дексаметазона. Возможность образования химерного гена связана с тем, что гены *CYP11B1* и *CYP11B2* характеризуются большой степенью гомологии и расположены тандемно (8q24). Точная диагностика синдрома с помощью полимеразной цепной реакции и возможность полного излечения от такого рода гипертонии дают нам блестящий пример эффективной и прецизионной диагностики и терапии гипертензивного состояния, входящего в пул низкорениновых гипертоний (MacConnachie et al., 1998). Правда, надо учитывать, что частота этого синдрома не превышает 1 % от общего числа больных первичным альдостеронизмом.

Генетическая база второй формы наследственного гиперальдостеронизма (FH-II) исследована недавно (Scholl et al., 2018). Этот синдром не чувствителен к введению глюкокортикоидов и клинически трудно отличим от спорадической формы. Его связывают с мутацией гена *CLCN2* (Chr. 3Q27.1 Arg172Gln), кодирующего хлоридный канал CIC-2, который экспрессируется наряду с другими тканями в клубочковой зоне коры надпочечника (Fernandes-Rosa et al., 2018; Scholl et al., 2018). Мутация наследуется по аутосомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью. Наличие этой мутации приводит к деполяризации мембраны клеток клубочковой зоны коры надпочечника и индукции экспрессии гена альдостеронсинтазы – *CYP11B2*. Для лечения используются блокаторы минералокортикоидных рецепторов.

Третья форма наследственного альдостеронизма (FH-III) обусловлена мутацией уже упомянутого выше гена *KCNJ5* (Chr. 11q24.3), кодирующего структуру калиевого канала GIRK4 (G-белок-связанные калиевые каналы внутреннего выпрямления) (Geller et al., 2008; Choi et al., 2011). Обнаружены как минимум две мутации этого гена. Если соматические мутации гена *KCNJ5* в клетках коры надпочечника приводят к развитию аденомы, то при наследственной форме, когда эта мутация имеется в генеративных клетках, происходит массивная гипертрофия обоих надпочечников, развивается наследственная форма первичного альдостеронизма. Нарушение функции канала GIRK4 приводит к избыточному поступлению Na^+ и Ca^{++} в клетку и деполяризации мембраны, что служит сигналом для синтеза альдостерона и пролиферации. К настоящему времени удалось выявить 12 семей с мутациями гена *KCNJ5*. У носителей этой мутации зачастую развивается весьма тяжелая и ранняя форма артериальной гипертензии. Так, в одной семье была зафиксирована выраженная гипертензия с альдостеронизмом у девочек четырех и семи лет. Это требует в случае недостаточного эффекта от лечения антагонистами минералокортикоидных рецепторов проведения двусторонней адреналэктомии (Monticone et al., 2017b) с последующей пожизненной гормональной заместительной терапией. По рекомендации Международной ассоциации эндокринологов, необходимо проведение таргетного секвенирования гена *KCNJ5* у всех пациентов

молодого возраста с выраженной гипертонией, что поможет вовремя назначить адекватную причине терапию и избежать серьезных осложнений (Funder et al., 2016).

Четвертая форма наследственного альдостеронизма (FH-IV) связана с мутациями гена *CACNA1H* (Chr. 16p13.3), кодирующего кальциевый канал Т-типа Cav3.2. Обнаружены две мутации этого гена, которые характеризуются аутосомным доминантным наследованием с неполной пенетрантностью (Scholl et al., 2015b). Больные отличаются развитием гипертензии в раннем возрасте, но симптомы очень вариабельны. Успешно лечится антагонистами альдостероновых рецепторов.

Пятый синдром наследственного альдостеронизма наряду с повышением артериального давления и альдостерона характеризуется рядом нейрологических симптомов (Azizan et al., 2013; Scholl et al., 2013). Он проявляется уже в раннем детстве и наряду со значительным повышением АД и гипокалемией могут наблюдаться судороги и параличи. Идентифицированы две мутации (I770M и G403D) гена *CACNA1D* (3p14.3), кодирующего альфа-субъединицу потенциал-зависимого кальциевого канала L-типа. Мутации обусловливают усиление поступления ионов кальция в клетку и стимуляцию секреции альдостерона. В настоящее время ведется наблюдение за двумя детьми, имеющими статус наследственного альдостеронизма, обусловленного мутациями гена *CACNA1D*. У девочки, которой исполнилось три года, артериальное давление удалось снизить с помощью амлодипина (блокатор кальциевых каналов), однако у нее отмечаются прогрессирование неврологических сиптомов и задержка развития. У второй девочки (к моменту обследования ей исполнилось девять лет) развитие идет сравнительно благополучно (Scholl et al., 2013). Как видно на этих примерах, такая форма наследственного первичного альдостеронизма протекает более тяжело и плохо поддается коррекции.

Наследственная низкорениновая гипертония без увеличения секреции альдостерона, но с усилением функции его эффекторных звеньев

Синдром Лиддля. Один из вариантов моногенной низкорениновой гипертонии – синдром Лиддля (Liddle et al., 1963), который наследуется по аутосомно-доминантному типу (Mulatero et al., 2007). Он получил характерное название – псевдоальдостеронизм, так как симптомы истинного альдостеронизма, в частности раннее развитие гипертонии, сниженные концентрации ренина и калия в плазме присутствуют, а повышения альдостерона нет. Причина синдрома Лиддля – мутации генов *SCNN1A*, *SCNN1B* и *SCNN1G*, кодирующих альфа-, бета- и гамма-субъединицы эпителиального натриевого канала ENaC. Этот канал экспрессируется в клетках дистального нефрона почек и в эпителии некоторых других органов, и его функцией является реабсорбция ионов натрия, за которым следует и вода. Таким образом, ENaC участвует в регуляции водно-солевого баланса и артериального давления. Экспрессия ENaC индуцируется альдостероном и антидиуретическим гормоном (Hanukoglu I., Hanukoglu A., 2016). В настоящее время идентифицировано три десятка мутаций генов ENaC, часть из которых ответственны за развитие синдрома Лиддля, так как они усиливают процесс реабсорбции натрия почкой, в результате чего увеличивается объем циркулирующей крови и повышается АД, что по механизму отрицательной обратной связи угнетает секрецию ренина и альдостерона. Следовательно, такое конститутивное усиление функции ENaC позволяет осуществляться альдостероновому эффекту, несмотря на снижение секреции самого альдостерона. Частота этого синдрома и его выраженность варьируют в разных популяционных выборках. Так, в двух исследованных популяциях больных гипертонической болезнью частоты синдрома Лиддля составили 1.52 и 0.91 % (Wang et al., 2015; Liu et al., 2018). Успешная терапия больных достигается назначением блокаторов каналов ENaC с помощью амилорида или триамтерена и низкосолевой диеты (Tetti et al., 2018).

Синдром недостаточности фермента 11-бета-гидроксистероид дегидрогеназы второго типа. Следующий вариант моногенной формы низкорениновой гипертонии, которая также «маскируется» под гиперальдостеронизм, хотя никакого увеличения секреции альдостерона не наблюдается, связан с мутацией гена *HSD11B2*, кодирующего соответствующий фермент, 11-бета-гидроксистероид дегидрогеназу второго типа – HSD11B2. Этот фермент выполняет очень важную функцию. Он защищает минералокортикоидные рецепторы от избыточной стимуляции глюкокортикоидом кортизолом, переводя его в неактивную форму – кортизон (New et al., 2005). Дело в том, что альдостерона в крови на два-три порядка меньше, чем кортизола, а сродство к минералокортикоидным рецепторам у кортизола и альдостерона практически одинаково. Поэтому для осуществления специфической альдостероновой регуляции в органах-мишенях кортизол должен быть инактивирован ферментом HSD11B2. Если же какая-либо мутация нарушает функцию этого фермента, организм находится в состоянии перманентной активации минералокортикоидных рецепторов без участия в этом процессе альдостерона. В связи с этим данный синдром получил наименование «кажущийся избыток минералокортикоидов» (apparent mineralocorticoid excess, AME). Это редкое аутосомно-рецессивное заболевание обычно протекает в форме тяжелой низкорениновой гипертонии и при отсутствии адекватного лечения приводит к фатальному исходу, хотя в некоторых случаях болезнь протекает в более мягкой форме. К настоящему времени обнаружено около 40 мутаций гена *HSD11B2*, которые могут приводить к формированию заболевания (Yau et al., 2017). Пациенты с выраженной симптоматикой имеют малый вес при рождении, артериальную гипертонию, полиурию и полидипсию, низкий уровень как ренина, так и альдостерона. Однако в более легком варианте симптоматика сглажена, и болезнь практически неотличима от обычной эссенциальной гипертонии (Wilson et al., 1998). В качестве хорошего диагностического критерия рекомендуется оценивать величину соотношения кортизол/кортизон (Carvajal et al., 2018). У детей это соотношение должно колебаться в пределах 2.21–3.69, а у взрослых – 3.70–4.90. У двух пациентов с AME этот коэффициент составлял в одном случае 28.8, в другом – 175. В первом случае имелась мутация D223N гена *HSD11B2*, которая

присутствовала в гетерозиготном состоянии у матери и сестры больного с коэффициентами кортизол/кортизон 13.2 и 6.0 соответственно. У второго пациента мутация гена *HSD11B2* (R213C) в гетерозиготном состоянии была обнаружена у его родителей. Фенотип родителей был нормальным, хотя коэффициент кортизол/кортизон у них был повышен. Лечение синдрома может быть успешным при применении антагонистов минералокортикоидных рецепторов (спиронолактон) и дексаметазона, который снижает секрецию АКТГ и, следовательно, кортизола (Mulatero et al., 2007). В то же время дексаметазон не имеет сродства к минералокортикоидным рецепторам.

Синдром Гордона (псевдогипоальдостеронизм второго типа). Синдром описан врачом из Австралии Р. Гордоном (Gordon, 1986). Хотя при этом заболевании развивается низкорениновая гипертония, по своим механизмам и симптоматике синдром выбивается из ряда патологий, описанных выше. Прежде всего, это нормальный или сниженный уровень альдостерона в комплексе с гиперкалиемией, которая не характерна для низкорениновых гипертоний, для них свойственна гипокалиемия (Mulatero et al., 2007). Псевдогипоальдостеронизм второго типа (PHA2) связан с нарушением натриевого и калиевого баланса. Наряду с этим имеются гиперкалиемия, гиперхлоремия, ацидоз, сниженный уровень ренина и гипертензия. Возраст начала заболевания варьирует: иногда это детский и юношеский возраст, но в ряде случаев болезнь развивается у взрослых людей. Частота заболевания – примерно 1 : 100 000. Синдром может быть обусловлен мутациями четырех генов: *WNK1* (Chr. 12p12.3), *WNK4* (Chr. 17q21.2), *CUL3* (Chr. 2q36.2) и *KLHL3* (Chr. 5q31.2) (Wilson et al., 2001; Boyden et al., 2012; Louis-Dit-Picard et al., 2012). Фермент WNK (With No Lysine Kinase) кодируется генами *WNK1* и *WNK4* и участвует в контроле натрия и калия, регулируя функцию Na^+/Cl^- котранспортера (NCC) в дистальном нефроне. В результате усиливается функция канала NCC и уменьшается экспрессия калиевого канала – ROMK (renal outer medullary K^+ channel). Это приводит к повышению содержания натрия и калия в организме и развитию гипертензии. Белки, кодируемые генами *CUL3* (Cullin-3) и *KLHL3* (Kelch-3), в свою очередь, контролируют работу генов *WNK1* и *WNK4*. Эти два вспомогательных белка образуют комплекс, E3-убиквитин лигазу, которая обеспечивает деградацию «лишних» WNK-киназ. Для терапии этого синдрома используются тиазидные диуретики, которые специфически ингибируют NCC котранспортер.

Мутация минералокортикоидного рецептора (MR), активирующая его функцию. Это чрезвычайно редкое заболевание с аутосомно-доминантным наследованием (Geller et al., 2000). Мутация гена минералокортикоидного рецептора *NR3C2* (Ser810Leu) приводит к тому, что его агонистами становятся такие стероиды, как прогестерон, кортизон и дегидрокортикостерон. Участие прогестерона в стимуляции MR служит причиной того, что беременность может выступать в качестве провокатора артериальной гипертонии, а кортизон и дегидрокортизон обусловливают также формирование гипертонии как у мужчин, так и у небеременных женщин (Rafestin-Oblin et al., 2003). Развивается низкорениновая форма артериальной гипертонии с выраженной гипокалиемией, но с пониженным уровнем секреции альдостерона, так как повышенная реабсорбция натрия почкой подавляет секрецию как ренина, так и альдостерона. Мутация рецептора также является причиной того, что фармакологический антагонист минералокортикоидного рецептора – спиронолактон (альдактон) – становится агонистом (!) и поэтому использование его для терапии данной патологии противопоказано. Лечение рекомендуется проводить с помощью блокатора эпителиальных натриевых каналов – амилорида.

Низкорениновая гипертония неизвестной этиологии (эссенциальная низкорениновая гипертония)

Конечно, все вышеперечисленные наследственные олигогенные синдромы низкорениновой артериальной гипертонии встречаются редко. В противоположность им, самую большую часть составляют случаи низкорениновой гипертонии неустановленной этиологии. Это так называемая эссенциальная низкорениновая гипертония, которая составляет примерно 80 % от общего пула низкорениновых гипертензий. Причинами эссенциальной низкорениновой гипертонии могут быть такие факторы, как повышенное содержание соли в диете, прием некоторых фармацевтических препаратов, например таких, как блокаторы адренорецепторов, нестероидные противовоспалительные лекарства, ингибиторы циклооксигеназы-2, а также некоторые препараты центрального действия – клонидин, альфа-метилдофа, которые могут угнетать синтез ренина почкой (Mulatero et al., 2002, 2007). Однако все эти факторы не действуют в качестве абсолютных причин, для того чтобы сформировалась низкорениновая артериальная гипертония, внешние воздействия должны попасть на подготовленную почву, – должна быть соответствующая генетическая предрасположенность. Типичным примером можно назвать соль-чувствительную артериальную гипертонию. В этих случаях мы сталкиваемся с неопределенностью в большей степени, чем при моно- или олигогенных патологиях, так как наряду с генетическими факторами в неменьшей степени играют роль факторы среды, такие как (в нашем примере) повышенное потребление соли. Имеет значение этническая принадлежность (у афроамериканцев чувствительность к соли выше), возраст, уровень АД, наличие коморбидных патологий – болезней почек, сахарного диабета, метаболического синдрома (Weinberger, 1996; Elijovich et al., 2016). Что касается генетической базы повышенной солевой чувствительности, то, согласно многочисленным исследованиям, имеет место типичная полигенная система. Наличие полигенной детерминации повышенной чувствительности к соли подтверждается как экспериментальными данными, полученными на линиях крыс с соль-чувствительной артериальной гипертонией (Dahl et al., 1962; Rapp, Dene, 1985; Yagil et al., 1996), так и результатами обширных клинических наблюдений (Mishra et al., 2018). Следовательно, в детерминацию такого сложного признака делают вклад не только взаимодействия генотипа со средой, но и межгенные взаимодействия, которые далеко не всегда характеризуются аддитивностью. В этом заключается основное препятствие для установления ко-

нечных причин такой полигенной патологии, как гипертоническая болезнь. Один из возможных выходов видится в выделении из общего пула больных с артериальной гипертонией групп пациентов со сходной картиной протекания как самого заболевания, так и биохимических и молекулярно-генетических признаков и маркеров, что может привести к обособлению некоего самостоятельного синдрома с артериальной гипертензией и единой генетико-физиологической причиной его формирования. Если же говорить конкретно об эссенциальной форме низкорениновой гипертонии, то одним из кандидатов на получение статуса самостоятельного синдрома может быть повышенная реакция альдостерона и артериального давления на стрессовую стимуляцию и АКТГ. Так, в работе (Markou et al., 2015) было отмечено, что у 30 из 113 больных без диагноза «первичный альдостеронизм» отмечено значительное усиление секреции альдостерона в ответ на введение АКТГ с увеличением коэффициента альдостерон/ренин. Как правило, повышалась суточная экскреция калия и отмечался положительный эффект от лечения блокаторами минералокортикоидных рецепторов. К этому можно присовокупить наши собственные наблюдения, полученные при исследовании крыс линии НИСАГ (ISIAH) со стресс-чувствительной артериальной гипертензией (Antonov et al., 2016). У этих крыс наряду с низкорениновым статусом отмечено значительное усиление реакции альдостерона на стресс и введение АКТГ. Причины отмеченной гиперреакции альдостерона пока не выяснены. Однако наличие экспериментальной модели, каковой является инбредная линия крыс НИСАГ, дает надежду на идентификацию соответствующей генетической системы и выделение отдельного гипотетического синдрома, который условно можно назвать «стресс-чувствительная низкорениновая гипертония» и, возможно, удастся экстраполировать на некоторые группы больных гипертонической болезнью.

Заключение

Хотелось бы отметить, что на протяжении многих лет исследователи гипертонической болезни предпринимают попытки выделить из общего пула чрезвычайно гетерогенных по своим проявлениям гипертензивных состояний, собранных под единым наименованием – гипертоническая болезнь, или эссенциальная гипертония, некоторые категории больных, объединенных по своей генетике и патофизиологии (как выразился Е. Баратынский, «с лица необщим выраженьем»). Такая структуризация гипертонической болезни дает возможность в выделенных группах больных выявить конечные причины разных форм ее проявления. Характерной обособленной группой, рассмотрению которой посвящен настоящий обзор, являются больные с низкорениновой формой артериальной гипертонии. Далее можно видеть, что в попытке понять существо этой формы было обращено внимание на альдостерон как один из наиболее эффективных факторов подавления ренина, с одной стороны, и формирования гипертензивного статуса – с другой (Griffing et al., 1990). По мере углубления в механизмы участия альдостерона в патогенезе низкорениновой гипертонии были установлены основные генетико-физиологические звенья развития разных форм или синдромов низкорениновой артериальной гипертонии. Альдостерон в этом процессе выступает в качестве основного связующего звена или промежуточного фенотипа (intermediate phenotype) между гипертензией и различными приводящими к ее развитию генетико-физиологическими структурами (Freel, Connell, 2004). Анализ форм и проявлений низкорениновой артериальной гипертонии дает нам блестящий пример, каким образом можно расширить пул гипертензивных состояний с известной этиологией и постепенно двигаться по пути раскрытия множественных и разнообразных, но пока во многом непонятных причин, лежащих в основе эссенциальной гипертонической болезни.

Acknowledgements

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-04-00763, and State Budgeted Project 0324-2018-0016.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

Список литературы / References

Åkerström T., Maharjan R., Willenberg H.S., Cupisti K., Ip J., Moser A., Stålberg P., Robinson B., Iwen K.A., Dralle H., Walz M.K., Lehnert H., Sidhu S., Gomez-Sanchez C., Hellman P., Björklund P. Activating mutations in *CTNNB1* in aldosterone producing adenomas. Sci. Rep. 2016;6:19546. DOI 10.1161/01.HYP.8.2.93.

Antonov Y.V., Alexandrovich Y.V., Redina O.E., Gilinsky M.A., Markel A.L. Stress and hypertensive disease: adrenals as a link. Experimental study on hypertensive ISIAH rat strain. Clin. Exp. Hypertens. 2016;38(5):415-423. DOI 10.3109/10641963.2015.1116546.

Azizan E.A.B., Poulsen H., Tuluc P., Zhou J., Clausen M.V., Lieb A., Maniero C., Garg S., Bochukova E.G., Zhao W., Shaikh L.H., Brighton C.A., Teo A.E.D., Davenport A.P., Dekkers T., Tops B., Küsters B., Ceral J., Yeo G.S.H., Neogi S.G., McFarlane I., Rosenfeld N., Marass F., Hadfield J., Margas W., Chaggar K., Solar M., Deinum J., Dolphin A.C., Farooqi I.S., Striessnig J., Nissen P., Brown M.J. Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. Nat. Genet. 2013;45: 1055-1060. DOI 10.1038/ng.2716.

Boyden L.M., Choi M., Choate K.A., Nelson-Williams C.J., Farhi A., Toka H.R., Tikhonova I.R., Bjornson R., Mane S.M., Colussi G., Lebel M., Gordon R.D., Semmekrot B.A., Poujol A., Välimäki M.J., De Ferrari M.E., Sanjad S.A., Gutkin M., Karet F.E., Tucci J.R., Stockigt J.R., Keppler-Noreuil K.M., Porter C.C., Anand S.K., Whiteford M.L., Davis I.D., Dewar S.B., Bettinelli A., Fadrowski J.J., Belsha C.W., Hunley T.E., Nelson R.D., Trachtman H., Cole T.R.P., Pinsk M., Bockenhauer D., Shenoy M., Vaidyanathan P., Foreman J.W., Rasoulpour M., Thameem F., Al-Shahrouri H.Z., Radhakrishnan J., Gharavi A.G., Goilav B., Lifton R.P. Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. Nature. 2012;482:98-102. DOI 10.1038/nature10814.

Calhoun D.A. Aldosteronism and hypertension. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2006;1:1039-1045. DOI 10.2215/CJN.01060306.

Carvajal C.A., Tapia-Castillo A., Valdivia C.P., Allende F., Solari S., Lagos C.F., Campino C., Martinez-Aguayo A., Vecchiola A., Pinochet C., Godoy C., Iturrieta V., Baudrand R., Fardella C.E. Serum cortisol and cortisone as potential biomarkers of partial 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency. Am. J. Hypertens. 2018;31(8):910-918. Downloaded from https://academic.oup.com/ajh/advance-article-abstract/DOI/10.1093/ajh/hpy051/ 4956699 by University of California, Santa Barbara user on 27 June 2018.

Channick B.J., Adlin E.V., Marks A.D. Suppressed plasma renin activity in hypertension. Arch. Intern. Med. 1969;123:131-140. DOI 10.1001/archinte.1969.00300120019003.

Charles L., Triscott J., Dobbs B. Secondary hypertension: discovering the underlying cause. Am. Fam. Physician. 2017;96(7):453-461.

Choi M., Scholl U.I., Yue P., Björklund P., Zhao B., Nelson-Williams C., Ji W., Cho Y., Patel A., Men C.J., Lolis E., Wisgerhof M.V., Geller D.S., Mane S., Hellman P., Westin G., Åkerström G., Wang W., Carling T., Lifton R.P. K^+ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. Science. 2011;331(6018):768-772. DOI 10.1126/science.1198785.

Conn J.W. Evolution of primary aldosteronism as a highly specific clinical entity. J. Am. Med. Assoc. 1960;172:1650-1653. DOI 10.1001/jama.1960.63020150008016.

Dahl L.K., Heine M., Tassinari L. Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. Nature. 1962;194:480-482. DOI 10.1038/194480b0.

Elijovich F., Weinberger M.H., Anderson C.A.M., Appel L.J., Bursztyn M., Cook N.R., Dart R.A., Newton-Cheh C.H., Sacks F.M., Laffer C.L. On behalf of the American Heart Association Professional and Public Education Committee of the Council on Hypertension; Council on Genomic and Precision Medicine; and Stroke Council. Salt sensitivity of blood pressure: a scientific statement from the American Heart Association. [published online ahead of print July 21, 2016]. Hypertension. DOI 10.1161/HYP.0000000000000047.

Fernandes-Rosa F.L., Daniil G., Orozco I.J., Göppner C., El Zein R., Jain V., Boulkroun S., Jeunemaitre X., Amar L., Lefebvre H., Schwarzmayr T., Strom T.M., Jentsch T.J., Zennaro M.-C. A gain-of-function mutation in the CLCN2 chloride channel gene causes primary aldosteronism. Nat. Genet. 2018;50:355-361. DOI 10.1038/s41588-018-0053-8.

Fernandes-Rosa F.L., Williams T.A., Riester A., Steichen O., Beuschlein F., Boulkroun S., Strom T.M., Monticone S., Amar L., Meatchi T., Mantero F., Cicala M.-V., Quinkler M., Fallo F., Allolio B., Bernini G., Maccario M., Giacchetti G., Jeunemaitre X., Mulatero P., Reincke M., Zennaro M.-C. Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. Hypertension. 2014;64:354-361. DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03419.

Freel E.M., Connell J.M.C. Mechanisms of hypertension: the expanding role of aldosterone. J. Am. Soc. Nephrol. 2004;15(8):1993-2001. DOI 10.1097/01.ASN.0000132473.50966.14.

Funder J.W., Carey R.M., Mantero F., Murad M.H., Reincke M., Shibata H., Stowasser M., Young W.F. The management of primary aldosteronism: case detection, diagnosis, and treatment: an endocrine society clinical practice guideline. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2016;101:1889-1916. DOI 10.1210/jc.2015-4061.

Geller D.S., Farhi A., Pinkerton N., Fradley M., Moritz M., Spitzer A., Meinke G., Tsai F.T., Sigler P.B., Lifton R.P. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. Science. 2000;289:119-123. DOI 10.1126/science.289.5476.119.

Geller D.S., Zhang J., Wisgerhof M.V., Shackleton C., Kashgarian M., Lifton R.P. A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2008;93:3117-3123. DOI 10.1210/jc.2008-0594.

Gianmichele G., O'Shaughenessy K., Murthy M. Role for germline mutations and a rare coding single nucleotide polymorphism within the KCNJ5 potassium channel in a large cohort of sporadic cases of primary aldosteronism. Hypertension. 2014;63:783-789. DOI 10.1016/j.clinthera.2014.05.058.

Gordon R.D. Syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate. Hypertension. 1986;8(2):93-102. DOI 10.1161/01.HYP.8.2.93.

Griffing G.T., Wilson T.E., Melby J.C. Alterations in aldosterone secretion and metabolism in low renin hypertension. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1990;71:1454-1460. DOI 10.1210/jcem-71-6-1454.

Hanukoglu I., Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. Gene. 2016;579:95-132. DOI 10.1016/j.gene.2015.12.061.

Hypertension. Eds. E.L. Schiffrin, R.M. Touyz. London: Future Medicine, 2013.

Jacovic S., Zivkovic-Radojevic M., Petrovic D. Secondary hypertension: differential diagnosis and basic principles of treatment. Ser. J. Exp. Clin. Res. 2016;17(4):349-356. DOI 10.1515/SJECR_2015_0056.

Jose A., Crout J.R., Kaplan N.M. Suppressed plasma renin activity in essential hypertension. Roles of plasma volume, blood pressure, and sympathetic nervous system. Ann. Intern. Med. 1970;72:9-16. DOI 10.7326/0003-4819-72-1-9.

Kaplan N.M. Hypokalemia in the hypertensive patient: with observations on the incidence of primary aldosteronism. Ann. Intern. Med. 1967;66:1079-1090. DOI 10.7326/0003-4819-66-6-1079.

Liddle G.W., Bledsoe T., Coppage W.S.J. A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. Trans. Assoc. Am. Phys. 1963;76:199-213. NII Article ID (NAID): 10018198924. http://ci.nii.ac.jp/naid/10018198924/

Liu K., Qin F., Sun X., Zhang Y., Wang J., Wu Y., Ma W., Wang W., Wu X., Qin Y., Zhang H., Zhou X., Wu H., Hui R., Zou Y., Jiang X., Song L. Analysis of the genes involved in Mendelian forms of low-renin hypertension in Chinese early-onset hypertensive patients. J. Hypertens. 2018;36:502-509. DOI 10.1097/HJH.0000000000001556.

Louis-Dit-Picard H., Barc J., Trujillano D., Miserey-Lenkei S., Bouatia-Naji N., Pylypenko O., Beaurain G., Bonnefond A., Sand O., Simian C., Vidal-Petiot E., Soukaseum C., Mandet C., Broux F., Chabre O., Delahousse M., Esnault V., Fiquet B., Houillier P., Bagnis C.I., Koenig J., Konrad M., Landais P., Mourani C., Niaudet P., Probst V., Thauvin C., Unwin R.J., Soroka S.D., Ehret G., Ossowski S., Caulfield M., International Consortium for Blood Pressure (ICBP), Bruneval P., Estivill X., Froguel P., Hadchouel J., Schott J.-J., Jeunemaitre X. KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. Nat. Genet. 2012;44:S1-S3. DOI 10.1038/ng.2218.

MacConnachie A.A., Kelly K.F., McNamara A., Loughlin S., Gates L.J., Inglis G.C., Jamieson A., Connell J.M., Haites N.E. Rapid diagnosis and identification of cross-over sites in patients with glucocorticoid remediable aldosteronism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998;83:4328-4331. DOI 10.1210/jcem.83.12.5309.

Markou A., Sertedaki A., Kaltsas G., Androulakis I.I., Marakaki C., Pappa T., Gouli A., Papanastasiou L., Fountoulakis S., Zacharoulis A., Karavidas A., Ragkou D., Charmandari E., Chrousos G.P., Piaditis G.P. Stress-induced aldosterone hyper-secretion in a substantial subset of patients with essential hypertension. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2015;100:2857-2864. DOI 10.1210/jc.2015-1268.

Mishra S., Ingole S., Jain R. Salt sensitivity and its implication in clinical practice. Indian Heart J. 2018:70(4):556-564. DOI 10.1016/j.ihj.2017.10.006.

Monticone S., Burrello J., Tizzani D., Bertello C., Viola A., Buffolo F., Gabetti L., Mengozzi G., Williams T.A., Rabbia F., Veglio F., Mulatero P. Prevalence and clinical manifestations of primary aldosteronism encountered in primary care practice. J. Am. Coll. Cardiol. 2017a;69(14):1812-1820. DOI 10.1016/j.jacc.2017.01.052.

Monticone S., D'Ascenzo F., Moretti C., Williams T.A., Veglio F., Gaita F., Mulatero P. Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. Lancet Diabetes Endocrinol. 2018a;6:41-50. DOI 10.1016/S2213-8587(17)30319-4.

Monticone S., Else T., Mulatero P., Williams T.A., Rainey W.E. Understanding primary aldosteronism: impact of next generation sequencing and expression profiling. Mol. Cell Endocrinol. 2015a;399:311-320. DOI 10.1016/j.mce.2014.09.015.

Monticone S., Losano I., Tetti M., Buffolo F., Veglio F., Mulatero P. Diagnostic approach to low-renin hypertension. Clin. Endocrinol. 2018b;1-12. DOI 10.1111/cen.13741.

Monticone S., Tetti M., Burrello J., Buffolo F., De Giovanni R., Veglio F., Williams T.A., Mulatero P. Familial hyperaldosteronism type III. J. Hum. Hypertens. 2017b;31:776-781. DOI 10.1038/jhh.2017.34.

Monticone S., Viola A., Rossato D., Veglio F., Reincke M., Gomez-Sanchez C., Mulatero P. Adrenal vein sampling in primary aldoste-

ronism: towards a standardised protocol. Lancet Diabetes Endocrinol. 2015b;3:296-303. DOI 10.1016/S2213-8587(14)70069-5.

Mulatero P., Milan A., Fallo F., Regolisti G., Pizzolo F., Fardella C., Mosso L., Marafetti L., Veglio F., Maccario M. Comparison of confirmatory tests for the diagnosis of primary aldosteronism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006;91:2618-2623. DOI 10.1210/jc.2006-0078.

Mulatero P., Monticone S., Bertello C., Viola A., Tizzani D., Iannaccone A., Crudo V., Burrello J., Milan A., Rabbia F., Veglio F. Long-term cardio- and cerebrovascular events in patients with primary aldosteronism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013;98:4826-4833. DOI 10.1210/jc.2013-2805.

Mulatero P., Rabbia F., Milan A., Paglieri C., Morello F., Chiandussi L., Veglio F. Drug effects on aldosterone/plasma renin activity ratio in primary aldosteronism. Hypertension. 2002;40:897-902. DOI 10.1016/S0895-7061(03)00766-0.

Mulatero P., Verhovez A., Morello F., Veglio F. Diagnosis and treatment of low-renin hypertension. Clin. Endocrinol. (Oxf). 2007;67:324-334. DOI 10.1111/j.1365-2265.2007.02898.x.

New M.I., Geller D.S., Fallo F., Wilson R.C. Monogenic low renin hypertension. Trends Endocrinol. Metab. 2005;16:92-97. DOI 10.1016/j.tem.2005.02.011.

Rafestin-Oblin M.E., Souque A., Bocchi B., Pinon G., Fagart J., Vandewalle A. The severe form of hypertension caused by the activating S810L mutation in the mineralocorticoid receptor is cortisone related. Endocrinology. 2003;144:528-533. DOI 10.1210/en.2002-220708.

Rapp J.P., Dene H. Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. Hypertension. 1985;7(1):340-349.

Sagnella G.A. Why is plasma renin activity lower in populations of African origin? J. Hum. Hypertens. 2001;15:17-25.

Salti I.S., Stiefel M., Ruse J.L., Laidlaw J.C. Non-tumorous "primary" aldosteronism. I. Type relieved by glucocorticoid (glucocorticoid-remediable aldosteronism. Can. Med. Assoc. J. 1969;101:1-10.

Scholl U.I., Goh G., Stölting G., de Oliveira R.C., Choi M., Overton J.D., Fonseca A.L., Korah R., Starker L.F., Kunstman J.W., Prasad M.L., Hartung E.A., Mauras N., Benson M.R., Brady T., Shapiro J.R., Loring E., Nelson-Williams C., Libutti S.K., Mane S., Hellman P., Westin G., Åkerström G., Björklund P., Carling T., Fahlke C., Hidalgo P., Lifton R.P. Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. Nat. Genet. 2013;45:1050-1054. DOI 10.1038/ng.2695.

Scholl U.I., Healy J.M., Thiel A., Fonseca A.L., Brown T.C., Kunstman J.W., Horne M.J., Dietrich D., Riemer J., Kücükköylü S., Reimer E.N., Reis A.C., Goh G., Kristiansen G., Mahajan A., Korah R., Lifton R.P., Prasad M.L., Carling T. Novel somatic mutations in primary hyperaldosteronism are related to the clinical, radiological and pathological phenotype. Clin. Endocrinol. 2015a;83:779-789. DOI 10.1111/cen.12873. Epub 2015 Sep 23.

Scholl U.I., Stölting G., Nelson-Williams C., Vichot A.A., Choi M., Loring E., Prasad M.L., Goh G., Carling T., Juhlin C.C., Quack I., Rump L.C., Thiel A., Lande M., Frazier B.G., Rasoulpour M., Bowlin D.L., Sethna C.B., Trachtman H., Fahlke C., Lifton R.P. Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. Elife. 2015b;4:e06315. DOI 10.7554/eLife.06315.

Scholl U.I., Stölting G., Schewe J., Thiel A., Tan H., Nelson-Williams C., Vichot A.A., Jin S.C., Loring E., Untiet V., Yoo T., Choi J., Xu S., Wu A., Kirchner M., Mertins P., Rump L.C., Onder A.M., Gamble C., McKenney D., Lash R.W., Jones D.P., Chune G., Gagliardi P., Choi M., Gordon R., Stowasser M., Fahlke C., Lifton R.P. CLCN2 chloride channel mutations in familial hyperaldosteronism type II. Nat. Genet. 2018;50(3):349-354. DOI 10.1038/s41588-018-0048-5.

Song Y., Yang S., He W., Hu J., Cheng Q., Wang Y., Luo T., Ma L., Zhen Q., Zhang S., Mei M., Wang Z., Qing H., Bruemmer D., Peng B., Li Q. Chongqing Primary Aldosteronism Study (CONPASS) Group. Confirmatory tests for the diagnosis of primary aldosteronism: a prospective diagnostic accuracy study. Hypertension. 2018;71(1):118-124. DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10197.

Sutherland D.J., Ruse J.L., Laidlaw J.C. Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. Can. Med. Assoc. J. 1966;95:1109-1119.

Tetti M., Monticone S., Burrello J., Matarazzo P., Veglio F., Pasini B., Jeunemaitre X., Mulatero P. Liddle syndrome: review of the literature and description of a new case. Int. J. Mol. Sci. 2018;19(3):E812. DOI 10.3390/ijms19030812.

Vilela L.A.P., Almeida M.Q. Diagnosis and management of primary aldosteronism. Arch. Endocrinol. Metab. 2017;61(3):305-312. DOI 10.1590/2359-3997000000274.

Wang J.J., Peng K.Y., Wu V.C., Tseng F.Y., Wu K.D. *CTNNB1* mutation in aldosterone producing adenoma. Endocrinol. Metab. (Seoul). 2017;32:332-338. DOI 10.3803/EnM.2017.32.3.332.

Wang L.P., Yang K.Q., Jiang X.J., Wu H.Y., Zhang H.M., Zou Y.B., Song L., Bian J., Hui R.T., Liu Y.X., Zhou X.L. Prevalence of Liddle syndrome among young hypertension patients of undetermined cause in a chinese population. J. Clin. Hypertens. (Greenwich). 2015;17:902-907. DOI 10.1111/jch.12598.

Weinberger M.H. Salt sensitivity of blood pressure in humans. Hypertension. 1996;27:481-490.

Williams T.A., Lenders J.W.M., Mulatero P., Burrello J., Rottenkolber M., Adolf C., Satoh F., Amar L., Quinkler M., Deinum J., Beuschlein F., Kitamoto K.K., Pham U., Morimoto R., Umakoshi H., Prejbisz A., Kocjan T., Naruse M., Stowasser M., Nishikawa T., Young W.F. Jr, Gomez-Sanchez C.E., Funder J.W., Reincke M.; Primary Aldosteronism Surgery Outcome (PASO) investigators. Outcomes after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism: an international consensus on outcome measures and analysis of remission rates in an international cohort. Lancet Diabetes Endocrinol. 2017;5(9):689-699. DOI 10.1016/S2213-8587(17)30135-3.

Wilson F.H., Disse-Nicodème S., Choate K., Ishikawa K., Nelson-Williams C., Desitter I., Gunel M., Milford D.V., Lipkin G.W., Achard J.M., Feely M.P., Dussol B., Berland Y., Unwin R.J., Mayan H., Simon D.B., Farfel Z., Jeunemaitre X., Lifton R.P. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. Science. 2001;293(5532):1107-1112. DOI 10.1126/science.1062844.

Wilson R.C., Dave-Sharma S., Wei J.Q., Obeyesekere V.R., Li K., Ferrari P., Krozowski Z.S., Shackleton C.H.L., Bradlow L., Wiens T., New M.I. A genetic defect resulting in mild low-renin hypertension. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998;95:10200-10205.

Yagil C., Katni G., Rubattu S., Stolpe C., Kreutz R., Lindpaintner K., Ganten D., Ben-Ishay D., Yagil Y. Development, genotype and phenotype of a new colony of the Sabra hypertension prone (SBH/y) and resistant (SBN/y) rat model of salt sensitivity and resistance. J. Hypertens. 1996;14:1175-1182.

Yau M., Haider S., Khattab A., Ling C., Mathew M., Zaidi S., Bloch M., Patel M., Ewert S., Abdullah W., Toygar A., Mudryi V., Al Badi M., Alzubdi M., Wilson R.C., Al Azkawi H.S., Ozdemir H.N., Abu-Amer W., Hertecant J., Razzaghy-Azar M., Funder J.W., Al Senani A., Sun L., Kim S.-M., Yuen T., Zaidi M., New M.I. Clinical, genetic, and structural basis of apparent mineralocorticoid excess due to 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017;114:E11248-E11256. DOI 10.1073/pnas.1716621115.

ORCID ID

A.L. Markel orcid.org/0000-0002-1550-1647

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1009-1019
DOI 10.18699/VJ18.444

Иммуногенетический диалог матери и эмбрионов как фактор становления иммунного статуса потомков

Л.А. Герлинская[1] ✉, А.В. Варлачев[2], Г.И. Кротов[2], Г.В. Концевая[1], М.П. Мошкин[1]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Фонд перспективных исследований, Москва, Россия

Несмотря на достижения медицины, около 4 млн детей в возрасте до 6 мес. ежегодно умирают по всему миру из-за инфекции, что составляет 450 смертей в час (по данным Международного чрезвычайного детского фонда ООН – UNISEF). Степень развития иммунной системы детей, родившихся в срок, определяется многими факторами, в том числе иммуногенетическим сходством или различием организмов матери и плода, что, в свою очередь, обусловлено генотипами брачных пар, а также подбором суррогатных матерей при экстракорпоральном оплодотворении. Из проведенного нами обзора литературы следует, что на устойчивость потомков к инфекциям и аллергенам значимое влияние оказывают иммуногенетические взаимодействия организмов матери и плода, которые осуществляются на всех этапах пре- и постнатального развития. До имплантации иммунные реакции матери формируются под влиянием антигенов, лейкоцитов и цитокинов семенной жидкости, а также генов главного комплекса гистосовместимости, которые экспрессируются в эмбрионах уже на стадии двух клеток. Складывающийся при этом гуморальный фон программирует эффективность вынашивания и во многом предопределяет фенотипические свойства будущих потомков, включая и их иммунокомпетентность. После имплантации существенное иммуномоделирующее значение приобретает трансплацентарный перенос иммуноглобулинов и иммунокомпетентных клеток. Важно подчеркнуть, что, хотя вещества с высокой молекулярной массой обычно не проходят через плаценту, это правило не относится к иммуноглобулину G (IgG), который при молекулярной массе ~160 кДА преодолевает трансплацентарный барьер благодаря связыванию с Fc-рецептором плода. При этом уровень IgG у новорожденных обычно коррелирует с уровнем материнских антител. В период естественного вскармливания иммунная защита новорожденных обеспечивается механизмами врожденного иммунитета и факторами гуморального иммунитета матерей. Показано, что иммуноглобулины из молока многих видов животных переносятся через неонатальный кишечный эпителий в кровоток. Поскольку грудное молоко содержит в большом количестве различные иммуноактивные компоненты, включая белки, цитокины, гормоны, иммуноглобулины, экзосомы, содержащие микроРНК, и жизнеспособные иммунные клетки, то иммуномодулирующие эффекты грудного молока сохраняются и после элиминации материнских иммуноглобулинов из кровообращения потомков, вплоть до зрелого возраста. Анализ многочисленных экспериментальных данных показывает, что исследования механизмов взаимодействия материнского организма с эмбрионами и новорожденными формируют базу знаний для поиска средств направленной модуляции иммунного статуса потомков, которая может сохранять свое влияние на протяжении всей последующей жизни.

Ключевые слова: беременность; иммунорегуляторные механизмы; программирование развития; иммунные факторы; эндокринные факторы; трансплацентарный перенос; иммунные комплексы; естественное вскармливание.

Mother-fetus immunogenetic dialogue as a factor of progeny immune system development

L.A. Gerlinskaya[1] ✉, A.V. Varlachev[2], G.I. Krotov[2], G.V. Kontsevaya[1], M.P. Moshkin[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Foundation for Advanced Studies, Moscow, Russia

Despite the advances in medicine, about 4 million children under the age of 6 months die annually around the world due to infection, which is 450 deaths per hour (UNISEF, 2009). The degree of development of the immune system of children born in time is determined by many factors, including the immunogenetic similarity or difference of mother and fetus organisms, which, in turn, is due to the genotypes of mating pairs, as well as the selection of surrogate mothers during *in vitro* fertilization. From our review of the literature, it follows that immunogenetic interactions of mother and fetus organisms, which occur at all stages of pre- and postnatal development, have a significant effect on the resistance of offspring to infections and allergens. Before implantation, the mother's immune responses are formed under the influence of semen fluid antigens, leukocytes and cytokines, as well as under the influence of the genes of the major histocompatibility complex, which are expressed in embryos at the stage of two cells. After implantation, transplacental transfer of immunoglobulins and immunocompetent cells becomes of immunomodulating importance. It is important to emphasize that, although substances with a high molecular weight usually do not pass through the placenta, this rule does not apply to immunoglobulin G (IgG), which, with a molecular weight of about 160 kDa, overcomes the transplacental barrier due to binding to the fetal Fc receptor. The level of IgG in newborns usually correlates with the level of maternal antibodies. During the period of natural feeding, the immune protection of newborns is provided by the mechanisms of innate immunity and the factors of humoral immunity of mothers. It has been shown that immunoglobulins from the milk of many animal species are transferred through the neonatal intestinal epithelium to the blood. Since breast milk contains large amounts of various immunoactive components, including proteins, cytokines, hormones, immunoglobulins, exosomes containing micro-RNA, and viable immune cells, the immunomodulating effects of breast milk persist even after elimination of maternal immunoglobulins from the blood of the offspring, up to maturation. Analysis of a large body of experimental

Received October 14, 2018
Revised November 4, 2018
Accepted November 4, 2018

✉ e-mail: lgerlinskaya@gmail.com

data shows that the study of mechanisms of "mother-fetus" and "mother-newborn" interactions are the basis of a knowledge base needed to find means of life-long directed modulation of the descendants' immune status.

Key words: pregnancy; immunoregulatory mechanisms; development programming; immune factors; endocrine factors; transplacental transfer; immune complexes; breastfeeding.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Герлинская Л.А., Варлачев А.В., Кротов Г.И., Концевая Г.В., Мошкин М.П. Иммуногенетический диалог матери и эмбрионов как фактор становления иммунного статуса потомков. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1009-1019. DOI 10.18699/VJ18.444

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Gerlinskaya L.A., Varlachev A.V., Krotov G.I., Kontsevaya G.V., Moshkin M.P. Mother-fetus immunogenetic dialogue as a factor of progeny immune system development. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1009-1019. DOI 10.18699/VJ18.444 (in Russian)

Вадиму Ивановичу Евсикову,
вызвавшему интерес к проблеме, посвящается

При воспроизводстве млекопитающих во всех случаях, исключая скрещивания внутри инбредных линий, с момента фертилизации и до родов в организме матери живут и развиваются плоды (или плод), которые, несмотря на иммунологическую чужеродность, не подвергаются отторжению на протяжении длительного времени. Этой проблеме, известной как «парадокс Медавара» (Billingham et al., 1953), посвящено значительное число экспериментальных и обзорных работ, которые, наряду с объяснением механизмов долговременной совместимости иммунологически несовместимых организмов, вывели проблему иммуногенетического диалога за рамки внутриутробного развития. В частности, был поставлен вопрос о взаимодействии в системе мать–плод как об одном из механизмов становления морфофункциональных свойств потомков, включая пре- и постнатальное программирование их иммунного статуса. Среди механизмов иммуномодулирующего влияния матерей на формирование иммунного реагирования потомков можно выделить несколько наиболее важных этапов:

- эпигенетическое программирование онтогенетического развития иммунной системы, в том числе обусловленное иммуногенетическими различиями мать–плод;
- трансплацентарный перенос к потомкам материнских иммуноглобулинов и иммунокомпетентных клеток;
- формирование пассивного и активного иммунитета за счет содержащихся в материнском молоке иммунокомпетентных клеток.

Экспериментально обосновано, что пренатальный период – чрезвычайно чувствительный к изменениям внутриматочной среды, которые существенным образом влияют на эмбриональное и постнатальное развитие потомков (Szekeres-Bartho, 2002; Mold, McCune, 2012). В свою очередь, значительный вклад в модуляцию гуморального окружения зародышей вносит иммунное распознавание эмбриональных аллоантигенов, которое при иммуногенетических различиях матери и плода активирует многие иммунные и эндокринные процессы в материнском организме. В результате иммуноэндокринного диалога матери и плода осуществляются нормальное течение беременности и формирование у потомков механизмов иммунной защиты (Szekeres-Bartho, 2002; Mold, McCune, 2012; Erlebacher, 2013). Естественная активация материнских иммунорегуляторных механизмов играет положительную роль в развитии иммунной системы потомков, тогда как чрезмерная иммунная реакция (высокий уровень провоспалительных цитокинов) может увеличивать риск возникновения психомоторных расстройств, аутоиммунных заболеваний и предрасположенности к аллергиям в последующей жизни (Ellman, 2009; Bilbo, Schwarz, 2012).

Иммунная система развивающихся потомков демонстрирует высокую чувствительность к воздействию неблагоприятных факторов, в частности инфекционных агентов, воздействующих на организм матери в период беременности. Как правило, к наиболее чувствительным периодам онтогенеза относят периоды постимплантационного развития, роды и молочное вскармливание. Отчасти это объясняется тем, что в тканях эмбрионов и новорожденных обнаруживаются предшественники иммунных клеток: в возрасте 4–7 нед – клетки миелоидного происхождения, а в возрасте 8–18 нед – лимфоидные клетки (Dietert R.R., Dietert J.M., 2008). Это обстоятельство определило выбор сроков проведения подавляющего большинства исследований, посвященных проблеме модулирующего влияния условий пре- и постнатального развития на формирование иммунных реакций потомков. В качестве ключевых факторов материнского влияния на формирование механизмов иммунной защиты потомков рассматривается перенос материнских антител, цитокинов, иммунных клеток и, возможно, других факторов в места эмбрионального кроветворения в постимплантационный период (трансплацентарный перенос) во время родов и молочного выкармливания (Williams et al., 2011; Ghosh et al., 2016).

Однако межорганизменный диалог в системе мать–плод начинается еще на стадии доимплантационного развития. Экспериментально установлено, что жизнеспособные эмбрионы секретируют ростовые факторы и цитокины, начиная с двухклеточной стадии развития (Guo et al., 2010). Ростовые факторы эмбрионального происхождения обнаруживаются в материнской циркуляции примерно через 72 ч после фертилизации. Действие этих факторов направлено на такие иммунные клетки, как макрофаги,

нейтрофилы и лейкоциты, оно также способствует доминированию Th2 цитокинов в иммунном ответе, но не подавляет при этом экспрессию Th1 цитокинов (Kyurkchieva et al., 2010). Этот парадоксальный результат указывает на способность эмбриональных ростовых факторов модулировать материнский иммунный ответ на антигены плода при сохранении адекватного ответа на патогены.

Таким образом, иммунные и эндокринные реакции матери на гуморальные сигналы эмбрионов формируют условия эмбрионального развития, которые существенным образом влияют на становление защитных функций потомков, что проявляется в их восприимчивости к патогенам и аллергенам окружающей среды. Ниже более детально рассмотрены механизмы иммунноэндокринного диалога в системе мать–плод начиная от момента фертилизации и заканчивая завершением вскармливания материнским молоком.

Факторы иммунноэндокринного программирования имплантации и развития потомков

Имплантация бластоцисты в материнский организм – ключевой этап в процессе размножения млекопитающих. Успех имплантации зависит от реализации сложной последовательности строго координированных генетических, гуморальных и клеточных взаимодействий между материнским и эмбриональным организмами. Двусторонние взаимодействия бластоцисты и материнского организма активируют локальный иммунный ответ матери и, как следствие, обеспечивают подготовку матки к имплантации, с другой стороны, материнские цитокины, гормоны и другие метаболиты вовлекаются в регуляцию эмбрионального развития. Наиболее драматичный этап беременности, зависящий от иммуногенетических различий матери и зародышей, – это этап преимплантационного развития эмбрионов (Choudhury, Knapp, 2001; Gerlinskaya, Evsikov, 2001; Szekeres-Bartho, 2002).

Этот период уникален тем, что он осуществляется при отсутствии прямых контактов клеток зародышей с клетками репродуктивного тракта в течение примерно недели (в случае человека) до имплантации в матку. Соответственно, эмбрион не связан с материнской системой кровообращения и свободно перемещается в изменяющейся внутриматочной гуморальной среде. До имплантации клетки зародыша претерпевают деления, апоптоз и дифференцировку. В естественных условиях на эти процессы прямое влияние оказывают цитокины, факторы роста, секретируемые эпителиальными клетками матки, и гормоны яичников. Эмбрионы, начиная со стадии зиготы, т. е. сразу после фертилизации, экспрессируют рецепторы цитокинов, которые воспринимают внешние регуляторные сигналы, определяющие темпы деления и жизнеспособность клеток, а также экспрессию генов эмбрионального развития (Robertson et al., 1994; Sharkey et al., 1995). В этот период факторы окружающей среды, такие как инфекции, воспаление, питание и другие, влияют на состав внутриматочной гуморальной среды и тем самым могут оказывать модифицирующие воздействия на реализацию индивидуальной генетической программы эмбрионального развития.

Любые факторы, вызывающие нарушения баланса в иммунных взаимоотношениях мать–плод на преимплантационной стадии развития, оказывают значимое влияние на чувствительность потомков к инфекциям (Szekeres-Bartho, 2002; Mold, McCune, 2012), а также на вероятность развития нейродегенеративных патологий (Susser et al., 2000; Brown et al., 2004). В этот период материнская иммунная система распознает профиль секретируемых ранними эмбрионами сигнальных молекул, которые вовлекаются в регуляцию локального иммунитета, содействуют адгезии эмбрионов и контролируют клеточное деление и апоптоз (Paidas et al., 2010; Barnea et al., 2012). В результате становления иммуногенетического и эндокринного диалога матери и плода формируются условия, обеспечивающие нормальное течение беременности и формирование у потомков механизмов иммунной защиты (Szekeres-Bartho, 2002; Mold, McCune, 2012; Erlebacher, 2013). Первыми молекулами, экспрессия которых фиксируется на протяжении периода развития от фертилизованной яйцеклетки до бластоцисты, являются гонадотропин-релизинг гормон (GnRH), ростовые факторы и цитокины.

Гормоны, контроль эмбрионального развития. GnRH экспрессируется, судя по мРНК, уже на стадии двух клеток и далее, вплоть до имплантации (Fishel et al., 1984; Woodward et al., 1993; Seshagiri et al., 1994). Показано, что иммунореактивный GnRH присутствует в преимплантационных эмбрионах на стадиях морулы и бластоцисты (Francisco et al., 1999). Результаты иммуногистохимического исследования преимплантационных эмбрионов мышей показали, что GnRH локализован в бластомерах компактизованной морулы, во внутренней клеточной массе эмбрионов и трофэктодерме бластоцисты (Seshagiri et al., 1994). Экспрессия мРНК GnRH и белка увеличивается начиная со стадии морулы, и это позволяет рассматривать GnRH в качестве потенциального паракринного фактора, участвующего в регуляции преимплантационного развития и имплантации (Casan et al., 1998; Raga et al., 1998). Инкубация преимплантационных эмбрионов в присутствии GnRH позитивно влияет на эмбриональное развитие, а внесение в инкубационную среду антагониста GnRH подавляет развитие эмбрионов. Более того, антагонист GnRH, добавленный в инкубационную среду в дозах 5 и 10 мМ, полностью блокирует развитие эмбрионов. Негативное влияние антагониста GnRH на развитие преимплантационных эмбрионов (число эмбрионов, достигших стадии бластоцисты) нивелируется увеличением концентрации в инкубационной среде агониста этого гормона (Francisco et al., 1999).

Помимо влияния на развивающийся эмбрион, эмбриональный GnRH вносит вклад в подготовку матки к процессу имплантации. Предпосылкой для этого является GnRH-устойчивая экспрессия рецептора к данному гормону, которая детектируется на всех стадиях преимплантационного развития и обеспечивает взаимодействие эмбрионального GnRH с материнским трубчатым эпителием и эндометрием, стимулируя тем самым восприимчивость эндометрия к имплантации (Hearn et al., 1988; Asirvatham et al., 1994; Das et al., 1994).

Кроме того, продуцируемый трофобластом GnRH – один из основных регуляторов синтеза и секреции хорио-

нического гонадотропного гормона (hCG) в преимплантационных эмбрионах (Seshagiri et al., 1994) и плаценте (Prager et al., 1992), и его основная роль заключается в поддержании синтеза и секреции прогестерона желтыми телами яичников (Zimmermann et al., 2009; Singh, Krishna, 2010). На преимплантационной стадии hCG стимулирует продукцию эндометрием фактора подавления лейкемии (LIF) и проангиогенного сосудистого эндотелиального фактора роста, которые играют критическую роль в процессе имплантации. Одновременно hCG ингибирует образование макрофагального колониестимулирующего фактора белка 1, связывающего инсулиноподобный фактор роста, продукцию интерлейкина-6 (IL-6) эпителиальными клетками эндометрия (Licht et al., 2001, 2007). Эти изменения развиваются без существенного подъема концентрации прогестерона в крови. Эффекты перечисленных выше паракринных факторов связаны с их влиянием на децидуляцию, ангиогенез и подготовку матки к имплантации эмбрионов (Strakova et al., 2000; Srisuparp et al., 2001).

Помимо прямого воздействия на клетки эндометрия и развивающегося зародыша, эмбриональный GnRH, как и гипоталамический релизинг гормон, обладает эндокринным эффектом, направленным на спасение желтого тела и последующее высвобождение прогестерона. Собственная, не опосредованная через гонадотропные гормоны лютеотропная активность GnRH хорошо документирована (Duncan, 2000). Вместе с тем драматический подъем продукции hCG трофобластом приводит к повышению его концентрации в плазме крови матери от 5 до > 1.000 у. е./мл и стимулирует синтез и секрецию прогестерона (Carr et al., 1982). HCG активирует опосредованный регуляторным белком (StAR) транспорт холестерола, предшественника стероидных гормонов, и синтез прогестерона (Pidoux et al., 2007). Эмбриональные стволовые клетки экспрессируют прогестероновый рецептор А. Поэтому воздействие прогестерона на колонии эмбриональных стволовых клеток человека индуцирует организацию нейроэктодермальных клеток в розетки, схожие с нейрональными трубками. Подавление прогестеронового сигнального пути угнетает дифференциацию эмбриональных стволовых клеток человека в эмбриоидные тела и розетки (Gallego et al., 2010). Эти данные свидетельствуют о ключевой роли гонадотропного гормона и прогестерона в дифференциации эмбриональных стволовых клеток. Кроме того, прогестерон контролирует функцию эндометрия за счет увеличения секреции LIF и активации экспрессии гена интерлейкина-4 в Т-клетках (Herrler et al., 2003).

У человека и других видов млекопитающих прогестероновый сигнальный путь является ключевым в процессах становления и поддержания беременности. Классический взгляд на роль прогестерона при беременности часто ограничивается его функцией в репродукции, связанной с тем, что он секретируется клетками гранулезы в фолликулах яичника, желтом теле беременности и после 8-й недели беременности продуцируется развивающейся плацентой. Тем не менее хорошо известно, что прогестерон обладает иммуномодулирующими свойствами, которые вносят свой вклад в иммуносупрессию, обеспечивающую защиту эмбрионов от отторжения в период беременности. Высокие концентрации прогестерона продлевают выживаемость ксеногенного и аллогенного трансплантатов, а также влияют на различные фазы иммунного ответа (Kyurkchieva et al., 2010). Прогестерон относят к числу мощных регуляторов иммунного ответа.

Влияние прогестерона на афферентное звено иммунного ответа приводит к сокращению жизненного цикла дендритных клеток путем усиления их дифференцировки и последующего апоптоза, а также к усилению секреции IL-10. С другой стороны, активность эффекторов иммунной системы, таких как Т-клетки и натуральные киллеры (NK), модулируется прогестероном в направлении стимуляции иммунного ответа Th2-типа и подавления активности NK-клеток. Под влиянием прогестерона изменяется профиль секретируемых В-клетками антител за счет увеличения продукции IgG (Kelemen et al., 1996). Другой важный результат иммуномодуляции прогестероном заключается в его влиянии на мезенхимальные стволовые клетки, в которых индуцируются синтез и секреция специфических белков, влияющих на деятельность нескольких типов иммунокомпетентных клеток.

Следует отметить, что почти ничего не известно о роли иммуногенетических различий матери и плода в регуляции прогестероновой функции на доимплантационной стадии эмбрионального развития. Значимость этого фактора доказывают наши исследования, выполненные на линиях мышей, которые различаются по генам главного комплекса гистосовместимости (MHC) BALB/c^d и C57BL^b. На примере внутри- и межлинейных скрещиваний и внутри- и межлинейных пересадок бластоцист было установлено, что у самок, вынашивающих аллогенные эмбрионы, отличающиеся по генам главного комплекса гистосовместимости, уровень прогестерона в плазме крови на пятые сутки после покрытия был существенно выше, чем у самок, вынашивающих сингенное потомство (Gerlinskaya, Evsikov, 2001). Участие иммунных факторов в модуляции прогестероновой функции матерей доказывают результаты наших экспериментов с однократной иммунизацией самок аллоантигенами самцов, проведенной на вторые сутки после внутрилинейного фертильного спаривания. В этом случае наблюдались достоверное увеличение концентрации прогестерона в крови в период имплантации (пятые сутки после покрытия) и увеличение жизнеспособности потомков на стадии эмбрионального развития. Следует отметить, что иммуностимуляция самок на ранних стадиях беременности значимо повышает качество матерей. Наши результаты показывают, что иммуностимулированные самки выкармливают бóльшее число потомков за счет отсутствия случаев полного или частичного отказа от выкармливания потомков (Gerlinskaya et al., 2000).

Цитокины и ростовые факторы, контроль эмбрионального развития. Развитие эмбрионов в период их свободного перемещения в женском репродуктивном тракте контролируется цитокинами и ростовыми факторами, которые секретируются эпителиальными клетками матки и координируют пространственно-временные взаимоотношения развивающегося эмбриона и процессы подготовки матки к имплантации. Экспрессия эмбриональных цитокиновых рецепторов, которая фиксируется уже на

стадии фертилизации, обеспечивает влияние цитокинов и ростовых факторов на количество и жизнеспособность эмбриональных клеток (Sharkey et al., 2008). Вместе с тем сами развивающиеся эмбрионы также продуцируют цитокины, которые прямо или опосредованно участвуют в морфофункциональной подготовке эндометрия к имплантации. Цитокины и ростовые факторы, продуцируемые на разных стадиях развития преимплантационных эмбрионов, включают IL-1, IL-6, колониестимулирующий фактор-1, фактор некроза опухоли (TNFα) и др. Результаты экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo*, выполненные с привлечением разных методов, включая генетические, представляют убедительные доказательства долгосрочных эффектов раннего воздействия цитокинов и факторов роста на развитие плода. Эти эффекты проявляются в течение послеродового периода, в том числе в форме неодинаковой восприимчивости к инфекциям (Robertson et al., 2011).

Детальное изучение вклада гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в программирование развития показало, что этот цитокин необходим для нормального развития бластоцисты и последующего поддержания высокой жизнеспособности плодов и новорожденных (Robertson et al., 1994; Robertson, 2007). Влияние GM-CSF на эмбрион в преимплантационный период способствует формированию бластоцисты, увеличивая количество жизнеспособных бластомеров за счет ингибирования апоптоза и облегчения поглощения глюкозы (Robertson et al., 2001). В работах других исследователей также отмечается важная роль цитокинов эмбрионального происхождения в программировании онтогенеза. В частности, показано, что TNFα уверенно экспрессируется эмбрионами в интервале от четырехклеточной стадии до морулы (Witkin et al., 1991). При этом TNFα уменьшает количество клеток внутренней клеточной массы без заметного влияния на развитие трофэктодермы (Pampfer et al., 1994). Синхронизированная экспрессия IL-6 и его рецептора регистрируется на уровне мРНК и белков на каждой стадии развития преимплантационных эмбрионов. Белок IL-6 обнаруживается в цитоплазме, а IL-6 рецептор – на клеточной мембране (Zhao et al., 2012). В других исследованиях было показано, что факторы роста увеличивают число клеток бластоцисты. Так, инсулиноподобный фактор, специфически действуя на клетки внутренней клеточной массы, повышает количество клеток трофэктодермы и стимулирует синтез белка (Hardy, Spanos, 2002). В целом влияние цитокинов на процессы, происходящие в репродуктивном тракте, включая эмбриональное развитие, инвазию трофобласта в эндометрий и имплантацию, имеет критическое значение. Предполагается, что цитокины стимулируют экспрессию генов, влияющих впоследствии на развитие и/или на эпигенетическое программирование преимплантационных эмбрионов и отдаленные последствия, проявляющиеся в разных формах ненаследственных патологий (Sjoblom et al., 2002). Следует отметить, что роль цитокинов в развитии преимплантационных эмбрионов исследовалась главным образом в условиях *in vitro*, тогда как влияние изменений экспрессии цитокинов в физиологических ситуациях (материнские инфекции, воспаление, диета, или болезни, такие как диабет) на развитие эмбрионов и потомков остается неизвестным.

Мать–плод, иммунный диалог

Иммунная система матери играет критическую роль в становлении, поддержании и обеспечении здоровой беременности. Поскольку эмбриональная и плацентарная ткани экспрессируют отцовские гены, успех беременности зависит от условий, обеспечивающих сосуществование и взаимодействие между антигенно отличным от материнского организма плодом и материнской иммунной системой, несмотря на присутствие лейкоцитов в репродуктивном тракте и нормальной иммунокомпетентности в местах имплантации. Этот процесс иммуногенетического диалога в системе мать–плод начинается от момента фертилизации и заканчивается родами и выкармливанием потомков.

Материнский иммунный ответ. Проблеме формирования иммунного ответа матери, обусловленного сосуществованием и развитием в материнском организме антигенно отличного плода, являющегося аналогом ксенотрансплантата, посвящено более 5000 работ (база данных PubMed), и ежегодно число публикаций увеличивается от двух работ в 1963 г. до 299 в 2016 г. Одно из первых объяснений длительного существования плода в прямом контакте с материнским организмом было предложено R.E. Billingham с коллегами (1953), которые выдвинули концепцию иммунной толерантности во время беременности. Согласно гипотезе толерантности, антигенно отличный плод способен выжить в материнском организме в результате формирования особых механизмов, регулирующих иммунологические взаимодействия между матерью и плодом. Такое регулирование может быть вызвано отсутствием экспрессии плодового антигена и/или функциональным подавлением материнского иммунного ответа.

Вероятно, наиболее важной стратегией обхода иммунного распознавания материнским организмом эмбриональных антигенов является отсутствие экспрессии классических антигенов MHC на трофобласте. Вклад механизмов экспрессии генов MHC в клетках трофобласта представляет большой интерес из-за потенциальной роли, которую отсутствие экспрессии этих антигенов играет в защите плода от атаки материнской иммунной системой. Трофобласт человека, как известно, выполняет функцию иммунологического барьера между матерью и плодом и характеризуется отсутствием экспрессии антигенов MHC класса II, а также отсутствием экспрессии классических антигенов класса MHC I, лейкоцитарных HLA-A и HLA-B антигенов (Chatterjee-Hasrouni, Lala, 1981; Hunt, Orr, 1992). Классические молекулы MHC I класса играют ключевую роль в презентации антигенов Т-клеткам и NK-клеткам, и это обстоятельство поддерживает теорию о том, что отсутствие молекул MHC I класса в трофобласте защищает его от материнской иммунной атаки. Однако хорошо известно, что клетки трофобласта экспрессируют классические MHC класса I HLA-C и неклассические MHC HLA-E, HLA-F и HLA-G молекулы (King et al., 2000a, b; Hunt, 2005). Человеческий лейкоцитарный антиген C (HLA-C) – единственный полиморфный классический

антиген гистосовместимости, который экспрессируется в клетках трофобласта на границе между плодами и материнским организмом. Взаимодействие HLA-C с децидуальными Т-клетками эндометрия может способствовать успешной инвазии трофобласта в эндометрий матки. Показано, что при беременности с несовпадающими по классическим генам МНС класса I эмбриональными и материнскими HLA-C отмечается увеличение количества активированных Treg и Т-клеток в децидуальной ткани по сравнению с наблюдаемым при HLA-C схожести материнского и эмбрионального организмов (Tilburgs et al., 2009). При неосложненной беременности децидуальные Т-клетки распознают эмбриональный HLA-C фенотип в местах межклеточных контактов мать–плод, но они не всегда вызывают деструктивный материнский иммунный ответ (Chen et al., 2012). Эмбриональные HLA-C молекулы взаимодействуют с поверхностными киллер-инсулиноподобными рецепторами (KIR) NK-клеток. Поверхностные KIR-рецепторы, связывающиеся с HLA-C молекулами, экспрессируются в NK матки со значительно большей частотой, чем в периферических клетках NK, и их максимальная экспрессия, наблюдаемая у женщин на ранней стадии беременности (до 6 нед), постепенно снижается к концу первого триместра беременности (Verma et al., 1997; Sharkey et al., 2008). Клетки NK матки отличаются от периферических NK-клеток пониженной лизирующей активностью (King et al., 2000a, b; Apps et al., 2011). В популяции децидулярных лейкоцитов доля NK, имеющих KIR-рецепторы, драматически повышается до 20–30 % на 3-й– 5-й дни после овуляции и достигает 70 % в период имплантации. Взаимодействия HLA-C-KIR с клетками трофобласта и NK-клетками матки регулируют глубину инвазии клеток трофобласта в матку и кровоток в пространстве между ворсинками трофобласта путем трансформации спиральных артерий трофобласта (Moffett, Loke, 2006).

Иммунологическое взаимодействие мать–плод, происходящее в месте имплантации, включает две полиморфные генные системы, материнские KIR и эмбриональную HLA-C. Формирование условий для успешной инвазии клеток трофобласта, в частности внутриутробного кровотока, зависит от комбинации материнского KIR NK и эмбрионального HLA-C генотипов (Moffett, Loke, 2006). Генетические исследования показывают, что комбинации материнских и отцовских генотипов по HLA-C, проявляющему заметный полиморфизм, а также KIR фенотип (активирующий/ингибирующий) NK-клеток матки, влияют на репродуктивный успех, в частности эта комбинаторика отвечает за привычные выкидыши и гестоз, а также модулирует рост и развитие плода (Hiby et al., 2004, 2010).

От других молекул HLA класса I HLA-G отличает низкий полиморфизм промоторной области и ограниченное распределение в ткани. Растворимая изоформа s-HLA-G идентифицирована на поверхности фетоплацентарного комплекса и, как было установлено, индуцирует апоптоз CD8+Т-клеток и NK-клеток и детектируется в течение всего периода беременности в крови матерей и амниотической жидкости (Mallet et al., 2000; Contini et al., 2003). HLA-G подавляет децидулярные антигенпрезентирующие клетки (dAPC), NK-клетки и CD8+Т-клетки. Молекулы HLA-G клеток трофобласта могут подавлять иммуногенный фенотип дендритных клеток матки (Pazmany et al., 1996). Растворимые молекулы HLA-G эндоцитируются иммуноглобулин-подобными рецепторами (KIR2DL4) N-клеток и индуцируют секрецию провоспалительных/проангиогенных факторов. Этот уникальный механизм стимуляции покоящихся NK-клеток растворимой HLA-G обеспечивает во время ранней беременности васкуляризацию эдометрия матки (Rajagopalan et al., 2006, 2010). Таким образом, матка не является иммуно-привилегированным органом, но обладает (особенно ее мукозальный слой) уникальными иммунологическими свойствами, которые стимулируют внутриутробный кровоток, обеспечивающий доставку нутриентов, необходимых для нормального роста и развития плода.

Успешное вынашивание антигенно отличного от материнского организма плода и рождение здорового потомства тесно связаны с активацией иммуносупрессивных механизмов, обеспечивающих материнскую толерантность к чужеродному эмбриону. С другой стороны, мать должна поддерживать иммунную функцию на уровне, позволяющем обеспечивать защиту от инфекций. Механизм, обуславливающий успех имплантации и поддержание нормального течения беременности, связан с переключением Th1/Th2 профиля цитокинов в направлении преобладания Th2 цитокинов. Согласно гипотезе (Wegmann et al., 1993), преобладание Th2 профиля цитокинов поддерживается за счет как аккумуляции Th2 клеток в децидуле, так и индукции пролиферации наивных Т-клеток в направлении образования Th2 клеток. Следует отметить, что эти изменения не оказывают значимого влияния на системный иммунный ответ (Sykes et al., 2012).

Ключевые молекулы, которые вовлекаются в регуляцию поддержания необходимого для успешной беременности баланса Th1/Th2 клеток, – прогестерон и противовоспалительные цитокины IL-4 и IL-10. В лейкоцитах беременных женщин обнаружено наличие специфических мест связывания прогестерона и отсутствие таковых в лейкоцитах небеременных женщин. Прогестерон вовлекается в регуляцию популяции Treg клеток и играет основную роль в системном и местном (матка) увеличении CD4CD25 Treg клеток (Mao et al., 2010). Прогестерон блокирует K+каналы Т-лимфоцитов и, таким образом, опосредует локализованное и обратимое подавление пролиферации цитотоксических клеток. Этот механизм реализуется только при очень высоких концентрациях гормона, которые характерны для мест контакта аллогенных клеток (Ehring et al., 1998). Изменение концентрации прогестерона при беременности носит видоспецифический характер, но у всех видов она возрастает на стадии имплантации (Остин, Шорт, 1989), причем более заметно при аллогенной беременности, чем при сингенной (Gerlinskaya, Evsikov, 2001). В присутствии прогестерона, как было показано выше, модулируются преобладание иммунного ответа Th2 типа, подавление активности NK-клеток и увеличение продукции IgG, способствующих нормальному течению беременности. Прогестерон подавляет продукцию интерферона-γ (IFN) в мононуклеарных клетках периферической крови, культивируемых в присутствии клеток трофобласта (Choi et al., 2000) и TNF-α, в то время как повышение IL-4 в

стимулированных фитогемагглютинином моноцитов периферической крови приводит к существенному сдвигу в соотношении Th1/Th2 (Raghupathy et al., 2005). Иммуноглобулины способны также изменять баланс Th1/Th2, что приводит к снижению отношения лимфоцитов CD4 + IFN-γ +/CD4 + IL-4 + (Yamada et al., 2003). В свою очередь, эндогенный белок (индуцированный прогестероном блокирующий фактор) способен увеличить продукцию IL-4 и IL-10 в моноцитах периферической крови и не влиять на цитокины Th1 IFN-γ и TNF-α (Raghupathy et al., 2009).

Влияние преимплантационного материнского иммунного статуса на развитие иммунной системы потомков. Как было отмечено выше, ключевые молекулы программирования раннего онтогенеза могут влиять на жизнеспособность потомков, в том числе и на формирование их иммунной системы. Вместе с тем, несмотря на большое число исследований, которые посвящены факторам, влияющим на программу развития эмбрионов в период беременности, об их отдаленном влиянии на здоровье потомков известно немного. Результаты клинических исследований, в которых было обследовано более 7000 пациенток и их потомков, показали, что фертилизация в присутствии возбудителей половых инфекций повышает риск развития шизофрении и других, ассоциированных с мозгом, болезней (Brown et al., 2004; Babulas et al., 2006). Наблюдаемые эффекты могут быть обусловлены как собственным влиянием патогенов, так и влиянием фармакологических препаратов, применяемых для лечения на этой стадии беременности.

Прямые доказательства долговременных модулирующих эффектов иммунного статуса матерей на преимплантационной стадии беременности на иммунитет взрослых потомков мы нашли только в одной работе (Williams et al., 2011). Авторы для проверки влияния факторов, модулирующих иммунный ответ матерей, самкам мышей вводили внутрибрюшинно низкую дозу бактериального эндотоксина (липополисарид, ЛПС) утром после спаривания, т. е. через 10–12 ч после фертилизации. Введение ЛПС сопровождалось проявлением типичного синдрома болезненного поведения и увеличением содержания провоспалительных цитокинов в плазме крови беременных самок. Эндотоксин минимально влиял на кровообращение, обмен веществ и поведение, но существенно – на врожденную иммунную систему потомков. Взрослое потомство матерей, получавших ЛПС, показало ослабленную реакцию провоспалительных цитокинов в ответ на введение эндотоксина. Степень подавления цитокинового ответа была в обратной зависимости от дозы ЛПС, полученной матерями в первые сутки после фертилизации (Williams et al., 2011). Эти результаты позволяют предположить, что внешняя микробиологическая среда и внутриматочный баланс про- и противовоспалительных цитокинов имеют большой потенциал долгосрочного влияния на программу развития иммунной системы.

Трансплацентарный перенос иммунных комплексов

Трансплацентарный перенос клеток. Кровь плода и плацента содержат разнообразные стволовые клетки, включая гемопоэтические. При этом трансплацентарный перенос, мать–плод, и обратный, плод–мать, многих типов клеток относятся к числу обычных явлений. Установлено, что клетки эмбрионального происхождения детектируются у некоторых женщин в послеродовой период на протяжении длительного времени, вплоть до десятилетий (Bianchi et al., 1996). Возникающий таким образом микрохимеризм рассматривается в качестве фактора риска развития аутоиммунных и иммунологических заболеваний у рожавших женщин (Klonisch, Drouin, 2009). Намного реже сообщается о микрохимеризме у плодов, хотя значительное число материнских клеток проникает в эмбрионы здоровых людей и мышей (Loubiere, 2006; Su et al., 2008). Эти клетки демонстрируют иммунологическую компетентность, выполняют важную функцию при аутоиммунных расстройствах, в реакции трансплантата против хозяина, опухолевом процессе и некоторых типах регенерации тканей (Bianchi, 2007). В мышиных эмбрионах материнские клетки впервые появляются в тимусе на стадии 12.5 дней беременности, в 18.5 дней они колонизируют многие лимфоидные и нелимфоидные органы. В 16.5 дней первые материнские клетки попадают в эмбриональный костный мозг и сохраняются в нем в течение продолжительного времени после рождения (Marleau, 2003). Материнские клетки, оккупирующие эмбриональные лимфатические узлы, опосредуют толерантность к ненаследуемым материнским аллоантигенам путем индукции Т-клеток CD4+CD25 и FOXP3+Tregs, подавляющих плодовый антиматеринский иммунитет, сохраняющийся вплоть до совершеннолетия (Mold et al., 2008). Микрохимеризм, обнаруживаемый у потомков после рождения, тесно связан с ювенильными идиопатическими воспалительными миопатиями (Reed et al., 2000). Дифференцированные материнские клетки, экспрессирующие сердечный альфа-актин, присутствуют у новорожденных с аутоиммунным синдромом невротической волчанки и врожденным пороком сердца (Stevens et al., 2003). Эти результаты показывают одну из форм антиген-специфической толерантности у людей, индуцированную в период внутриутробного развития и, вероятно, играющую значимую роль в регулировании иммунных реакций у потомков.

Трансплацентарный перенос иммуноглобулинов. Молекулярные комплексы, циркулирующие в материнской крови, отделены от плодовой циркуляции плацентарным барьером, который состоит из двух слоев многоядерных клеток синцитиотрофобласта и эндотелиальных клеток плодовых капилляров. Кроме того, фибробласты и плацентарные макрофаги, находящиеся в строме ворсинок, участвуют в захвате и связывании иммунных комплексов (Simister, 1998). Тем не менее большинство соединений с низкой молекулярной массой (< 500 ДА) диффундируют через плацентарную ткань. Вещества с высокой молекулярной массой обычно не проходят через плаценту, но есть несколько исключений, такие как IgG, который имеет молекулярную массу приблизительно 160 кДА. Установлено, что специфический перенос IgG осуществляется путем связывания иммуноглобулина Fc-рецептором плода (Simister, 1989). Этот иммунный комплекс индуцирует натуральные киллеры, которые активируют экспрессию провоспалительных цитокинов IFN и TNFα (Anegon et

al., 1988). Уровень IgG у новорожденных обычно коррелирует с уровнем материнских антител. Количество передаваемого иммуноглобулина зависит от числа клеточных рецепторов, поскольку несвязанные молекулы IgG перевариваются лизосомальными ферментами визикул (Saji et al., 1994). Транспорт материнских иммуноглобулинов в период беременности варьирует в зависимости от уровней общего и специфических IgG и, таким образом, от природы антигена, стадии беременности и целостности плаценты (Palmeira et al., 2012). В целом можно предположить, что хорошая реакция матерей на вакцинацию и способность к переносу своего репертуара антител к плодам повышает защищенность потомков во время внутриутробного развития и после рождения.

Иммуномодулирующее влияние естественного вскармливания

У новорожденных иммунная защита обеспечивается только механизмами врожденного иммунитета и факторами гуморального иммунитета матерей. Частично эту функцию выполняют иммуноглобулины, поступившие путем трансплацентарного переноса в период беременности, которые фиксируются на протяжении первых 6–12 мес. жизни человека. Окончательное формирование механизмов иммунной защиты происходит под влиянием иммунных факторов, поступающих в организм с молоком матери. Грудное молоко человека содержит в большом количестве различные иммуноактивные компоненты, включая белки, цитокины, гормоны, иммуноглобулины, рецепторы бактериальной ЛПС, экзосомы, содержащие микроРНК, и жизнеспособные иммунные клетки. Роль иммуноглобулинов грудного молока в пассивной передаче иммунитета общепринята. Показано, что иммуноглобулины из молока многих видов животных переносятся через неонатальный кишечный эпителий в кровоток (Van de Perre, 2003). Тем не менее иммуномодулирующие эффекты грудного молока сохраняются после прекращения грудного вскармливания, несмотря на элиминацию материнских иммуноглобулинов из кровообращения потомков, вплоть до зрелого возраста.

Человеческое грудное молоко и особенно раннее молозиво содержит измеримые уровни лейкоцитов 5×10^6 клеток/мл, их число уменьшается в 10 раз в зрелом молоке. Но эти клетки проникают в организм ребенка и выживают, в частности, в пейеровых бляшках (Jackson, Nazar, 2006). У взрослых мышей линий C57BL/6J (CD45.2+CD45.12), конгенной B6-SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ (CD45.1+CD45.22), с нокаутом по MHC II (B6.129-S2-H2dlAb1-Ea/J) и трансгенных UBI-GFP/BL6GFP, выкормленных приемными кормилицами, которые были иммунизированы за семь дней до спаривания убитой микобактерией туберкулеза (Mycobacterium tuberculosis H37 Ra), увеличивается число CD8+T-клеток по сравнению с потомками контрольной группы мышей, выкормленных собственными неиммунизированными матерями (Ghosh et al., 2016). Более того, результаты этого исследования показали, что из всего разнообразия иммунных клеток материнского молока в тканях потомков обнаруживаются только Т-клетки матерей. Установлено, что в период выкармливания Т-клетки матери, значительная часть которых относится к CD4+ MHC класса II+, накапливаются в тимусе и селезенке выкармливаемого потомства. В возрасте 12 нед среди Т-клеток потомков ~10 % имели материнское происхождение, а чувствительные к иммуногену CD8+T-клетки сохранялись у потомков и в возрасте одного года (Ghosh et al., 2016). Эта первая работа, показывающая, что спаривание и фертилизация, происходящие после однократной антигенной иммунной стимуляции, оказывают значимое влияние на формирование фенотипа материнских иммунокомпетентных клеток в период беременности. В свою очередь, сформированный в этот онтогенетический период фенотип материнских иммунокомпетентных клеток, поступающих в организм потомков с молоком матери, играет ключевую роль в развитии зрелой иммунной системы. В частности, результаты, представленные в этой работе, показывают, что фенотип материнских иммунокомпетентных клеток, сформированный в результате преиммунизации приемных матерей, в большей степени стимулирует формирование провоспалительного типа иммунного ответа у взрослых потомков, обеспечивающего их лучшую защиту от патогенов. Авторы приходят к заключению, что преиммунизация как средство направленной модуляции материнского иммунитета может послужить основой для оптимизации стратегий вакцинации против заболеваний, требующих активации клеточного иммунного ответа.

Заключение

Многочисленные клинические и экспериментальные исследования обосновывают исключительную значимость иммуногенетических взаимодействий организмов матери и эмбрионов в формировании защитных функций потомков. Следует отметить, что большая часть исследований, выполненных в этой области, посвящена изучению роли трансплацентарного и молочного переносов материнских иммунных комплексов и иммунных клеток в формировании механизмов иммунной защиты, т. е. роли постимплантационного и раннего постнатального периодов развития. Вместе с тем гуморальный диалог матери и плода формируется уже на преимплантационной стадии, обеспечивая иммунологическую толерантность материнского организма к эмбриональным антигенам. В свою очередь, молекулярные паттерны, определяющие развитие иммуносупрессивных механизмов в организме матери, оказывают значимое влияние на успешность эмбрионального развития, а также адаптивные свойства потомков. Эмбриональное развитие в условиях преобладания во внутриматочной среде гормонов, ростовых факторов, цитокинов и иммунных клеток иммуносупрессивного действия, а также завершенность становления иммунной системы в пренатальный период развития обусловливают особую уязвимость новорожденных к патогенам среды, с которой их организм сталкивается после рождения. В этих условиях формирование фенотипа материнских Т-лимфоцитов, обусловленное иммуногенетическим диалогом мать–эмбрион, и последующий трансплацентарный и молочный перенос этих молекулярных иммунных комплексов и Т-клеток обеспечивают компенсацию дефицита цитотоксических Т-лимфоцитов у новорожденных. Несмотря на фундаментальную и практическую значимость этих исследований, представленных огромным числом

публикаций (PubMed), нам еще предстоит ответить на многие вопросы, в том числе изучить:

– влияние генетической изменчивости молекулярных факторов врожденного иммунитета матери и динамики их экспрессии при беременности на устойчивость к инфекциям новорожденных;
– взаимосвязь между показателями гуморального и клеточного иммунитета новорожденных и влияние физиологических медиаторов на клеточные реакции в постнатальный период развития;
– формирование иммунной памяти и ее поддержание на протяжении всей жизни;
– эпигенетические механизмы пренатальной иммуномодуляции потомков.

Acknowledgements

This study was supported by the Russian Foundation for Advanced Research Projects in the Defense Industry, project 6/099/2017av, and State Budgeted Project 0324-2018-0016. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (ICG SB RAS) was supported by the Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Остин К., Шорт Р. Гормональная регуляция размножения у млекопитающих. М., 1989.
[Austin K., Short R. (Eds.) Reproduction in Mammals. Vol. 3. Hormonal Control of Reproduction. London, Cambridge University Press, 1984. (Russ. ed.: Ostin K., Short R. (Eds.) Hormonal Control of Reproduction in Mammals. Moscow, 1989.)]

Anegon M., Cuturi C., Trinchieri G., Perussia B. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. J. Exp. Med. 1988;167(2):452-472.

Apps R., Sharkey A., Gardner L., Male V., Kennedy P., Masters L., Farrell L., Jones D., Thomas R., Moffett A. *Ex vivo* functional responses to HLA-G differ between blood and decidual NK cells. Mol. Hum. Reprod. 2011;17(9):577-586. DOI 10.1093/molehr/gar022.

Asirvatham A.L., Johnson G.A., Belden E.L., Van Kirk E.A., Moss G.E., Murdoch W.J. Immunization of mice against a synthetic N-terminal extracellular domain gonadotropin-releasing hormone receptor peptide: evidence for a direct uterine effect. Am. J. Reprod. Immunol. 1994;32(2):95-100. DOI 10.1111/j.1600-0897.1994.tb01099.x.

Babulas V., Factor-Litvak P., Goetz R., Schaefer C.A., Brown A.S. Prenatal exposure to maternal genital and reproductive infections and adult schizophrenia. Am. J. Psychiatry. 2006;163:927-929. DOI 10.1176/ajp.2006.163.5.927.

Barnea E.R., Kirk D., Paidas M.J. preimplantation factor (PIF) promoting role in embryo implantation: increases endometrial Integrin-α2β3, amphiregulin and epiregulin while reducing betacellulin expression via MAPK in decidua. Reprod. Biol. Endocrinol. 2012; 10(50). DOI 10.1186/1477-7827-10-50.

Bianchi D.W. Fetomaternal cell trafficking: a story that begins with prenatal diagnosis and may end with stem cell therapy. Robert E. Gross Lecture. J. Pediatr. Surg. 2007;42(1):12-18. DOI 10.1016/j.jpedsurg.2006.09.047.

Bianchi D.W., Zickwolf G.K., Weil G.J., Sylvester S., DeMaria M.A. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996;93(2):705-708. DOI 10.1073/pnas.93.2.705.

Bilbo S.D., Schwarz J.M. The immune system and developmental programming of brain and behavior. Front. Neuroendocrinol. 2012; 33(3):267-286. DOI 10.1016/j.yfrne.2012.08.006.

Billingham R.E., Brent L., Medavar P.B. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature. 1953;172(4379) 603-606.

Brown A.S., Begg M.D., Gravenstein S., Schaefer C.A., Wyatt R.J., Bresnahan M., Babulas V.P., Susser E.S. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. Arch. Gen. Psychiatry. 2004;61(8):774-780. DOI 10.1001/archpsyc.61.8.774.

Carr B.R., MacDonald P.C., Simpson E.R. The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. Fertil. Steril. 1982;38(3):303-311. DOI 10.1016/S0015-0282(16)46511-8.

Casan E.M., Raga F., Kruessel J.S., Wen Y., Nezhat C., Polan M.L. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone expression in cycling human endometrium of fertil patients. Fertil. Steril. 1998;70(1):102-106. DOI 10.1016/S0015-0282(98)00125-3.

Chatterjee-Hasrouni S., Lala P.K. MHC antigens on mouse trophoblast cells: paucity of Ia antigens despite the presence of H-2K and H-2D. J. Immunol. 1981;127:2070-2073.

Chen S.J., Liu Y.L., Sytwu H.K. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. Clin. Dev. Immunol. 2012;2012:258-391. DOI 10.1155/2012/258391.

Choi B., Polgar C., Xiao K.L., Hill J.A. Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. Hum. Reprod. 2000;15(1):46-59. DOI 10.1093/humrep/15.suppl_1.46.

Choudhury S.R., Knapp L.A. Human reproductive failure II: Imunogenetic and interacting factors. Hum. Reprod. Update. 2001;7(2):135-160. DOI 10.1093/humupd/7.2.135.

Contini P., Ghio M., Poggi A., Filaci G., Indiveri F., Ferrone S., Puppo F. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. Eur. J. Immunol. 2003;33(1):125-134.

Das S.K., Wang X.-N., Paria B.C., Damm D., Abraham J.A., Klagsbrun M., Andrews G.K., Dey S.K. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. Development. 1994;120:1071-1083.

Dietert R.R., Dietert J.M. Potential for early-life immune insult including developmental immunotoxicity in autism and autism spectrum disorders: focus on critical windows of immune vulnerability. J. Toxicol. Environ. Health. Part B. 2008;11(8):660-680. DOI 10.1080/10937400802370923.

Duncan W.C. The human corpus luteum: remodelling during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. Rev. Reprod. 2000;5:12-17. DOI 10.1530/ror.0.0050012.

Ehring G.R., Kerschbaum H.H., Eder C., Neben A.L., Fanger C.M., Khoury R.M., Negulescu P.A., Cahalan M.D. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: Inhibition of K^+ channels, Ca^{2+} signaling, and gene expression in T lymphocytes. J. Exp. Med. 1998;188(9):1593-1602. DOI 10.1084/jem.188.9.1593.

Ellman L.M. The promise of epidemiologic studies: Neuroimmune mechanisms in the etiologies of brain disorders. Neuron. 2009; 64(1):25-27.

Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. Annu. Rev. Immunol. 2013;31:387-411. DOI 10.1146/annurev-immunol-032712-100003.

Fishel S.B., Edwards R.G., Evans C.J. Human chorionic gonadotropin secreted by preimplantation embryos cultured *in vitro*. Science. 1984;223(4638):816-818.

Francisco R., Casan E.V., Kruessel J., Wen Y., Bonilla-Musoles F., Polan M.L. The role of gonadotropin-releasing hormone in murine preimplantation embryonic development. Endocrinology. 1999;140(8): 3705-3712. DOI 10.1210/endo.140.8.6899.

Gallego M.G., Porayette P., Kaltcheva M.M., Bowen R.L., Vadakkadath Meethal S., Atwood C.S. The pregnancy hormones human

chorionic gonadotropin and progesterone induce human embryonic stem cell proliferation and differentiation into neuroectodermal rosettes. Stem Cell Res. Ther. 2010;1(28):2-13. DOI 10.1186/scrt28.

Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. Influence of genetic dissimilarity of mother and fetus on progesterone concentrations in pregnant mice and adaptive features of offspring. Reproduction. 2001;121:409-417.

Gerlinskaya L., Moshkin M., Evsikov V. Allogenic stimulation in early pregnancy improves pre- and postnatal ontogenesis in BALB/cLac mice. J. Reprod. Dev. 2000;46(6):387-396. DOI 10.1262/jrd.46.387.

Ghosh M.K., Nguyen V., Muller H.K., Walker A. Maternal milk T cells drive development of transgenerational Th1 immunity in offspring thymus. J. Immunol. 2016;197:2290-2296. DOI 10.4049/jimmunol.1502483.

Guo G., Huss M., Guo Q.T., Wang C., Sun L., Neil D. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. Dev. Cell. 2010;18:675-685. DOI 10.1016/j.devcel.2010.02.012.

Hardy K., Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. J. Endocrinol. 2002;172:221-236. DOI 10.1677/joe.0.1720221.

Hearn J.P., Gidley-Baird A.A., Hodges J.K., Summers P.M., Webley G.E. Embryonic signals during the peri-implantation period in primates. J. Reprod. Fertil. 1988;36:49-58.

Herrler A., Von Rango U., Beier H.M. Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. Reprod. BioMed. 2003;6(2):244-256.

Hiby S.E., Apps R., Sharkey A.M., Gardner L., Mulder A., Claas F., Walker J., Redman C., Morgan L., Tower C., Regan L. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. J. Clin. Invest. 2010;120(11):4102-4110. DOI 10.1172/JCI43998DS1.

Hiby S.E., Walker J.J., O'Shaughnessy K.M., Redman C.W., Carrington M., Trowsdale J., Redman C., Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. J. Exp. Med. 2004;200(8):957-965. DOI 10.1084/jem.20041214.

Hunt J.S. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. FASEB J. 2005;19:681-693. DOI 10.1096/fj.04-2078rev.

Hunt J.S., Orr H.T. HLA and maternal-fetal recognition. FASEB J. 1992;6:2344-2348.

Jackson K.M., Nazar A.M. Breastfeeding, the immune response, and long-term health. J. Am. Osteopath. Assoc. 2006;106:203-207.

Kelemen K., Bognar I., Paal M. A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. Cell Immunol. 1996;1(67):129-134.

Khosla S., Dean W., Brown D., Reik W., Feil R. Culture of pleimplantaion mouse embryos affects fetal development and expression of imprinted genes. Biol. Reprod. 2001;64:918-926. DOI 10.1095/biolreprod64.3.918.

King A., Allen D.S., Bowen M., Powis S., Joseph S., Verma S., Hiby S., McMichael A., Loke Y., Braud V. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. Eur. J. Immunol. 2000;30:1623-1631. DOI 10.1002/1521-4141(200006)30:6.

King A., Burrows T., Hiby S., Bowen J.M., Joseph S., Verma S., Lim P.B., Gardner L., Le Bouteiller P., Ziegler A. Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. Placenta. 2000;21:376-387. DOI 10.1053/plac.1999.0496.

Klonisch T., Drouin R. Fetal-maternal exchange of multipotent stem/progenitor cells: microchimerism in diagnosis and disease. Trends Mol. Med. 2009;15(11):510-518. DOI 10.1016/j.molmed.2009.09.002.

Kyurkchiev D., Ivanova-Todorova E., Kyurkchiev S.D. New target cells of the immunomodulatory effects of progesterone. Reprod. Biomed. Online. 2010;21(3):304-311. DOI 10.1016/j.rbmo.2010.04.014.

Licht P., Fluhr H., Neuwinger J., Wallwiener D., Wildt L. Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? Mol. Cell. Endocrinol. 2007;269:85-92. DOI 10.1016/j.mce.2006.09.016.

Licht P., Russu V., Wildt L. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. Semin. Reprod. Med. 2001;19(1):37-47. DOI 10.1055/s-2001-13909.

Loubiere L.S. Maternal microchimerism in healthy adults in lymphocytes, monocyte/macrophages and NK cells. Lab. Invest. 2006;86(11):1185-1192.

Mallet V., Proll J., Solier C., Aguerre-Girr M., DeRossi M., Loke Y.W., Lenfant F., Le Bouteiller P. The full length HLA-G1 and no other alternative form of HLA-G is expressed at the cell surface of transfected cells. Hum. Immunol. 2000;61:212-224. DOI 10.1016/S0198-8859(99)00166-4.

Mao G., Wang J., Kang Y., Tai P., Wen J., Zou Q., Li G., Ouyang H., Xia G., Wang B. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of $CD4^+CD25^+$ Treg cells during midterm pregnancy in mice. Endocrinology. 2010;51(11):5477-5488. DOI 10.1210/en.2010-0426.

Marleau A.M., Greenwood J.D., Wei Q., Singh B., Croy B.A. Chimerism of murine fetal bone marrow by maternal cells occurs in late gestation and persists into adulthood. Lab. Invest. 2003;83(5):673-681.

Moffett A., Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. Nat. Rev. Immunol. 2006;6(8):584-594. DOI 10.1038/nri1897.

Mold J.E., McCune J.M. Immunological tolerance during fetal development: from mouse to man. Adv. Immunol. 2012;(115):73-111. DOI 10.1016/b978-0-12-394299-9.00003-5.

Mold J.E., Michaëlsson J., Burt T.D., Muench M.O., Beckerman K.P., Busch M.P., Lee T.H., Nixon D.F., McCune J.M. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. Science. 2008;322(5907):1562-1565. DOI 10.1126/science.1164511.

Paidas M.J., Krikun G., Huang S.J., Jones R., Romano M., Annunziato J., Barnea E.R. A genomic and proteomic investigation of the impact of preimplantation factor on human decidual cells. Am. J. Obstet. Gynecol. 2010;202(5):459. DOI 10.1016/j.ajog.2010.03.024.

Palmeira P., Quinello C., Silveira-Lessa A.L., Zago C.A., Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. Clin. Dev. Immunol. 2012;2012:985646. DOI 10.1155/2012/985646.

Pampfer S., Wuu Y., Vanderheyden I., De Hertogh R. Expression of tumour necrosis factor α (TNFα) receptors and selective effect of TNFα on the inner cell mass in mouse blastocysts. Endocrinology. 1994;134:206-212.

Pazmany L., Mandelboim O., Vales-Gomez M., Davis D.M., Reyburn H.T., Strominger J.L. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. Science. 1996;274:792-795. DOI 10.1126/science.274.5288.792.

Pidoux G., Gerbaud P., Tsatsaris V., Marpeau O., Ferreira F., Meduri G., Guibourdenche J., Badet J., Evain-Brion D., Frendo J.L. Biochemical characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation. J. Cell Physiol. 2007;212:26-35. DOI 10.1002/jcp.20995.

Prager D., Weber M.M., Herman-Bonert V. Placental growth factors and releasing/inhibiting peptides. Semin. Reprod. Endocrinol. 1992;10:83-91. DOI 10.1055/s-2007-1018864.

Raga F., Casan E.M., Kruessel J.S., Wen Y., Huang H.Y., Nezhat C., Polan M.L. Quantitative gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression and immunohistochemical localization in human endometrium throughout the menstrual cycle. Biol. Reprod. 1998;59:661-669. DOI 10.1095/biolreprod59.3.661.

Raghupathy R., Al-Mutawa E., Al-Azemi M., Makhseed M., Azizieh F., Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. J. Reprod. Immunol. 2009;80(1-2):91-99. DOI 10.1016/j.jri.2009.01.004.

Raghupathy R., Al Mutawa E., Makhseed M., Azizieh F., Szekeres-Bartho J. Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. Brit. J. Obset.

Gynecol. 2005;112(8):1096-1101. DOI 10.1111/j.1471-0528.2005.00633.x.

Rajagopalan S. Endosomal signaling and a novel pathway defined by the natural killer receptor KIR2DL4 (CD158d). Traffic. 2010;11(11):1381-1390. DOI 10.1111/j.1600-0854.2010.01112.x.

Rajagopalan S., Bryceson Y.T., Kuppusamy S.P., Geraghty D.E., van der Meer A., Joosten I., Long E.O. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. PLoS Biol. 2006;4(1):e9. DOI 10.1371/journal.pbio.0040009.

Reed A.M., Picornell Y.J., Harwood A., Kredich D.W. Chimerism in children with juvenile dermatomyositis. Lancet. 2000;322(356):2156-2157. DOI 10.1016/S0140-6736(00)03500-5.

Robertson S.A. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. Cytokine Growth Factor Rev. 2007;18:287-298. DOI 10.1016/j.cytogfr.2007.04.008.

Robertson S.A., Chin P.Y., Glynn D.J., Thompson J.G. Peri-conceptual cytokines – setting the trajectory for embryo implantation, pregnancy and beyond. Am. J. Reprod. Immunol. 2011;66(1):2-10. DOI 10.1111/j.1600-0897.2011.01039.x.

Robertson S.A., Seamark R.F., Guilbert L.J., Wegmann T.G. The role of cytokines in gestation. Crit. Rev. Immunol. 1994;14:239-292. DOI 10.1615/CritRevImmunol.v14.i3-4.30.

Robertson S.A., Sjöblom C., Jasper M.J., Norman R.J., Seamark R.F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. Biol. Reprod. 2001;64(4):1206-1215. DOI 10.1095/biolreprod64.4.1206.

Saji F., Koyama M., Matsuzaki N. Current topic: human placental Fc receptors. Placenta. 1994;15(5):453-466.

Seshagiri P.B., Terasawa E., Hearn J.P. The secretion of gonadotropin-releasing hormone by peri-implantation embryos of the rhesus monkey: comparison with the secretion of chorionic gonadotropin. Hum. Reprod. 1994;9(7):1300-1307.

Sharkey A.M., Dellow K., Blayney M. Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. Biol. Reprod. 1995;53(4):974-981.

Sharkey A.M., Gardner L., Hiby S., Farrell L., Apps R., Masters L., Moffett A. Killer Ig-like receptor expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age. J. Immunol. 2008;181:39-46.

Simister N.E. Human placental Fc receptors and the trapping of immune complexes. Vaccine. 1998;16(14-15):1451-1455. DOI 10.1016/S0264-410X(98)00107-8.

Simister N.E., Mostov K.E. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. Nature. 1989;336(6203):184-187. DOI 10.1038/337184a0.

Singh P., Krishna A. Effects of GnRH agonist treatment on steroidogenesis and folliculogenesis in the ovary of cyclic mice. J. Ovarian Res. 2010;3(26). DOI 10.1186/1757-2215-3-26.

Sjoblom C., Wikland M., Robertson S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. Biol. Reprod. 2002;67:1817-1823. DOI 10.1095/biolreprod.101.001503.

Srisuparp S., Strakova Z., Fazleabas A.T. The role of chorionic gonadotropin (CG) in blastocyst implantation. Arch. Med. Res. 2001;32(6):627-634. DOI 10.1016/S0188-4409(01)00330-7.

Stevens A.M., Hermes H.M., Rutledge J.C., Buyon J.P., Nelson J.L. Myocardial tissue-specific phenotype of maternal microchimerism in neonatal lupus congenital heart block. Lancet. 2003;362:1617-1623. DOI 10.1016/S0140-6736(03)14795-2.

Strakova Z., Srisuparp S., Fazleabas A.T. Interleukin-1beta induces the expression of insulin-like growth factor binding protein-1 during decidualization in the primate. Endocrinology. 2000;141(12):4664-4670. DOI 10.1210/en.141.12.4664.

Su E.C., Johnson K., Tighiouart H., Bianchi D. Murine maternal cell microchimerism: analysis using real-time PCR and *in vivo* imaging. Biol. Reprod. 2008;78:883-887. DOI 10.1095/biolreprod.107.063305.

Susser E.S., Schaefer C.A., Brown A.S., Begg M.D., Wyatt R.J. The design of the prenatal determinants of schizophrenia study. Schizophr. Bull. 2000;26(2):257-273. DOI 10.1093/oxfordjournals.schbul.a033451.

Sykes L., MacIntyre D.A., Yap X.J., Teoh T.G., Bennett P.R. The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. Mediators Inflamm. 2012;967:6-29. DOI 10.1155/2012/967629.

Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. Int. Rev. Immunol. 2002;21(6):471-495. DOI 10.1080/08830180215017.

Tilburgs T., Scherjon S.A., van der Mast B.J. Fetal-maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells. J. Reprod. Immunol. 2009;82(2):148-157. DOI 10.1016/j.jri.2009.05.003.

Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. Vaccine. 2003;21:3374-3376. DOI 10.1016/S0264-410X(03)00336-0.

Verma S., King A., Loke Y.W. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. Eur. J. Immunol. 1997;27:979-983.

Wegmann T.G., Lin H., Guilbert L., Mosmann T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol. Today. 1993;14(7):353-356.

Williams C.L., Teeling J.L., Perry V.H., Fleming T.P. Mouse maternal systemic inflammation at the zygote stage causes blunted cytokine responsiveness in lipopolysaccharide-challenged adult offspring. BMC Biol. 2011;19(9):49. DOI 10.1186/1741-7007-9-49.

Witkin S., Liu H.-C., Davis O.K., Rosenwatz Z. Tumor necrosis factor is present in maternal sera and embryo culture fluids during *in vitro* fertilization. J. Reprod. Immunol. 1991;19(1):85-93. DOI 10.1016/0165-0378(91)90008-E.

Woodward B.J., Lenton E.A., Turner K. Human chorionic gonadotrophin: embryonic secretion is a time-dependent phenomenon. Hum. Reprod. 1993;8(9):1463-1468.

Yamada H., Morikawa M., Furuta I. Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. Am. J. Reprod. Immunol. 2003;49(2):84-89. DOI 10.1034/j.1600-0897.2003.01184.x.

Zhao X.A., Cang M., Yuan J.L., Wang Z.G., Yang M.L., Gao X.Y. Interleukin-6 and its receptor in the development of *in vitro* fertilized ovine embryos. Small Ruminant Res. 2012;102:43-50. DOI 10.1016/j.smallrumres.2011.09.011.

Zimmermann G., Ackermann W., Alexander H. Epithelial human chorionic gonadotropin is expressed and produced in human secretory endometrium during the normal menstrual cycle. Biol. Reprod. 2009;80(5):1053-1065. DOI 10.1095/biolreprod.108.069575.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1020-1025
DOI 10.18699/VJ18.445

Использование вектора на основе вируса Сендай для эффективной трансдукции фибробластов ластоногих

В.Р. Беклемишева[1], А.Г. Мензоров[2, 3] ✉

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

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) млекопитающих расширило возможности изучения плюрипотентности и раннего эмбрионального развития. В литературе описаны ИПСК собаки (*Canis lupus familiaris*) и снежного леопарда (*Panthera uncia*), представителей отряда Carnivora. Ранее нами получены ИПСК американской норки (*Neovison vison*). Целью настоящего исследования был поиск условий для репрограммирования фибробластов ластоногих – представителей каноидной (Caniformia) ветви Хищных с консервативными геномами. Для создания ИПСК можно использовать различные системы доставки репрограммирующих транскрипционных факторов (РНК, белки, плазмиды, векторы на основе вирусов и др.). Наиболее эффективные системы доставки для клеток мыши и человека основаны на применении различных вирусных векторов. Мы сравнили две системы доставки репрограммирующих факторов: встраивающиеся в геном лентивирусные векторы и вектор на основе вируса Сендай – CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter. Преимущества векторов на основе вируса Сендай по сравнению с лентивирусами – отсутствие встройки в геном. Проведено тестирование доставки генетических конструкций, кодирующих флуоресцентный белок, на культурах фибробластов семи видов ластоногих: северного морского котика (*Callorhinus ursinus*), северного морского льва (*Eumetopias jubatus*), моржа (*Odobenus rosmarus*), морского зайца (*Erignathus barbatus*), байкальской нерпы (*Pusa sibirica*), кольчатой нерпы (*Phoca hispida*) и пестрой нерпы (*Phoca largha*). В качестве контроля были трансдуцированы фибробласты американской норки (*N. vison*), человека (*Homo sapiens*) и мыши (*Mus musculus*). Мы показали, что система трансдукции на основе вируса Сендай обеспечивает уровень экспрессии трансгена на один-два порядка выше, чем при использовании лентивирусов при сходном числе вирусов на клетку. Кроме того, экспрессия трансгена при применении вектора на основе вируса Сендай достаточно стабильна и незначительно изменяется на четвертый день трансдукции по сравнению со вторым днем. Полученные данные позволяют предположить, что трансдукция фибробластов ластоногих с помощью вируса Сендай предпочтительна для получения ИПСК ластоногих.

Ключевые слова: Хищные; тюлени; морж; репрограммирование; ИПСК; вирус Сендай; CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter.

Use of a Sendai virus-based vector for efficient transduction of pinniped fibroblasts

V.R. Beklemisheva[1], A.G. Menzorov[2, 3] ✉

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

Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells expanded possibilities of pluripotency and early development studies. Generation of order Carnivora iPS cells from dog (*Canis lupus familiaris*), snow leopard (*Panthera uncia*), and American mink (*Neovison vison*) was previously reported. The aim of the current study was to examine conditions of pinniped fibroblast reprogramming. Pinnipeds are representatives of the suborder Caniformia sharing conservative genomes. There are several ways to deliver reprogramming transcription factors: RNA, proteins, plasmids, viral vectors etc. The most effective delivery systems for mouse and human cells are based on viral vectors. We compared a lentiviral vector which integrates into the genome and a Sendai virus-based vector, CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter. The main advantage of Sendai virus-based vectors is that they do not integrate into the genome. We performed delivery of genetic constructions carrying fluorescent proteins to fibroblasts of seven Pinnipeds: northern fur seal (*Callorhinus ursinus*), Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*), walrus (*Odobenus rosmarus*), bearded seal (*Erignathus barbatus*), Baikal seal (*Pusa sibirica*), ringed seal (*Phoca hispida*), and spotted seal (*Phoca largha*). We also transduced American mink (*N. vison*), human (*Homo sapiens*), and mouse (*Mus musculus*) fibroblasts as a control. We showed that the Sendai virus-based transduction system provides transgene expression one-two orders of magnitude higher than the lentiviral system at a comparable multiplicity of infection. Also, transgene expression after Sendai virus-based transduction is quite stable and changes only slightly at day four compared to day two. These data allow us to suggest that Sendai virus-based vectors are preferable for generation of Pinniped iPS cells.

Key words: Carnivora; seals; walrus; reprogramming; iPS cells; Sendai virus; CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Беклемишева В.Р., Мензоров А.Г. Использование вектора на основе вируса Сендай для эффективной трансдукции фибробластов ластоногих. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1020-1025. DOI 10.18699/VJ18.445

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Beklemisheva V.R., Menzorov A.G. Use of a Sendai virus-based vector for efficient transduction of pinniped fibroblasts. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1020-1025. DOI 10.18699/VJ18.445 (in Russian)

Received August 1, 2018
Revised October 27, 2018
Accepted October 28, 2018

✉ e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) мыши (Takahashi, Yamanaka, 2006), человека (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) и нескольких других видов млекопитающих существенно упростило изучение эмбрионального развития и дифференцировки. Ранее были получены ИПСК таких представителей отряда Хищных, как собака (Shimada et al., 2010; Lee et al., 2011; Luo et al., 2011; Koh et al., 2012; Whitworth et al., 2012; Baird et al., 2015) и снежный леопард (Verma et al., 2012). Недавно мы получили ИПСК американской норки (Menzorov et al., 2015). Мы решили изучить возможность получения ИПСК другой группы Хищных – ластоногих. В качестве первого шага проведено тестирование на культурах фибробластов семи видов ластоногих двух систем доставки трансгенов: 1) встраивающиеся в геном лентивирусные векторы (система LeGO, http://www.lentigo-vectors.de/vectors.htm) и 2) вектор на основе вируса Сендай, работающий в цитоплазме (CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter).

Материалы и методы

Культивирование клеток. Использованы первичные культуры фибробластов ластоногих из Коллекции культур клеток Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Клеточные культуры получены из образцов тканей животных (биопсии либо некропсии), обитающих в прибрежных водах Российской Федерации, – это северный морской котик (*Callorhinus ursinus*), северный морской лев (сивуч) (*Eumetopias jubatus*), морж (*Odobenus rosmarus*), морской заяц (лахтак) (*Erignathus barbatus*), байкальская нерпа (*Pusa sibirica*), кольчатая нерпа (акиба) (*Phoca hispida*), пестрая нерпа (ларга) (*Phoca largha*). Фибробласты американской норки (*Neovison vison*), человека (*Homo sapiens*) и эмбриональные фибробласты мыши (*Mus musculus*) (C57BL) получены в ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» Института цитологии и генетики СО РАН. Мыши линии C57BL для получения фибробластов были предоставлены ЦКП «SPF-виварий» (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Культивирование фибробластов ластоногих аналогично описанному ранее для эмбриональных фибробластов американской норки, культивирование клеток Phoenix описано в работе (Пристяжнюк, Мензоров, 2017). Фибробласты мыши и человека культивировали в среде для Phoenix.

Трансдукция клеток. Протокол трансдукции фибробластов лентивирусами представлен ранее (Пристяжнюк, Мензоров, 2017). Трансдукцию фибробластов CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter (CytoTune-EmGFP) (Thermo Fisher Scientific, Япония) проводили, согласно рекомендациям производителя.

Протокол эксперимента представлен на рис. 1 (*а* и *б*): за день до трансдукции фибробласты рассаживали на 24-луночное плато по 30 тыс. кл./см^2; в день трансдукции подсчитывали клетки; на второй и четвертый дни проводили анализ флуоресценции на проточном цитофлуориметре.

Микроскопия. Анализ флуоресценции выполняли на флуоресцентном микроскопе Zeiss Observer.Z1 (Zeiss, Германия) с использованием камеры AxioCamHRm3_S603 в ЦКП «Клеточные технологии» ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Изображения обрабатывали в программе ZEN 2 starter (Zeiss, Германия).

Цитофлуориметрия и анализ флуоресценции. Анализ флуоресценции фибробластов проводили на проточном цитофлуориметре FACSAria (BD Bioscience, США) в ЦКП «Проточной цитометрии» ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Значение флуоресценции (mean, среднее) трансдуцированных клеток не нормировали на флуоресценцию клеток без трансдукции, так как для клеток, не обработанных вирусами, значение флуоресценции было на один-три порядка ниже. Для измерения уровня флуоресценции клеток, обработанных вирусами, выставляли окно (gate) проточного цитофлуориметра так, чтобы 99.9 % нетрансдуцированных клеток не имели флуоресценции. Число вирусов на клетку (multiplicity of infection, MOI) рассчитывали следующим образом: MOI = –Ln(1 – [доля GFP+ клеток]). Среду с вирусным супернатантом при использовании в качестве вектора LeGO-G2 разбавляли в 20 раз, следовательно, реальный MOI был в 20 раз выше измеренного. Разбавление необходимо для того, чтобы увеличить точность измерения MOI. Так, при MOI = 1 ожидается, что 63.2 % клеток будут трансдуцированы, а для MOI = 4 – 98.2 %, что, с учетом ошибки проточного цитофлуориметра, не отличимо от более высокого MOI. Соответственно, реальное значение MOI для вектора LeGO-G2 рассчитывали путем умножения на 20 значения, полученного в эксперименте. Объем вируса CytoTune-EmGFP для трансдукции (день 0) рассчитывали в соответствии с рекомендациями производителя: V (мкл) = $(MOI_{selected} \times N_{expected})/(Titer \times 0.001)$, где $MOI_{selected}$ – выбранные значения для трансдукции (2 и 7.5); $N_{expected}$ – ожидаемое число клеток (60 000); Titer – титр вируса, по данным производителя (10^8). Далее рассчитывали ожидаемый $MOI_{expected}$, учитывая измеренное число клеток (N_{real}) для каждой культуры фибробластов: $MOI_{expected} = (V \times Titer \times 0.001)/N_{real}$. Для определения соотношения $MOI_{expected}$ и MOI_{real} (получен в эксперименте) использовали среднее значение соотношения для $MOI_{selected}$ = 2 и 7.5. Стандартное отклонение считали для двух экспериментальных значений MOI или средних значений флуоресценции. В случае отсутствия реплик стандартное отклонение средних значений флуоресценции брали из данных проточного цитофлуориметра.

Результаты

Анализ MOI. Схема эксперимента и примеры фотографий фибробластов на второй день после трансдукции представлены на рис. 1 (*а–г*). Примеры данных проточной цитофлуориметрии приведены на рис. 2 (*а* и *б*).

Фибробласты всех исследованных видов были успешно трансдуцированы с помощью CytoTune-EmGFP (см. рис. 2, *в*). Для всех культур MOI был ниже ожидаемого. Нужно отметить, что полученные для CytoTune-EmGFP значения MOI (0.3–2.3) в целом достаточны для получения ИПСК, при необходимости можно увеличить количество вирусных частиц до суммарного MOI = 2, так как в репрограммирующую систему CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit входят два вируса, несущих репрограммирующие факторы. Использование в качестве векторов LeGO-G2 позволило получить высокие значения

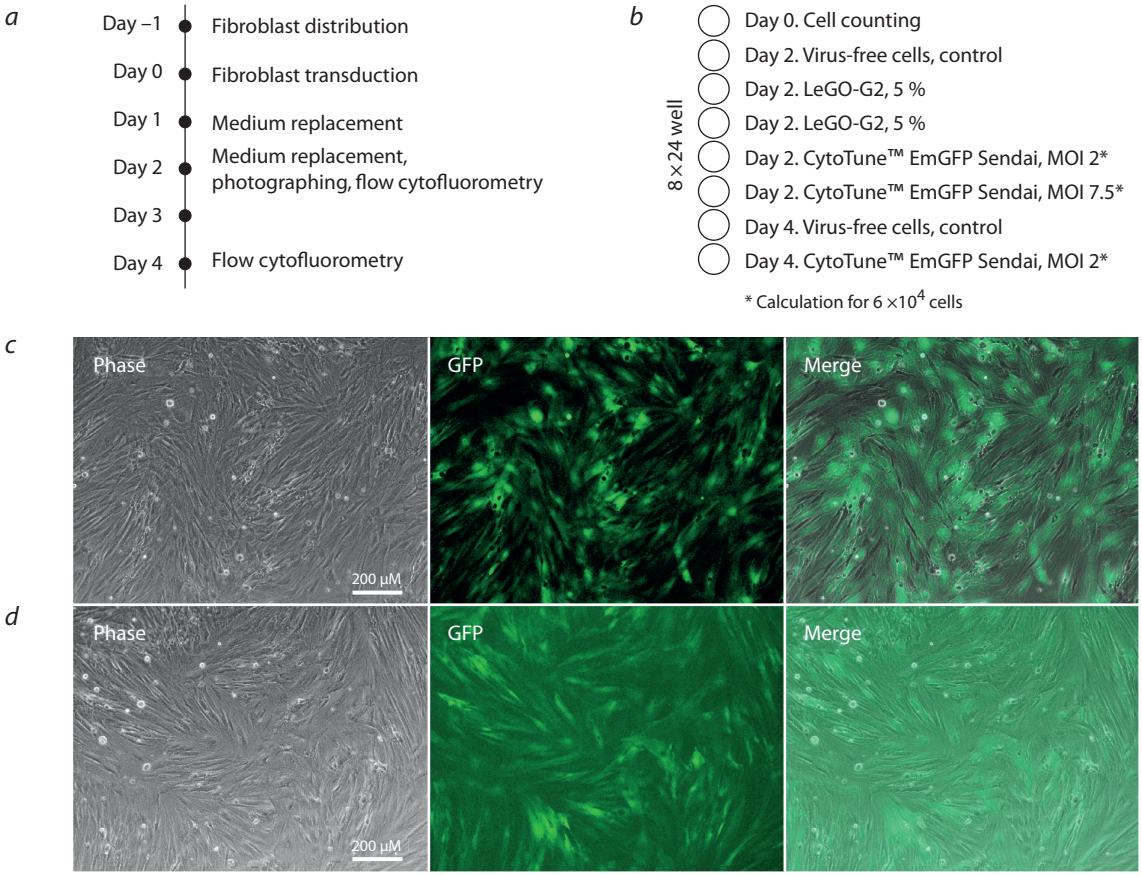


Fig. 1. Experimental design and fluorescent microscopy of fibroblasts.

(*a*) Experimental design. (*b*) Fibroblast transduction and analysis. (*c*) Day 2, bearded seal fibroblasts transduced with CytoTune™ EmGFP Sendai. (*d*) Day 2, bearded seal fibroblasts transduced with LeGO-G2.

MOI (см. рис. 2, *г*). Следует отметить очень низкое MOI для фибробластов моржа, независимая трансдукция подтвердила этот результат (данные не приведены).

Анализ флуоресценции. Значения флуоресценции GFP-позитивных клеток представлены на рис. 2 (*д* и *е*). Следует отметить, что увеличение MOI CytoTune-EmGFP в несколько раз приводит к незначительному увеличению флуоресценции (см. рис. 2, *д*). Аналогичный результат был получен для LeGO-G2 (данные не приведены).

Видно, что при сравнимых значениях MOI уровень флуоресценции для CytoTune-EmGFP на один-два порядка выше, чем для LeGO-G2 (см. рис. 2, *д* и *е*). Следует отметить, что, несмотря на низкий MOI, уровень флуоресценции GFP-позитивных фибробластов моржа сравним с флуоресценцией остальных культур клеток.

В отличие от лентивирусных векторов, векторы на основе вируса Сендай не встраиваются в геном, а находятся в цитоплазме, и, соответственно, при делении клеток разбавляются. Мы измерили уровень флуоресценции EmGFP на второй и четвертый дни (см. рис. 2, *ж*). Обнаружено, что уровень флуоресценции клеток на четвертый день сравним со таковым второго дня. Существенное падение отмечено только для фибробластов мыши (C57BL), что, вероятно, связано с их быстрым делением, и, соответственно, с быстрым уменьшением числа векторов в каждой клетке.

Высокое значение стандартного отклонения на рис. 2 (*д* и *ж*) связано с тем, что для этих измерений не было повторностей и стандартное отклонение было получено не из среднего по двум измерениям (как на рис. 2, *в*, *г*, *е*), а взято из данных проточного цитофлуориметра. Вариабельность флуоресценции объясняется различным количеством вирусных частиц, попадающих в индивидуальные клетки.

Обсуждение

Применение лентивирусов для получения ИПСК сопряжено с рисками. Во-первых, они встраиваются в геном и могут привести к нарушению экспрессии генов. Во-вторых, несмотря на замолкание ретровирусных трансгенов в ИПСК (Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007), в некоторых случаях может происходить реактивация или неполное замолкание, приводящее к увеличению онкогенного потенциала и нарушению дифференцировки. Кроме того, при дифференцировке в некоторые типы клеток может происходить спонтанная реактивация трансгенов (Galat et al., 2016). Использование неинтегрирующихся в геном векторов позволяет решить эту проблему. Векторы на основе вируса Сендай эффективно заражают различные клетки млекопитающих и не встраиваются в геном, так как функционируют в цитоплазме (Li et al., 2000). Потенциальный недостаток этих

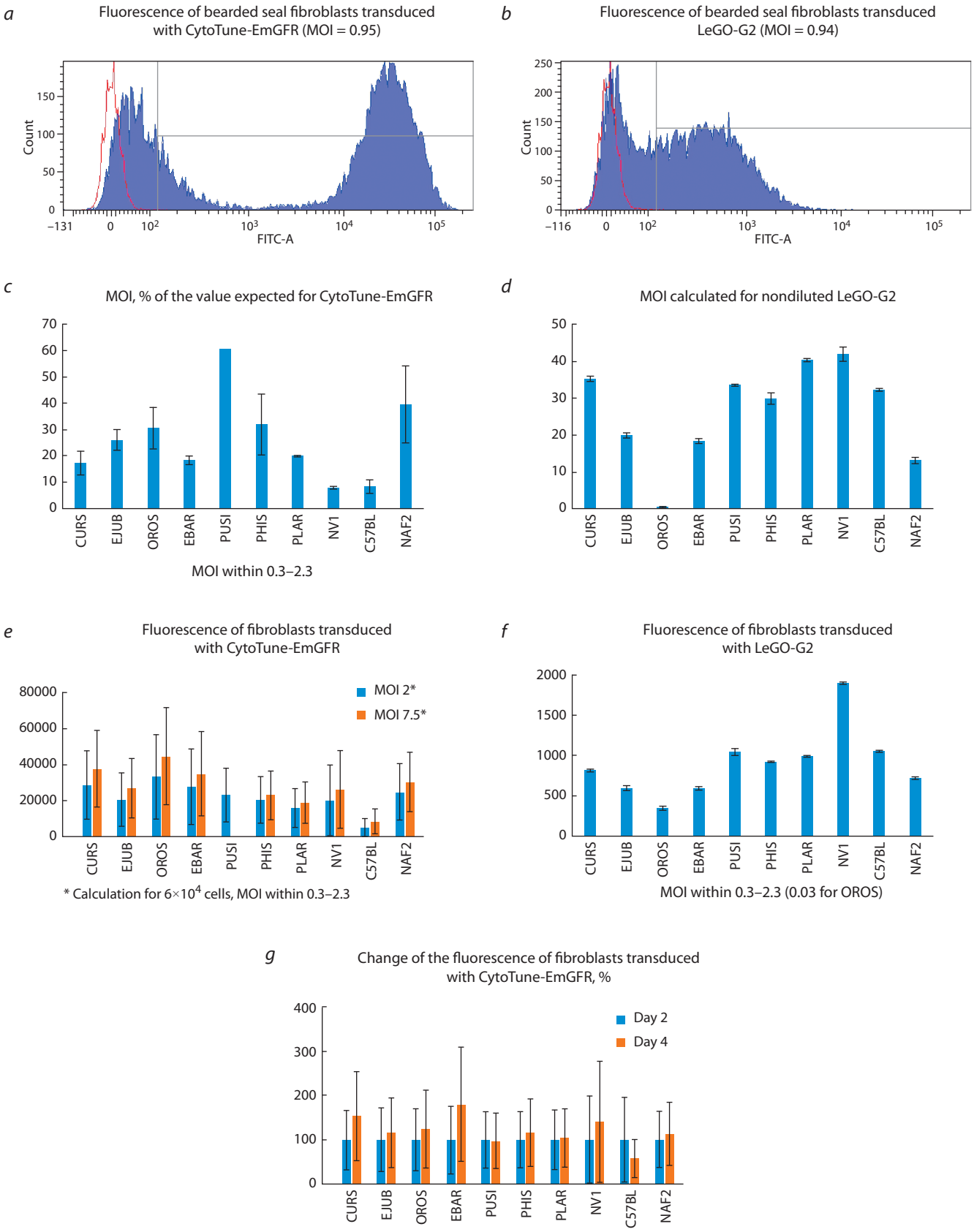


Fig. 2. Analysis of flow cytometry data. Standard deviation is calculated for two replicas (*c*, *d*, *f*) or taken from flow cytometer data for measurements without replicas (*e*, *g*).

CURS, northern fur seal (*Callorhinus ursinus*); EJUB, northern sea lion (*Eumetopias jubatus*); OROS, walrus (*Odobenus rosmarus*); EBAR, bearded seal (*Erignathus barbatus*); PUSI, Baikal seal (*Pusa sibirica*); PHIS, ringed seal (*Phoca hispida*); PLAR, spotted seal (*Phoca largha*); NV1, American mink (*Neovison vison*); C57BL, mouse (*Mus musculus*); NAF2, human (*Homo sapiens*).

векторов – после первой трансдукции клетки приобретают резистентность к вирусу. Ранее с помощью векторов на основе вируса Сендай были получены ИПСК человека (Fusaki et al., 2009), макаки-крабоеда (Coppiello et al., 2017), макаки-резус (Lu et al., 2013), шимпанзе (Fugie et al., 2014), собаки (Tsukamoto et al., 2018) и мыши (Tucker et al., 2013). Описаны также ИПСК-подобные колонии байкальской нерпы и сивуча (Борода и др., 2015), хотя из статьи неясно, использовали ли авторы векторы на основе ретровирусов или Сендай.

Мы впервые применили систему трансдукции на основе вируса Сендай CytoTune-EmGFP для фибробластов пяти видов ластоногих: северного морского котика, моржа, морского зайца (лахтака), кольчатой нерпы (акибы), пестрой нерпы (ларги). Показана возможность трансдукции фибробластов северного морского льва (сивуча), байкальской нерпы и американской норки. Сравнение флуоресценции EGFP (лентивирусный вектор LeGO-G2) и EmGFP (вектор на основе вируса Сендай CytoTune-EmGFP) выявило, что для CytoTune-EmGFP флуоресценция выше на один-два порядка. Яркость EmGFP при тестировании составляет 116 % от EGFP (Cubitt et al., 1999), что не может объяснить полученную разницу. Кроме того, на четвертый день после трансдукции мы не наблюдали снижения уровня флуоресценции. Это позволяет предположить, что, как и в случае клеток человека, использование CytoTune-iPS 2.0 репрограммирующего набора, основанного на том же векторе, что и CytoTune-EmGFP, позволит эффективно экспрессировать репрограммирующие факторы для получения ИПСК.

Для репрограмирования необходима достаточно длительная экспрессия транскрипцинных факторов. Лентивирусные векторы при репрограммировании клеток экспрессируются постоянно, до образования ИПСК. Затем, в плюрипотентных клетках, лентивирусные векторы подвергаются замолканию. При использовании для репрограммирования систем на основе вируса Сендай происходит постепенное разбавление вируса при делении клеток. Так, примерно к 10-му пассажу можно ожидать отсутствия трансгенов (Fusaki et al., 2009; Ban et al., 2011).

Уровень экспрессии трансгенов в случае использования систем доставки на основе вируса Сендай значительно выше, чем при применении лентивирусов. С помощью векторов на основе вируса Сендай были получены ИПСК различных видов, в том числе человека и мыши, это позволяет сделать вывод, что для получения ИПСК уровень экспрессии трансгенов может варьировать в широких пределах. Интересно отметить, что для поддержания плюрипотентности нужен определенный уровень экспрессии факторов, контролирующих плюрипотентность. Например, ранее было показано, что уменьшение или увеличение экспрессии *Oct4* в эмбриональных стволовых клетках мыши приводило к их дифференцировке (Niwa et al., 2000). В дальнейшем было установлено, что стабильное поддержание плюрипотентности возможно и при сниженной экспрессии *Oct4* (Karwacki-Neisius et al., 2013). Следует отметить, что, независимо от уровня экспрессии трансгенов в процессе получения ИПСК, в успешно полученных плюрипотентных клетках трансгены замолкают или элиминируются, так что в поддержании плюрипотентности участвуют только эндогенные транскрипционные факторы.

Следует отметить крайне низкую эффективность трансдукции фибробластов моржа (см. рис. 2, *г*). Лентивирусные векторы третьего поколения, псевдотипированные гликопротеином VSV-G, имеют высокую тропность к клеткам млекопитающих (Cronin et al., 2005). Возможно, фибробласты, использованные нами в опыте, не имеют на поверхности необходимого для заражения рецептора.

Таким образом, проведено тестирование эффективности трансдукции фибробластов ластоногих вектором на основе вируса Сендай CytoTune-EmGFP. Мы наблюдали MOI порядка единицы, что достаточно для использования системы на основе вируса Сендай для получения ИПСК. Уровень флуоресценции репортерного гена EmGFP превышал таковой для EGFP лентивирусной системы на один-два порядка и не снижался на четвертый день после трансдукции. В целом полученные данные позволяют предположить, что использование системы трансдукции фибробластов ластоногих на основе вируса Сендай предпочтительно для получения ИПСК ластоногих.

Acknowledgements

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-00644, and State Budgeted Project 0324-2018-0016. The authors are grateful to the staffs of the Shared Access Centers Flow Cytometry and SPF Vivarium, ICG (projects RFMEFI61914X0005 and RFMEFI62114X0010). Part of the experiments were conducted at the Shared Access Center Collection of Pluripotent Cell Cultures of the Human and Mammals for General Biology and Biomedicine, ICG (http://ckp.icgen.ru/cells/; http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL). Primary cultures of pinniped fibroblasts were obtained from the Collection of Cell Cultures for General Biology (State Budgeted Project 0310-2016-0002), Department of the Diversity and Evolution of Genomes, IMCB.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Борода А.В., Питерсон С.Е., Монтэгю С.К., Пиварофф К.Дж., Штейн Дж., Ли Ч.Я., Лорин Дж.Ф., Одинцова Н.А. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из замороженных в жидком азоте биоптатов кожи байкальской нерпы (*Pusa sibirica*) и сивуча (*Eumetopias jubatus*). Морские млекопитающие Голарктики. Сб. науч. тр. по матер. VIII междунар. конф. Санкт-Петербург, 22-27 сентября 2014 г. М., 2015;1:73-77. [Boroda A.V., Peterson S.E., Montague S.C., Pivaroff C.G., Stein J.W., Lee C.-Y., Loring J.F., Odintsova N.A. Generating induced pluripotent stem cells from cryopreserved skin biopsies of Lake Baikal seal (*Pusa sibirica*) and Steller Sea Lion (*Eumetopias jubatus*). Proceedings of the VIII International Conference "Marine Mammals of the Holarctic", St. Petersburg, Sept. 22–27, 2014, Vol. 1. Moscow, 2015:73-77. (in Russian)]

Пристяжнюк И.Е., Мензоров А.Г. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки: протокол. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):701-709. DOI 10.18699/VJ17.288.

[Pristyazhnyuk I.E., Menzorov A.G. Generation of American mink induced pluripotent stem cells: a protocol. Vavilovskii Zhurnal Gene-

tiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017; 21(6):701-709. DOI 10.18699/VJ17.288 (in Russian)]

Baird A., Barsby T., Guest D.J. Derivation of canine induced pluripotent stem cells. Reprod. Domest. Anim. 2015;50(4):669-676. DOI 10.1111/rda.12562.

Ban H., Nishishita N., Fusaki N., Tabata T., Saeki K., Shikamura M., Takada N., Inoue M., Hasegawa M., Kawamata S., Nishikawa S. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011;108(34):14234-14239. DOI 10.1073/pnas.1103509108.

Coppiello G., Abizanda G., Aguado N., Iglesias E., Arellano-Viera E., Rodriguez-Madoz J.R., Carvajal-Vergara X., Prosper F., Aranguren X.L. Generation of *Macaca fascicularis* iPS cell line ATCi-MF1 from adult skin fibroblasts using non-integrative Sendai viruses. Stem Cell Res. 2017;21:1-4. DOI 10.1016/j.scr.2017.03.008.

Cronin J., Zhang X.Y., Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. Curr. Gene Ther. 2005;5(4):387-398.

Cubitt A.B., Woollenweber L.A., Heim R. Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. Met. Cell Biol. 1999;58:19-30.

Fujie Y., Fusaki N., Katayama T., Hamasaki M., Soejima Y., Soga M., Ban H., Hasegawa M., Yamashita S., Kimura S., Suzuki S., Matsuzawa T., Akari H., Era T. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. PLoS One. 2014;9(12):e113052. DOI 10.1371/journal.pone.0113052.

Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. 2009; 85(8):348-362.

Galat V., Galat Y., Perepitchka M., Jennings L.J., Iannaccone P.M., Hendrix M.J. Transgene reactivation in induced pluripotent stem cell derivatives and reversion to pluripotency of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2016; 25(14):1060-1072. DOI 10.1089/scd.2015.0366.

Karwacki-Neisius V., Göke J., Osorno R., Halbritter F., Ng J.H., Weiße A.Y., Wong F.C., Gagliardi A., Mullin N.P., Festuccia N., Colby D., Tomlinson S.R., Ng H.H., Chambers I. Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog. Cell Stem Cell. 2013;12(5):531-545. DOI 10.1016/j.stem.2013.04.023.

Koh S., Thomas R., Tsai S., Bischoff S., Lim J.-H., Breen M., Olby N.J., Piedrahita J.A. Growth requirements and chromosomal instability of induced pluripotent stem cells (iPSC) generated from adult canine fibroblasts. Stem Cells Dev. 2012;22(6):951-963. DOI 10.1089/scd.2012.0393.

Lee A.S., Xu D., Plews J.R., Nguyen P.K., Nag D., Lyons J.K., Han L., Hu S., Lan F., Liu J., Huang M., Narsinh K.H., Long C.T., de Almeida P.E., Levi B., Kooreman N., Bangs C., Pacharinsak C., Ikeno F., Yeung A.C., Gambhir S.S., Robbins R.C., Longaker M.T., Wu J.C. Preclinical derivation and imaging of autologously transplanted canine induced pluripotent stem cells. J. Biol. Chem. 2011; 286(37):32697-32704. DOI 10.1074/jbc.M111.235739.

Li H.O., Zhu Y.F., Asakawa M., Kuma H., Hirata T., Ueda Y., Lee Y.S., Fukumura M., Iida A., Kato A., Nagai Y., Hasegawa M. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. J. Virol. 2000;74(14):6564-6569.

Lu J., Liu H., Huang C.T., Chen H., Du Z., Liu Y., Sherafat M.A., Zhang S.C. Generation of integration-free and region-specific neural progenitors from primate fibroblasts. Cell Rep. 2013;3(5):1580-1591. DOI 10.1016/j.celrep.2013.04.004.

Luo J., Suhr S.T., Chang E.A., Wang K., Ross P.J., Nelson L.L., Venta P.J., Knott J.G., Cibelli J.B. Generation of leukemia inhibitory factor and basic fibroblast growth factor-dependent induced pluripotent stem cells from canine adult somatic cells. Stem Cells Dev. 2011;20(10):1669-1678. DOI 10.1089/scd.2011.0127.

Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J., Jaenisch R., Plath K., Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell. 2007;1(1):55-70. DOI 10.1016/j.stem.2007.05.014.

Menzorov A.G., Matveeva N.M., Markakis M.N., Fishman V.S., Christensen K., Khabarova A.A., Pristyazhnyuk I.E., Kizilova E.A., Cirera S., Anistoroaei R., Serov O.L. Comparison of American mink embryonic stem and induced pluripotent stem cell transcriptomes. BMC Genomics. 2015;16(Suppl. 13):S6. DOI 10.1186/1471-2164-16-S13-S6.

Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat. Genet. 2000;24(4):372-376. DOI 10.1038/74199.

Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature. 2007;448:313-317. DOI 10.1038/nature05934.

Shimada H., Nakada A., Hashimoto Y., Shigeno K., Shionoya Y., Nakamura T. Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. Mol. Reprod. Dev. 2010;77(1):2. DOI 10.1002/mrd.21117.

Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat. Protoc. 2007;2(12): 3081-3089. DOI 10.1038/nprot.2007.418.

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126(4):663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tsukamoto M., Nishimura T., Yodoe K., Kanegi R., Tsujimoto Y., Alam M.E., Kuramochi M., Kuwamura M., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Inaba T., Sugiura K., Hatoya S. Generation of footprint-free canine induced pluripotent stem cells using auto-erasable Sendai virus vector. Stem Cells Dev. 2018;27(22):1577-1586. [Epub ahead of print]. DOI 10.1089/scd.2018.0084.

Tucker B.A., Anfinson K.R., Mullins R.F., Stone E.M., Young M.J. Use of a synthetic xeno-free culture substrate for induced pluripotent stem cell induction and retinal differentiation. Stem Cells Transl. Med. 2013;2(1):16-24. DOI 10.5966/sctm.2012-0040.

Verma R., Holland M.K., Temple-Smith P., Verma P.J. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. Theriogenology. 2012;77(1):220-228, 228.e221-222. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.09.022.

Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature. 2007;448: 318-324. DOI 10.1038/nature05944.

Whitworth D.J., Ovchinnikov D.A., Wolvetang E.J. Generation and Characterization of LIF-dependent canine induced pluripotent stem cells from adult dermal Fibroblasts. Stem Cells Dev. 2012;21(12): 2288-2297. DOI 10.1089/scd.2011.0608.

Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 2007;318(5858):1917-1920. DOI 10.1126/science.1151526.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1026-1032
DOI 10.18699/VJ18.446

Способы повышения эффективности knock-in в геном плюрипотентных клеток человека при помощи системы CRISPR/Cas9

М.М. Гридина

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

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (чИПСК) – мощный инструмент для биомедицинских исследований. Возможность создания пациент-специфичных плюрипотентных клеток и последующая их дифференцировка в любой тип соматических клеток делают чИПСК замечательным объектом для создания *in vitro* моделей заболеваний, скрининга лекарственных препаратов и будущим источником клеточного материала для регенеративной медицины. Для того чтобы потенциал технологии чИПСК можно было реализовать в полном объеме, необходимы эффективные и точные методы редактирования генома этих клеток. В настоящее время система CRISPR/Cas9 – наиболее широко используемый подход для введения в ДНК сайт-специфичных двуцепочечных разрывов. С ее помощью с высокой эффективностью удается реализовать knock-out интересующих исследователя генов. Однако введение в целевое место генома заданной последовательности (knock-in) является существенно более сложной задачей. В зависимости от выбранного для проведения встройки локуса эффективность knock-in в геном чИПСК может составлять от 1×10^{-5} до 1×10^{-6}, что на порядок ниже, чем показано для эмбриональных стволовых клеток мышей или перевивных линий клеток. В этом обзоре я делаю попытку объединить и структурировать всю известную информацию, касающуюся увеличения эффективности получения целевых встроек в геном чИПСК. В статье перечислены наиболее эффективные стратегии разработки донора для гомологичной рекомбинации, способы управления путями восстановления двуцепочечных разрывов, внесенных нуклеазой, в том числе за счет управления временем работы системы CRISPR/Cas9 в клетке. Низкая выживаемость чИПСК в результате проведения экспериментов по редактированию генома – еще одно затруднение на пути к успешному получению knock-in, для устранения которого предложено несколько высокоэффективных подходов. Наконец, я описываю, на мой взгляд, наиболее многообещающую стратегию получения линий чИПСК с целевой встройкой, которой является одновременное проведение редактирования и репрограммирования генома.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека; система CRISPR/Cas9; редактирование генома; эффективность knock-in.

Improvement of the knock-in efficiency in the genome of human induced pluripotent stem cells using the CRISPR/Cas9 system

M.M. Gridina

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

Human induced pluripotent stem (hiPS) cells are a powerful tool for biomedical research. The ability to create patient-specific pluripotent cells and their subsequent differentiation into any somatic cell type makes hiPS cells a valuable object for creating *in vitro* models of human diseases, screening drugs and a future source of cells for regenerative medicine. To realize entirely a potential of hiPScells, effective and precise methods for their genome editing are needed. The CRISPR/Cas9 system is the most widely used method for introducing site-specific double-stranded breaks into DNA. It allows genes of interest to be knocked out with high efficiency. However, knock-in into the target site of the genome is a much more difficult task. Moreover, many researchers have noted a low efficiency of introducing target constructs into the hiPS cells' genome. In this review, I attempt to describe the currently known information regarding the matter of increasing efficiency of targeted insertions into hiPS cells' genome. Here I will describe the most effective strategies for designing the donor template for homology-directed repair, methods to manipulate the double-strand break repair pathways introduced by a nuclease, including control of CRISPR/Cas9 delivery time. A low survival rate of hiPS cells following genome editing experiments is another difficulty on the way towards successful knock-in, and here several highly effective approaches addressing it are proposed. Finally, I describe the most promising strategies, one-step reprogramming and genome editing, which allows gene-modified integration-free hiPS cells to be efficiently generated directly from somatic cells.

Key words: human induced pluripotent stem cells; CRISPR/Cas9 system; genome editing; knock-in efficiency.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Гридина М.М. Способы повышения эффективности knock-in в геном плюрипотентных клеток человека при помощи системы CRISPR/Cas9. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1026-1032. DOI 10.18699/VJ18.446

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Gridina M.M. Improvement of the knock-in efficiency in the genome of human induced pluripotent stem cells using the CRISPR/Cas9 system. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8): 1026-1032. DOI 10.18699/VJ18.446 (in Russian)

Received October 3, 2018
Revised November 5, 2018
Accepted November 6, 2018

e-mail: gridinam@gmail.com

Небывалый импульс к развитию биомедицинским исследованиям придало появление двух технологий, а именно: получение индуцированных плюрипотентных клеток человека (чИПСК) и направленное редактирование генома при помощи CRISPR/Cas9-системы. Получение и направленная дифференцировка пациент-специфичных ИПСК открывают широкие перспективы для создания *in vitro* моделей заболеваний, скрининга лекарственных препаратов и делают возможным получение материала для регенеративной медицины. Для того чтобы использовать потенциал чИПСК во всем объеме, необходимы точные и эффективные методы редактирования генома. CRISPR/Cas9-система способна направленно модифицировать геномы любых организмов, и в частности человека, что значительно расширяет экспериментальные возможности геномных исследований. Комбинируя эти две технологии, исследователи получают возможность, во-первых, корректировать вызывающие патологию мутации в пациент-специфичных плюрипотентных клетках, во-вторых, вносить в геном «нормальных» чИПСК мутации, связанные с развитием заболевания, т. е. получить таким образом готовую для исследования *in vitro* модель заболевания. В-третьих, можно более точно устанавливать значимость конкретных мутаций для развития фенотипа, создавая изогенные клоны клеток, что позволит избежать эффектов генетического фона, которые, как правило, сложно учитывать.

Система CRISPR/Cas9 – наиболее широко используемый метод введения в ДНК сайт-специфичных двуцепочечных разрывов (DSB). Свою популярность он заслужил благодаря высокой специфичности и эффективности, сопряженным с простотой исполнения и надежностью (Hsu et al., 2014). Нуклеаза SpCas9 (далее Cas9), полученная из бактерий вида *Streptococcus pyogenes*, в настоящее время применяется в генной инженерии чаще всего. Мне не хотелось бы углубляться в детали молекулярного механизма работы CRISPR/SpCas9 системы, которые можно найти, например, в работе А.В. Смирнова с коллегами (2016) и недавно вышедшей книге «Редактирование генов и геномов» (2018), однако дать общее представление необходимо. В системе CRISPR/SpCas9 химерная молекула sgRNA (single guide RNA) опознает любые интересующие исследователя 20 п. о. в геноме, с 3′-конца которых находится 5′-NGG-3′ (Protospacer adjacent motif, PAM). Молекула SgRNA «путешествует» по геному в поисках гомологичной последовательности не одна, а в комплексе с SpCas9 нуклеазой, которая вносит DSB с тупыми концами на расстоянии трех нуклеотидов от PAM (рис. 1).

На этом работа CRISPR/Cas9-системы заканчивается, и на сцену выступает внутренняя машинерия клетки, которая стремится репарировать получившиеся DSB. Клетка добивается этого, используя механизмы негомологичного соединения концов (nonhomologous end joining, NHEJ) или репарации по типу гомологичной рекомбинации (homology-directed repair, HDR) (Heyer et al., 2010). NHEJ – это неспецифическая реакция лигирования, точность которой сильно зависит от структуры концов разрыва, а результатом могут быть различные инсерции или делеции (инделы) в целевой участок генома. При использовании именно NHEJ получают knock-out интересующих генов. Для встраивания в геном нужной последовательности (получения knock-in) необходимо, чтобы в клетке работал HDR и была матрица с участками гомологии по обеим сторонам от DSB.

Введение генетической конструкции в заданное место в геноме чИПСК является важной, но на данный момент сложной и трудозатратной задачей, требующей скрининга большого числа клонов. В зависимости от выбранного для проведения встройки локуса эффективность knock-in в геном чИПСК может составлять от 1×10^{-5} до 1×10^{-6} (Merkle et al., 2015), что на порядок ниже, чем показано для мышиных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) или перевивных линий клеток (Mali et al., 2013). В обзоре я делаю попытку описать и структурировать доступные на настоящее время методы увеличения эффективности получения целевой встройки в геном чИПСК.

Лучше режем

Введение генетической конструкции в выбранный локус будет проходить с тем большей вероятностью, чем эффективнее происходит внесение DSB системой CRISPR/Cas9. Как упоминалось выше, составные части CRISPR/Cas9-системы – sgRNA и Cas9 нуклеаза. Эти компоненты могут быть доставлены в клетку в разном виде, а именно: как плазмидная ДНК, sgRNA и Cas9 mRNA или рибонуклеиновый комплекс (RNP комплекс), состоящий из sgRNA и белка Cas9. Для легко трансфецирующихся клеток, таких как HEK293 или мышиные ЭСК, зависимость эффективности работы системы CRISPR/Cas9 от используемого вида ее составляющих минимальна. Для чИПСК же, наоборот, RNP комплекс в 4.3 и 2.7 раза позволяет увеличить эффективность внесения DSB по сравнению с использованием плазмид и sgRNA+Cas9 mRNA соответственно (Liang et al., 2015). Наблюдаемое для некоторых линий клеток повышение эффективности внесения knock-in при использовании RNP комплекса также может быть связано с тем, что он активен сразу же после попадания в клетку. Быстрый запуск работы нуклеазы особенно принципиален при использовании линеаризованных доноров для HDR (см. ниже). Их концентрация в клетке наивысшая непосредственно после трансфекции, и с течением времени они достаточно быстро деградируют (Kim et al., 2014). Дополнительным преимуществом использования RNP комплекса является, в первую очередь, снижение off-target эффектов за счет быстрой деградации Cas9 белка, которая происходит в течение 24 ч после трансфекции (Kim et al., 2014), во-вторых, снижение вероятности нецелевых встроек в геном, связанное с отсутствием ДНК вектора, несущего последовательности sgRNA и Cas9. Кроме того, трансфекция RNP комплекса менее токсична для плюрипотентных клеток человека, чем плазмидная (Kim et al., 2014).

Идеальный донор

Для получения целевой встройки в геном вместе с компонентами CRISPR/Cas9-системы в клетку вносят последовательность, которая будет служить донором для HDR. В этом качестве можно использовать плазмидную, соответственно двуцепочечную, ДНК (dsDNA) или синтетический одноцепочечный олигонуклеотид (ssODN,

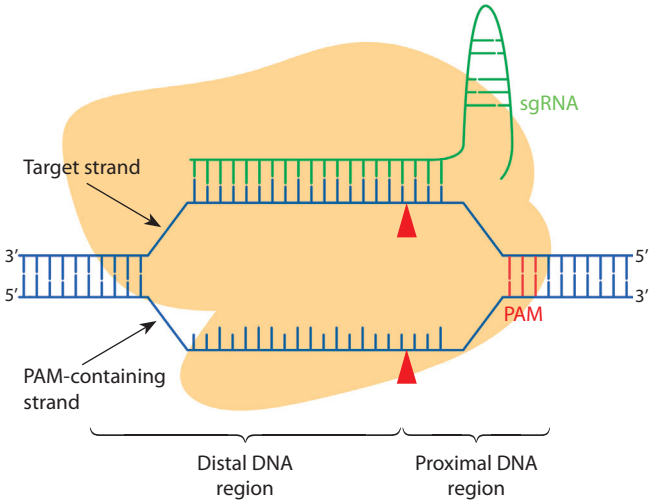


Fig. 1. DSB creation with the CRISPR/Cas9 system.

SpCas9 (yellow) combined with sgRNA (green) binds DNA (blue). The sgRNA sequence is complementary to the target DNA strand.

single-stranded oligonucleotide). Плазмидная ДНК позволяет встраивать в геном достаточно крупные фрагменты – до 7.4 т. п. о. (Wang et al., 2015). В случае необходимости встройки короткой последовательности, к примеру LoxP сайтов, оправдано использование ssODN. Он позволяет с более высокой эффективностью, по сравнению с использованием dsDNA, вводить последовательности размером до 100 нуклеотидов (Orlando et al., 2010; Chen et al., 2011; Liang et al., 2017). Это особо привлекательно в свете возможности проведения корректировки точковых мутаций, являющихся причиной заболеваний человека (Niu et al., 2016; Turan et al., 2016).

Исходя из знаний о динамике работы CRISPR/Cas9-системы, C.D. Richardson с коллегами (2016) предложили необычную стратегию для выбора донора для HDR. Две цепи ДНК можно обозначить как целевую, которую узнает sgRNA, и PAM-содержащую, соответственно, комплементарную целевой (см. рис. 1). После того как sgRNA в составе комплекса с Cas9 опознала целевой участок, нуклеаза вносит DSB и образуются четыре конца ДНК. Процесс диссоциации белка Cas9 от двуцепочечной ДНК занимает около 6 ч. В течение этого времени Cas9 прочно связан с тремя концами, образованными в результате внесения DSB. Четвертый же, являющийся 3′-концом PAM содержащей цепи ДНК, освобождается быстрее и, соответственно, раньше становится доступным для формирования комплементарных связей с ДНК донора. Если использовать донор, комплементарный PAM содержащей цепи, это в 2.6 раза увеличивает эффективность HDR, по сравнению с использованием ssODN, комплементарного целевой цепи ДНК (Richardson et al., 2016). Эффективность гомологичной рекомбинации можно еще увеличить, если варьировать длину плеч гомологии. Типичным дизайном ssODN являются симметричные плечи гомологии, соответствующие последовательностям по обе стороны от внесенного разрыва. Однако использование асимметричного ssODN, у которого 36 нуклеотидов комплементарны дистальному концу разрыва PAM-содержащей цепи и 91 нуклеотид – проксимальному концу, позволяет еще больше увеличить эффективность HDR. Данные об эффективности применения этой стратегии для внесения knock-in в чИПСК несколько противоречивы. С одной стороны, она была успешно применена в работе (Liang et al., 2017), где с ее помощью удалось увеличить эффективность HDR в 2.5 раза. С другой стороны, в работе (Yumlu et al., 2017) наоборот показано, что использование «стандартного» симметричного ssODN позволяет получать желаемые инсерции с максимальной эффективностью в чИПСК. Авторы предполагают, что такое противоречие может происходить из-за специфики используемых линий клеток и/или особенностей локуса, подвергаемого модификациям, – его локализации внутри хроматина и собственно последовательности нуклеотидов.

В отличие от ssODN, двуцепочечный плазмидный донор позволяет встраивать более крупные фрагменты ДНК. Линеаризация донора – типичный способ увеличения эффективности его интеграции в геном. Более того, на эффективность HDR можно влиять, используя разные способы линеаризации плазмиды. Так же, как в случае с ssODN, наиболее эффективна для гомологичной рекомбинации ассиметричная конструкция, у которой более короткое плечо с дистальной стороны от PAM (см. рис. 1). Таким способом удалось повысить эффективность knock-in в чИПСК в 4.2 раза (He et al., 2016).

Еще один вариант линеаризации донора – двойное разрезание плазмиды, содержащей донорную последовательность. Подход заключается в следующем: с внешней стороны плеч гомологии вводят два сайта узнавания для той же sgRNA, которая будет направлять Cas9 к целевому сайту в геноме. После сборки sgRNA/Cas9 комплексов они «скринируют» как геномную, так и плазмидную ДНК в поисках сайтов узнавания для sgRNA и, находя, условно одновременно вносят DSB в геном и линеаризуют донор. Таким образом, происходит синхронизация потребности в матрице для гомологичной рекомбинации и ее доступности. При использовании описанной стратегии J.P. Zhang с коллегами (2017) удалось увеличить эффективность HDR в некоторых локусах чИПСК в 7.6 раза, а дополнительная синхронизация клеточного цикла (более подробно см. ниже) привела к увеличению эффективности встройки еще в 1.5–2 раза. Важным преимуществом использования донора с двумя сайтами разрезания для sgRNA является возможность ограничиться короткими плечами гомологии (всего 600 п. о.) без потери эффективности knock-in (Zhang et al., 2017). Однако линеаризация донора увеличивает, в том числе, и неспецифическую его интеграцию в геном. Одна из модификаций стратегии применения донора с двумя сайтами разрезания для sgRNA – использование мутантных форм белка Cas9, которые делают ники вместо DSB. В этом случае ники вносят как в целевое место в геноме, так и в молекулу донора по обеим сторонам от плеч гомологии. В результате существенно снижается вероятность нецелевой встройки, и этот подход также позволяет практически полностью избавиться от нежелательных инделов. Кроме того, DSB в плюрипотентных клетках человека могут запускать апоптоз (Liu et al., 2013, 2014), чего не происходит при использовании вносящих

ники форм Cas9. К сожалению, при этом эффективность knock-in в геном плюрипотентных клеток человека увеличивается не так эффективно, как показано в работе (Zhang et al., 2017), а только в 1.5–2 раза, в зависимости от линии клеток (Chen et al., 2017).

Управление путями восстановления DSB

Восстановление DSB, образовавшихся в результате работы Cas9 нуклеазы, может идти двумя основными путями: NHEJ и HDR (рис. 2). Для увеличения эффективности knock-in можно либо вывести из строя ключевых участников процесса NHEJ, либо активировать HDR.

Массовый скрининг органических соединений и оценку их влияния на эффективность HDR провели C. Yu с коллегами (2015). Из 4000 тестируемых органических соединений им удалось выявить два (L755507 и Brefeldin A), достоверно увеличивающих получение встройки целевых фрагментов в геном при помощи CRISPR/Cas9-системы. Для L755507 было показано увеличение knock-in в чИПСК в три раза при использовании плазмидной ДНК в качестве донора для HDR, и в девять раз – при использовании ssODN (Yu et al., 2015).

Выбор пути репарации зависит от типа внесенного нуклеазой разреза, т. е. 5′-липкие концы с большей вероятностью будут восстановлены по HDR пути, чем тупые концы (Bothmer et al., 2017). Мутантная форма белка Cas9 – SpCas9n – делает направленные однонитевые ники. Использование Cas9n с двумя sgRNA, опознающими близко расположенные последовательности на разных цепях ДНК, одновременно приводит к образованию DSB с перекрывающимися 5′-липкими концами (Shen et al., 2014). Еще одна нуклеаза, делающая разрывы с липкими концами, – Cpf1 (Zetsche et al., 2015). Сочетание использования SpCas9n или AsCpf1 с обработкой клеток несколькими органическими соединениями позволяет увеличить эффективность внесения целевой модификации в геном чИПСК в 3–7.2 раза, в зависимости от редактируемого локуса и используемого сочетания (Ma et al., 2018; Riesenberg, Maricic, 2018).

Один из ключевых участников процесса гомологичной рекомбинации – белок RAD51 (см. рис. 2). Он связывает одноцепочечную ДНК в месте разрыва и катализирует поиск и узнавание гомологичной последовательности ДНК. Найдя последнюю, он физически соединяет ее с местом разрыва и приводит к формированию D-петли, внутри которой ДНК полимераза садится на 3′-конец оборванной нити, и в результате происходит репарация DSB (Haber, 2018). Сверхэкспрессия RAD51 в ЭСК и ИПСК человека как сама по себе, так и совместно с обработкой клеток вальпроевой кислотой способна существенно увеличивать эффективность HDR и приводит к эффективному получению гомозиготных по встройке клонов клеток (Takayama et al., 2017). Таким образом, становится возможным сделать knock-in даже в транскрипционно не активные локусы, что является крайне сложной задачей, когда речь заходит о плюрипотентных клетках человека.

Как и RAD51, CtIP – участник ранних этапов процесса гомологичной рекомбинации (см. рис. 2), кофактор для MRE11 эндонуклеазы. Они совместно приводят к образованию свободного одноцепочечного 3′-конца,

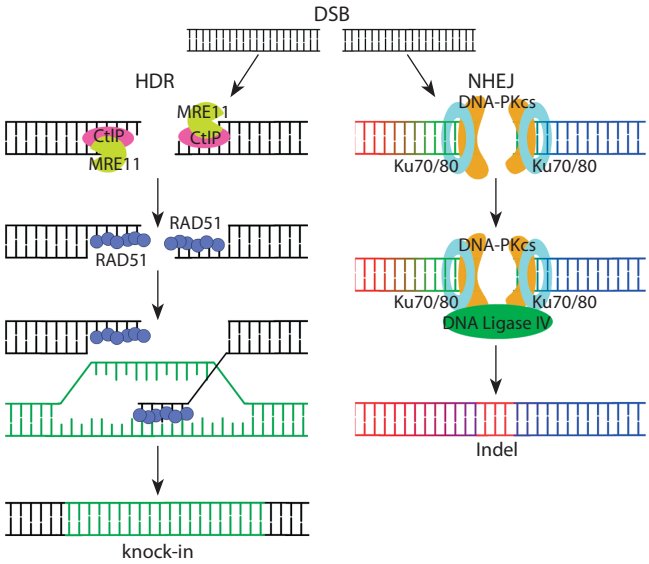


Fig. 2. Key molecules involved in the NHEJ or HDR pathways of DSB repair.

At one of the initial steps of NHEJ, the Ku70/Ku80 heterodimer finds, recognizes, and binds DSB blunt ends. Then DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) approaches the break. Ends of the break are brought together so that they can be ligated (Dexheimer, 2013). The NHEJ pathway can be disabled by inhibitors of DNA-PKcs (NU7441) and DNA ligase IV (SCR7) (Chu et al., 2015; Maruyama et al., 2015; Riesenberg, Maricic, 2018).

During homology-directed repair, MRE11 within the MRN-CtIP complex is recruited to the DSB site. Its exonuclease activity produces single-stranded DNA (ssDNA). Single-stranded ends of the break cannot be repaired by NHEJ. ssDNA is covered by RPA, which is then replaced by Rad51. The latter triggers the search for homologous sequence and invasion of the DNA strand. Finally, the DNA break is repaired.

расщепляя 5′-цепь ДНК (Anand et al., 2016). Использование рекомбинантной молекулы белка Cas9, «слитого» с N-концевым доменом CtIP, вызывает более активное накопление эндогенного белка CtIP в месте внесения разрыва и увеличивает эффективность интеграции трансгена по механизму HDR. Применение этой стратегии на чИПСК показало увеличение эффективности knock-in в 1.5 раза (Charpentier et al., 2018).

Управление временем работы CRISPR/Cas9 в клетке

В клетке, находящейся в G1-фазе клеточного цикла, репарация происходит в основном по механизму NHEJ. После репликации ДНК в клетке совершается накопление белков, участвующих в процессе гомологичной рекомбинации (Heyer et al., 2010). Для эффективного knock-in необходимо, чтобы все компоненты CRISPR/Cas9-системы и матрица для HDR оказались в клетке никак не ранее S-фазы. Этого можно добиться двумя способами. Во-первых, синхронизацией культуры клеток. Два органических соединения, ABT-751 и Nocodazole, ингибируют полимеризацию микротрубочек и обратимо останавливают клеточный цикл в G2/M-фазе. Эффективность knock-in в геном плюрипотентных клеток человека, синхронизированных обработкой этими двумя веществами, увеличивалась в три-пять раз по сравнению с не-

синхронизированными (Lin et al., 2014; Yang et al., 2016). Более того, отбор при помощи FACS клеток, находящихся в G2/M-фазе, увеличивал эффективность knock-in в четыре раза по сравнению со смешанной популяцией клеток, и в 11 раз по сравнению с G1 фракцией (Yang et al., 2016).

Второй способ – запретить Cas9 находиться в клетках в течение G1-фазы. Белок Geminin полностью исчезает из клеток во время поздней M- и G1-фаз (Nishitani et al., 2004). Химерный белок, полученный слиянием Cas9 и Geminin, с одной стороны, сохраняет нуклеазную активность, а с другой стороны, присутствует в клетке только в течение S/G2-фазы клеточного цикла. При использовании таким образом модифицированного Cas9 на чИПСК удалось добиться двукратного увеличения введения knock-in, и при этом существенно снизилось число инделов (Howden et al., 2016).

Нетривиальный подход для увеличения эффективности knock-in в чИПСК предложили Q. Guo с коллегами (2018). По их данным, если клетки в течение суток после трансфекции культивировать при 32 °C и следующие 24 ч – при 37 °C, то HDR повышается примерно в два раза. Непонятно, за счет чего происходит такое увеличение эффективности работы CRISPR-системы при холодовом шоке. Для цинковопальцевых нуклеаз показано, что культивирование клеток при пониженной температуре приводит к увеличению числа разрывов в клетках за счет накопления в них нуклеазы (Doyon et al., 2010). Однако это не объясняет, почему холодовой шок чИПСК увеличивает именно HDR и не вызывает похожих эффектов в HEK293. Наиболее очевидное предположение – низкая температура может влиять на клеточный цикл чИПСК с увеличением числа клеток в G2/M-фазах (Rieder, Cole, 2002). Кроме того, понижение температуры может иметь термодинамический эффект, стабилизируя промежуточные продукты рекомбинации.

Увеличение выживаемости чИПСК

Дополнительные трудности, с которыми сталкиваются исследователи, начиная эксперименты по редактированию генома чИПСК, проистекают из того, что клетки этого типа плохо переносят манипуляции с ними. Во-первых, в отличие от мышиных плюрипотентных клеток, диссоциация чИПСК до одноклеточного состояния приводит к массовой гибели клеток. Применение ROCK ингибитора увеличивает эффективность их клонирования (Watanabe et al., 2007), что существенно упрощает работу с ними. Однако это решило только первую проблему. Во-вторых, компоненты CRISPR-системы и матрица для гомологичной рекомбинации должны быть доставлены в клетку. Одним из наиболее эффективных способов является электропорация, которая сама по себе провоцирует гибель клеток, а добавление в систему плазмидной ДНК ее только увеличивает. Компоненты системы CRISPR/Cas9 могут быть использованы в менее токсичном варианте – RNP комплексе (о чем было сказано выше). Тем не менее полностью отказаться от использования плазмидных векторов невозможно, так как это наиболее удобная, а порой и единственно возможная форма внесения матрицы для гомологичной рекомбинации. В-третьих, многие исследователи отмечают массовую гибель чИПСК после проведения экспериментов с использованием системы CRISPR/Cas9, вне зависимости было ли это введение генетического материала или же получение knock-out.

В связи с вышесказанным существует несколько работ, посвященных увеличению выживаемости чИПСК в ходе экспериментов по редактированию генома.

Белок BCL-XL поддерживает целостность внешней мембраны митохондрий и тем самым предотвращает высвобождение в цитоплазму клетки их содержимого, например цитохрома C, являющегося активатором апоптоза (Vander Heiden et al., 1997). Совместная электропорация гена *BCL-XL* с компонентами CRISPR/Cas9-системы и матрицей для гомологичной рекомбинации приводит к 10-кратному увеличению выживаемости чИПСК. Более того, эффективность HDR увеличивается в 20–100 раз, в зависимости от редактируемого локуса. Такой эффект был показан с использованием различных доноров для пяти локусов и на шести различных линиях чИПСК (Li et al., 2018).

Внесение множественных DSB в геном перевивных клеток может приводить к их гибели, а для запуска гибели как чИПСК, так и чЭСК достаточно разрыва в единственном целевом локусе (Liu et al., 2014). Это может быть связано с тем, что плюрипотентные клетки близки клеткам раннего эмбриона, в которых должна работать жесткая селекция, направленная на поддержание целостности кариотипа (Dumitru et al., 2012; Liu et al., 2013). В запуске гибели чИПСК в ответ на внесение DSB участвует P53, а его knock-out приводит к существенному увеличению жизнеспособности чИПСК после применения к ним CRISPR/Cas9 технологии и к увеличению эффективности HDR в 19 раз для чИПСК и в 17 раз для чЭСК (Ihry et al., 2018).

Объединение редактирования и репрограммирования генома

Безусловно, с момента появления методы получения чИПСК так же, как методы редактирования генома, были существенно модифицированы и стали намного проще для исполнения. Тем не менее и получение пациент-специфичных чИПСК, и редактирование их генома крайне трудозатратны и требуют много времени, так как это должны быть два последовательных процесса. Идея сделать их параллельными впервые успешно была реализована S.E. Howden с коллегами (2016). Авторы одновременно электропорировали во взрослые фибробласты человека плазмиды, необходимые для репрограммирования, компоненты системы CRISPR/Cas9 и матрицу для гомологичной рекомбинации. Всего был получен 31 клон чИПСК, среди которых были клетки с целевой встройкой, дополнительными инделами и без генетических модификаций. Применение Cas9, «слитого» с фрагментом белка Geminin (см. выше), увеличивало выход чИПСК с knock-in в четыре раза. В дальнейшем эффективность такой стратегии была успешно подтверждена работами (Tidball et al., 2017; Wen et al., 2018), в том числе для получения чИПСК из мононуклеарных клеток периферической крови. Использование моноцитов, с медицинской точки зрения, более выгодно, так как процедура получения фибробластов кожи более инвазивная, требует времени на получение первичной культуры, кроме того, в клетках кожи больше вероятность

накопления мутаций, вызванных действием окружающей среды, например ультрафиолетовым излучением (Zhang, 2013). При получении чИПСК с помощью эписомальных векторов 7–10 % клонов содержали целевую встройку, в зависимости от выбранного для проведения встройки локуса. Использование вектора, одновременно экспрессирующего *KLF4* и *Cas9*, увеличило эффективность целевой встройки в три раза, но вместе с тем несколько снижало эффективность репрограммирования. Попытки решить возникшую проблему не увенчались успехом, но было обнаружено, что большой Т-антиген вируса SV40 еще улучшал систему внесения knock-in. В результате удалось добиться 30–40 % выхода колоний чИПСК с правильной целевой встройкой (Wen et al., 2018). Таким образом, предложенная стратегия предлагает практически в два раза более быстрый, высокоточный и эффективный способ получения knock-in в чИПСК с одновременным получением изогенных контрольных линий.

Заключение

CRISPR/Cas9-система – недавно появившийся, но получивший поистине «народное» признание удобный и мощный инструмент для проведения сайт-специфичного редактирования генома. В комбинации с технологией получения чИПСК он предоставляет уникальные возможности для исследования функциональной значимости генов, механизмов развития заболеваний и генной коррекции. Как и всякая недавно появившаяся технология, редактирование генома при помощи CRISPR/Cas9-системы сталкивается со множеством требующих преодоления трудностей. Одной из них, безусловно, является крайне низкая эффективность работы этой системы в чИПСК. Большое количество всевозможных модификаций этого метода делает для исследователя непростым выбор наиболее подходящего способа для получения knock-in. В этом обзоре я сделала попытку свести воедино и структурировать наиболее важные, на мой взгляд, подходы, позволяющие повышать эффективность внесения целевых конструкций в геном чИПСК.

Acknowledgements

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016 “Cellular and molecular mechanisms controlling adaptive and pathological processes in humans and animals”.

Conflict of interest

The author declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Редактирование генов и геномов. Отв. ред. С.М. Закиян, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, Е.А. Покушалов, В.В. Власов. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2018.
[Zakian S.M., Medvedev S.P., Dementieva E.V., Pokushalov E.A., Vlasov V.V. (Eds.) Editing of Genes and Genomes. Novosibirsk: SB RAS Publ., 2018. (in Russian)]

Смирнов А.В., Юнусова А.М., Лукьянчикова В.А., Баттулин Н.Р. Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016; 20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175.
[Smirnov A.V., Yunusova A.M., Lukyanchikova V.A., Battulin N.R. CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175. (in Russian)]

Anand R., Ranjha L., Cannavo E., Cejka P. Phosphorylated CtIP functions as a co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 endonuclease in DNA end resection. Mol. Cell. 2016;64:940-950.

Bothmer A., Phadke T., Barrera L.A., Margulies C.M., Lee C.S., Buquicchio F., Moss S., Abdulkerim H.S., Selleck W., Jayaram H., Myer V.E., Cotta-Ramusino C. Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus. Nat. Commun. 2017;8:13905. DOI 10.1038/ncomms13905.

Charpentier M., Khedher A.H.Y., Menoret S., Brion A., Lamribet K., Dardillac E., Boix C., Perrouault L., Tesson L., Geny S., De Cian A., Itier J.M., Anegon I., Lopez B., Giovannangeli C., Concordet J.P. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. Nat. Commun. 2018;9(1):1133. DOI 10.1038/s41467-018-03475-7.

Chen F., Pruett-Miller S.M., Huang Y., Gjoka M., Duda K., Taunton J., Collingwood T.N., Frodin M., Davis G.D. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. Nat. Methods. 2011;8(9):753-755. DOI 10.1038/nmeth.1653.

Chen X., Janssen J.M., Liu J., Maggio I., ‘t Jong A.E.J., Mikkers H.M.M., Gonçalves M.A.F.V. In trans paired nicking triggers seamless genome editing without double-stranded DNA cutting. Nat. Commun. 2017;8(1):657. DOI 10.1038/s41467-017-00687-1.

Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. Nat. Biotechnol. 2015;33(5):543-548. DOI 10.1038/nbt.3198.

Dexheimer T. DNA repair pathways and mechanisms. Eds. L. Mathews, S. Cabarcas, E. Hurt. DNA Repair of Cancer Stem Cells. Dordrecht: Springer, 2013;19-32.

Doyon Y., Choi V.M., Xia D.F., Vo T.D., Gregory P.D., Holmes M.C. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. Nat. Meth. 2010;7:459-460. DOI 10.1038/nmeth.1456.

Dumitru R., Gama V., Fagan B.M., Bower J.J., Swahari V., Pevny L.H., Deshmukh M. Human embryonic stem cells have constitutively active Bax at the Golgi and are primed to undergo rapid apoptosis. Mol. Cell. 2012;46(5):573-583. DOI 10.1016/j.molcel.2012.04.002.

Guo Q., Mintier G., Ma-Edmonds M., Storton D., Wang X., Xiao X., Kienzle B., Zhao D., Feder J.N. ‘Cold shock’ increases the frequency of homology directed repair gene editing in induced pluripotent stem cells. Sci. Rep. 2018;8(1):2080. DOI 10.1038/s41598-018-20358-5.

Haber J.E. DNA repair: the search for homology. Bioessays. 2018; 40(5):e1700229. DOI 10.1002/bies.201700229.

Heyer W.D., Ehmsen K.T., Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 2010;44:113-139.

Howden S.E., McColl B., Glaser A., Vadolas J., Petrou S., Little M.H., Elefanty A.G., Stanley E.G. A Cas9 variant for efficient generation of indel-free Knockin or gene-corrected human pluripotent stem cells. Stem Cell Reports. 2016;7(3):508-517. DOI 10.1016/j.stemcr.2016.07.001.

Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 2014;157:1262-1278. DOI 10.1016/j.cell.2014.05.010.

Ihry R.J., Worringer K.A., Salick M.R., Frias E., Ho D., Theriault K., Kommineni S., Chen J., Sondey M., Ye C., Randhawa R., Kulkarni T., Yang Z., McAllister G., Russ C., Reece-Hoyes J., Forrester W., Hoffman G.R., Dolmetsch R., Kaykas A. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. Nat. Med. 2018; 24(7):939-946. DOI 10.1038/s41591-018-0050-6.

Kim S., Kim D., Cho S.W., Kim J., Kim J.S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. Genome Res. 2014;24:1012-1019. DOI 10.1101/gr.171322.113.

Li X.L., Li G.H., Fu J., Fu Y.W., Zhang L., Chen W., Arakaki C., Zhang J.P., Wen W., Zhao M., Chen W.V., Botimer G.D., Baylink D.,

Aranda L., Choi H., Bechar R., Talbot P., Sun C.K., Cheng T., Zhang X.B. Highly efficient genome editing via CRISPR-Cas9 in human pluripotent stem cells is achieved by transient BCL-XL overexpression. Nucleic Acids Res. 2018. DOI 10.1093/nar/gky804.

Liang X., Potter J., Kumar S., Ravinder N., Chesnut J.D. Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. J. Biotechnol. 2017;241:136-146. DOI 10.1016/j.jbiotec.2016.11.011.

Liang X., Potter J., Kumar S., Zou Y., Quintanilla R., Sridharan M., Carte J., Chen W., Roark N., Ranganathan S., Ravinder N., Chesnut J.D. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. J. Biotechnol. 2015;208:44-53. DOI 10.1016/j.jbiotec.2015.04.024.

Lin S., Staahl B.T., Alla R.K., Doudna J.A. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. Elife. 2014;3:e04766. DOI 10.7554/eLife.04766.

Liu J.C., Guan X., Ryan J.A., Rivera A.G., Mock C., Agrawal V., Letai A., Lerou P.H., Lahav G. High mitochondrial priming sensitizes hESCs to DNA-damage-induced apoptosis. Cell Stem Cell. 2013; 13(4):483-491. DOI 10.1016/j.stem.2013.07.018.

Liu J.C., Lerou P.H., Lahav G. Stem cells: balancing resistance and sensitivity to DNA damage. Trends Cell. Biol. 2014;24:268-274. DOI 10.1016/j.tcb.2014.03.002.

Ma X., Chen X., Jin Y., Ge W., Wang W., Kong L., Ji J., Guo X., Huang J., Feng X.H., Fu J., Zhu S. Small molecules promote CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in human pluripotent stem cells. Nat. Commun. 2018;9(1):1303. DOI 10.1038/s41467-018-03760-5.

Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. 2013;339(6121):823-826. DOI 10.1126/science. 1232033.

Maruyama T., Dougan S.K., Truttmann M.C., Bilate A.M., Ingram J.R., Ploegh H.L. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. Nat. Biotechnol. 2015;33(5):538-542. DOI 10.1038/nbt.3190.

Merkle F.T., Neuhausser W.M., Santos D., Valen E., Gagnon J.A., Maas K., Sandoe J., Schier A.F., Eggan K. Efficient CRISPR-Cas9-mediated generation of knockin human pluripotent stem cells lacking undesired mutations at the targeted locus. Cell Rep. 2015;11:875-883. DOI 10.1016/j.celrep.2015.04.007.

Nishitani H., Lygerou Z., Nishimoto T. Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region. J. Biol. Chem. 2004;279(29): 30807-30816. DOI 10.1074/jbc.M312644200.

Niu X., He W., Song B., Ou Z., Fan D., Chen Y., Fan Y., Sun X. Combining single strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in β-thalassemia-induced pluripotent stem cells. J. Biol. Chem. 2016;291(32):16576-16585. DOI 10.1074/jbc.M116.719237.

Orlando S.J., Santiago Y., DeKelver R.C., Freyvert Y., Boydston E.A., Moehle E.A., Choi V.M., Gopalan S.M., Lou J.F., Li J., Miller J.C., Holmes M.C., Gregory P.D., Urnov F.D., Cost G.J. Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. Nucleic Acids Res. 2010;38(15):e152. DOI 10.1093/nar/gkq512.

Richardson C.D., Ray G.J., DeWitt M.A., Curie G.L., Corn J.E. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. Nat. Biotechnol. 2016;34(3):339-344. DOI 10.1038/nbt.3481.

Rieder C.L., Cole R.W. Cold-shock and the Mammalian cell cycle. Cell Cycle. 2002;1(3):169-175.

Riesenberg S., Maricic T. Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells. Nat. Commun. 2018;9(1):2164. DOI 10.1038/s41467-018-04609-7.

Shen B., Zhang W., Zhang J., Zhou J., Wang J., Chen L., Wang L., Hodgkins A., Iyer V., Huang X., Skarnes W.C. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. Nat. Methods. 2014;11(4):399-402. DOI 10.1038/nmeth.2857.

Takayama K., Igai K., Hagihara Y., Hashimoto R., Hanawa M., Sakuma T., Tachibana M., Sakurai F., Yamamoto T., Mizuguchi H. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. Nucleic Acids Res. 2017;45(9): 5198-5207. DOI 10.1093/nar/gkx130.

Tidball A.M., Dang L.T., Glenn T.W., Kilbane E.G., Klarr D.J., Margolis J.L., Uhler M.D., Parent J.M. Rapid generation of human genetic loss-of-function iPSC lines by simultaneous reprogramming and gene editing. Stem Cell Reports. 2017;9(3):725-731. DOI 10.1016/j.stemcr.2017.07.003.

Turan S., Farruggio A.P., Srifa W., Day J.W., Calos M.P. Precise correction of disease mutations in induced pluripotent stem cells derived from patients with limb girdle muscular dystrophy. Mol. Ther. 2016;24(4):685-696. DOI 10.1038/mt.2016.40.

Vander Heiden M.G., Chandel N.S., Williamson E.K., Schumacker P.T., Thompson C.B. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. Cell. 1997;91(5):627-637.

Wang B., Li K., Wang A., Reiser M., Saunders T., Lockey R.F., Wang J.W. Highly efficient CRISPR/HDR-mediated knock-in for mouse embryonic stem cells and zygotes. Biotechniques. 2015; 59(4):201-202, 204, 206-208. DOI 10.2144/000114339.

Watanabe K., Ueno M., Kamiya D., Nishiyama A., Matsumura M., Wataya T., Takahashi J.B., Nishikawa S., Nishikawa S., Muguruma K., Sasai Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 2007;25(6):681-686. DOI 10.1038/nbt1310.

Wen W., Cheng X., Fu Y., Meng F., Zhang J.P., Zhang L., Li X.L., Yang Z., Xu J., Zhang F., Botimer G.D., Yuan W., Sun C., Cheng T., Zhang X.B. High-level precise knockin of iPSCs by simultaneous reprogramming and genome editing of human peripheral blood mononuclear cells. Stem Cell Reports. 2018;10(6):1821-1834. DOI 10.1016/j.stemcr.2018.04.013.

Yang D., Scavuzzo M.A., Chmielowiec J., Sharp R., Bajic A., Borowiak M. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. Sci. Rep. 2016;6:21264. DOI 10.1038/srep21264.

Yu C., Liu Y., Ma T., Liu K., Xu S., Zhang Y., Liu H., La Russa M., Xie M., Ding S., Qi L.S. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2015;16(2):142-147. DOI 10.1016/j.stem.2015.01.003.

Yumlu S., Stumm J., Bashir S., Dreyer A.K., Lisowski P., Danner E., Kühn R. Gene editing and clonal isolation of human induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9. Methods. 2017;121-122: 29-44. DOI 10.1016/j.ymeth.2017.05.009.

Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell. 2015;163(3):759-771. DOI 10.1016/j.cell.2015.09.038.

Zhang J.P., Li X.L., Li G.H., Chen W., Arakaki C., Botimer G.D., Baylink D., Zhang L., Wen W., Fu Y.W., Xu J., Chun N., Yuan W., Cheng T., Zhang X.B. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. Genome Biol. 2017;18(1):35. DOI 10.1186/s13059-017-1164-8.

Zhang X.B. Cellular reprogramming of human peripheral blood cells. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2013;11(5):264-274. DOI 10.1016/j.gpb.2013.09.001. Epub 2013 Sep. 21.

ORCID ID

M.M. Gridina orcid.org/0000-0002-7972-5949

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1033-1039
DOI 10.18699/VJ18.447

Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease

S.V. Gerasimova[1, 2] ✉, A.M. Korotkova[1], C. Hertig[3], S. Hiekel[3], R. Hoffie[3], N. Budhagatapalli[3], I. Otto[3], G. Hensel[3], V.K. Shumny[1], A.V. Kochetov[1, 2], J. Kumlehn[3], E.K. Khlestkina[1, 2, 4]

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben, Germany
[4] N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

The modification of crop genomes employing functional components of the microbial CRISPR/Cas immune system is a rapidly developing area of applied research. Site-directed plant genome modification by this technology involves the construction of Cas endonuclease- and guide-RNA-encoding vectors, delivery of the plasmid DNA into plant cells, processing of the chosen genomic target site by the corresponding gene products and regeneration of plants from modified cells. The utilization of this technology in local breeding programs is mainly limited by the typically strong genotype dependence of gene transfer and *in vitro* regeneration procedures, which holds particularly true in cereals. In the present study, an evaluation of *in vitro* regeneration efficiency of immature embryos of ten Siberian barley cultivars revealed that only one of these is on a par with the experimental standard cultivar Golden Promise. This cultivar, namely cv. Aley, was consequently chosen for further experiments on site-directed mutagenesis in leaf mesophyll protoplasts. Two genes controlling hulled *vs* naked (*Nud*) and two-rowed *vs* six-rowed barley (*Vrs1*) were used as targets to be modified via polyethyleneglycol-mediated cellular uptake of guide-RNA/Cas9-encoding plasmid DNA. Deep-sequencing of amplicons obtained from protoplast genomic DNA revealed that 6 to 22 percent of the target sites were mutated. The detected modifications comprised deletions in all three target sites and of various sizes, whereas insertions were observed in only one of the target genes (*Vrs1*) and were confined to the size of 1 nucleotide. This study demonstrates the possibility of site-directed genome modification in Siberian barley. Further steps in technology advancement will require the development of protocols with reduced genotype dependence in terms of both the gene transfer to totipotent cells and the subsequent plant regeneration originating from such cells.

Key words: CRISPR/Cas; *Cas9*; barley; protoplasts; *Nud*; *Vrs1*; regeneration; transfection; site-directed mutagenesis; *in vitro* culture.

Применение РНК-направленной нуклеазы Cas9 для сайт-специфической модификации генома в протопластах сибирского сорта ячменя с высокой способностью к регенерации

С.В. Герасимова[1, 2] ✉, А.М. Короткова[1], К. Хертиг[3], С. Хикель[3], Р. Хоффи[3], Н. Будхагатапалли[3], И. Отто[3], Г. Хензель[3], В.К. Шумный[1], А.В. Кочетов[1, 2], Й. Кумлен[3], Е.К. Хлесткина[1, 2, 4]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[3] Институт генетики растений и исследования культурных растений им. Лейбница, Гатерслебен, Германия
[4] Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

Модификация геномов культурных растений при помощи компонентов бактериальной защитной системы CRISPR/Cas в настоящее время является быстроразвивающейся областью прикладной науки. Методика индукции сайт-специфических изменений в растительных геномах, как правило, включает такие этапы, как конструирование генетических векторов, содержащих гены нуклеазы Cas9 и химерной направляющей РНК, доставку плазмидной ДНК или рибонуклеопротеиновых частиц в клетки растений, что приводит к внесению изменений в выбранный сайт геномной ДНК, и последующую регенерацию растений из модифицированных клеток. Применение этой технологии в селекции ограничено тем, что генотипы в разной степени подвержены генетической трансформации и различаются по способности к регенерации *in vitro*. Генотип-зависимость эффективности биотехнологических манипуляций особенно ярко выражена у культурных зерновых злаков. В настоящей работе была проведена оценка эффективности регенерации растений *in vitro* из клеток незрелых зародышей десяти сибирских сортов ячменя. Было показано, что только один из исследуемых сортов сопоставим с модельным для биотехнологических и генно-инженерных работ сортом Golden Promise. Сорт Алей продемонстрировал самую высокую эффективность регенерации среди сибирских сортов ячменя и был выбран для проведения эксперимента по модификации генома в протопластах мезофилла листа. Для проведения модификации генома было выбрано два целевых гена, которые контролируют хозяйственные признаки. Ген *Nud* контролирует признак голозерности или пленчатости, ген *Vrs1* – признак двурядности или шестирядности. Были сконструированы генетические век-

Received November 17, 2018
Revised December 5, 2018
Accepted December 5, 2018

✉ e-mail: gerson@bionet.nsc.ru

торы, несущие систему модификации генома, направленную на три сайта в двух целевых генах. Конструкции были введены в протопласты методом полиэтиленгликоль-зависимой трансформации, детекция мутаций осуществлялась методом глубокого секвенирования целевых последовательностей, амплифицированных с геномной ДНК трансформированной клеточной популяции. Мутации были выявлены в 6–20 % популяции трансформированных клеток. Делеции разного размера обнаружены в трех целевых сайтах, однонуклеотидные инсерции обнаружены только в одном из сайтов. Результаты, полученные в работе, демонстрируют возможность сайт-специфической модификации генома сибирского ячменя. Дальнейшие шаги по развитию технологии сайт-направленной модификации геномов культурных злаков потребуют разработки «генотип-независимых» методов генетической трансформации клеток и последующей регенерации растений из модифицированных клеток.

Ключевые слова: CRISPR/Cas; *Cas9*; ячмень; протопласты; *Nud*; *Vrs1*; регенерация; трансфекция; сайт-направленный мутагенез; культивирование *in vitro*.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Gerasimova S.V., Korotkova A.M., Hertig C., Hiekel S., Hoffie R., Budhagatapalli N., Otto I., Hensel G., Shumny V.K., Kochetov A.V., Kumlehn J., Khlestkina E.K. Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1033-1039. DOI 10.18699/VJ18.447

Targeted genome modification is a modern, particularly versatile tool to genetically engineer plants (amongst other organisms) (Gerasimova et al., 2017). There are a lot of reports of successful crop improvement using different applications of RNA-guided endonucleases (RGEN) which is also known as Cas endonuclease technology or CRISPR/Cas technology (Korotkova et al., 2017). Most of the published studies on barley targeted genome modification were performed on the model cultivar Golden Promise (Holme et al., 2017; Kapusi et al., 2017; Holubova et al., 2018; Kumar et al., 2018). To take full advantage of this technology for agricultural production, one needs to establish protocols for elite germplasm. In cereals however, the feasibility of genetic engineering is highly dependent on the genotype used (Kumlehn, Hensel, 2009). In the West Siberia region of the Russian Federation, barley occupies an area of three million hectares. The introduction of Cas endonuclease technology for breeding of Siberian varieties is a challenge, because effective protocols for *in vitro* regeneration, transformation and genome modifications of elite lines are yet to be established. The present study aims to select candidate barley cultivars for targeted genome modification and to demonstrate the modification of valuable trait-controlling genes in the genome of Siberian barley using Cas endonuclease technology. As first criterion for cultivar selection, recommendations of local breeders were considered. Next, a representative panel of pre-selected local cultivars was tested for efficient *in vitro* regeneration from immature embryos, which constitute the explant of choice for barley genetic engineering procedures. One cultivar from the Russian spring barley collection was eventually selected to conduct a genome modification experiment using mesophyll protoplasts. As targets, two previously known barley domestication genes controlling valuable traits in monogenic fashion were selected. The *Nud* gene controls hulled *vs*. naked barley (Taketa et al., 2008) and the *Vrs1* gene controls two-rowed *vs*. six-rowed barley (Pourkheirandish et al., 2015).

Material and methods

Plant material. The ten following West Siberian barley cultivars have been selected from the Russian spring barley collection according to the advice of local barley breeders: Biom, Talan, Vorsinskiy2, Aley, Acha, Signal, L-421, Kolchan, V-1, Krasnoyarskiy91. The model cultivar Golden Promise was used as a control with a high *in vitro* regeneration potential. Plants were grown under greenhouse conditions until milk or wax ripening stage of the caryopses.

Evaluation of *in vitro* regeneration efficiency. Milk or wax ripening stage spikes (stage 75–83 of BBCH scale) were harvested; grains were isolated from spikes and sterilized by 96 % ethanol for thirty seconds and bleach-surfactant solution (1:1 water dilution of Domestos, Unilever) for four minutes with subsequent washing in sterile water. Analysis was performed separately for five plants of each cultivar. For analysis, one-three spikes were taken from each plant, 10 to 13 immature embryos per plant were isolated. As a control the model barley cultivar Golden Promise was used.

After dissection and removal of the embryonic axis, embryos were plated scutellum side up on callus induction medium (4.3 g/l Murashige & Skoog plant salt base, 30 g/l maltose·H_2O, 1.0 g/l casein hydrolysate, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 160 mg/l, 350 mg/l myo-inositol, 690 mg/l proline, 1.0 mg/l thiamine·HCl, 2.5 mg/l Dicamba, 3.5 g/l Phytagel, pH adjusted to 5.8 with NaOH) and incubated at 22 °C in the dark (Harwood et al., 2009). After four weeks of cultivation on callus induction medium, calli were transferred to transition medium (2.7 g/l Murashige & Skoog modified plant salt base [without NH_4NO_3], 20 g/l maltose·H_2O, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 160 mg/l, 165 mg/l NH_4NO_3, 750 mg/l glutamine, 100 mg/l myo-inositol, 0.4 mg/l thiamine·HCl, 2.5 mg/l 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 0.1 mg/l 6-benzylaminopurine, 3.5 g/l Phytagel, pH adjusted to 5.8) and were cultivated for another four weeks at 22 °C under low light. Then, calli were transferred to regeneration medium (2.7 g/l Murashige & Skoog modified plant salt base [without NH_4NO_3], 20 g/l maltose·H_2O, 165 mg/l NH_4NO_3, 750 mg/l

glutamine, 100 mg/l myo-inositol, 0.4 mg/l thiamine·HCl, 3.5 g/l Phytagel, pH 5.8) at 22 °C under full light (16/8 hours day/night). The number of explants giving rise to regenerated plants was counted after four weeks of growing at regeneration medium. The *in vitro* regeneration efficiency was calculated as percent of explants producing regenerating plants. The Mann–Whitney U test was performed for each Siberian cultivar for pairwise comparison to the control Golden Promise with regards to *in vitro* regeneration efficiency.

Target gene sequencing, guide-RNA design and vector construction. Genomic DNA was isolated from leaves of barley cv. Aley. A two cm-long piece of leaf was cut, transferred to the tube with 200 µl of warm (60 °C) buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5–8.0, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1.25 % SDS, 0.38 % $Na_2S_2O_5$) and ground in a homogenizer. Then, 500 µl of buffer was added and incubated at 60 °C for 30 minutes with subsequent addition of 700 µl of chloroform-isoamyl alcohol mixture (24:1) and centrifugation at 12000 g for 25 minutes. The upper fraction was collected and mixed with 1.4 ml of 96 % ethanol. DNA was precipitated by centrifugation again at 12000 g for 25 minutes, washed with 70 % ethanol and dissolved in TE buffer. Fragments corresponding to first exons of *Nud* (HORVU7Hr1G089930) and *Vrs1* (HORVU2Hr1G092290) barley genes were amplified from genomic DNA using the primers Hv_Nud_1exF and Hv_Nud_1exR for the *Nud* gene and Hv_Vrs1_F1 and Hv_Vrs1_R1 for the *Vrs1* gene (Suppl. Table)[1]. PCR fragments were subjected to Sanger sequencing. To confirm the identity of target sites in the Aley genome to known reference sequences (morex_contig_43456 CAJW010043456 carma=7HL, morex_contig_135757 CAJW010135757 carma=2HL, barke_contig_396030 CAJV010295100 carma=7HL, barke_contig_69176 CAJV010052191, bowman_contig_850766 CAJX010845871 carma=7HL, bowman_contig_16990 CAJX010016287), a pairwise alignment of sequenced *Nud* and *Vrs1* first exons was performed.

Target site selection was performed using the online tools DESKGEN (https://www.deskgen.com/landing/; Doench et al., 2016) and WuCRISPR (Wong et al., 2015). Guide-RNA secondary structures were modelled using the RNAfold tool (Gruber et al., 2008).

The generic vector pSH121 harboring maize codon-optimized Cas9 under control of *Zea mays Ubiquitin-1* promoter and a guide-RNA scaffold preceded by the rice *U3* promoter was used as a backbone for final RGEN vector construction. To this end, pSH121 had been generated from pSH91 (Budhagatapalli et al., 2016) using a Gibson assembly approach (Gibson et al., 2009) in order to remove the necessity for a Guanine as starting nucleotide of the gRNA. The DNA molecules for the Gibson assembly were generated as followed: pSH91 was digested by *Hind*III restriction enzyme; DNA fragments were separated in agarose gel and the 10166 bp fragment containing the Cas9 expression cassette was isolated from the gel. Two additional DNA molecules with overhangs each compatible to the end of another DNA molecule used, were created in separate PCRs using pSH91 as template and either the oligonucleotide pair OsU3-1_GibF- OsU3-1_GibR or OsU3-1_GibF- OsU3-1_GibR (see Suppl. Table). The resulting 487 and 1633 bp amplicons were purified using the GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Gibson assembly of the three described DNA molecules was performed using the NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB) according to the manufacturers instructions.

The target-specific ca. 20 bp region of the gRNA can be inserted into pSH121 vector between two *Bsa*I restriction sites as a double-stranded oligonucleotide with 5′-overhang tails. Double-stranded oligos were created by melting and reannealing the following pairs of oligonucleotides: Nud_ex1-45-F and Nud_ex1-45-R, Nud_ex1-50-F and Nud_ex1-50-R, Vrs1_ex1-33-F and Vrs1_ex1-33-R (see Suppl. Table). pSH121 was digested by *Bsa*I restriction enzyme; DNA fragments were separated in agarose gel. The 10972 bp fragment was eluted from a gel and used in three ligation reactions with double-stranded oligonucleotides. As a result of ligation, three RGEN vectors VRS1-33RGEN, NUD-45RGEN and NUD-50RGEN were assembled. The accuracy of construct assembly was confirmed by Sanger sequencing.

Protoplast isolation and transformation. Grains were germinated in the dark at 23 °C. Leaf samples from seven days-old etiolated seedlings were used for protoplast isolation. Protoplasts were isolated according to Q. Shan et al. (2014). Protoplast sample quality and cell population density were estimated in a counter chamber slide using a microscope. A total amount of 20 µg plasmid DNA consisting of gRNA/Cas9 transformation vector and GFP expression vector pYF133 (Fang et al., 2002) was taken to transform 5×10^5 protoplasts in 220 µl volume. PEG-mediated transfection was performed according to Q. Shan et al. (2014). After two days of incubation at 21 °C, the transformed protoplasts were observed using an inverted fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200M, filter set 13 with excitation wavelength BP 470/20 and emission wavelength BP 505–530). The proportion of GFP-positive cells was calculated per counting field of the chamber slide to provide a metric for transformation efficiency.

DNA isolation, library preparation, deep amplicon sequencing analysis. Genomic DNA was isolated from protoplast samples by the method described by W. Wang et al. (2016). For each gene, specific primers were designed to amplify target loci from protoplast genomic DNA. Target fragments were amplified using primer pairs Hv_Nud_F4-Hv_Nud_1exR and Hv_Vrs1_1exF- Hv_Vrs1_1exR for *Nud* and *Vrs1* genes, respectively (see Suppl. Table). Amplicon barcoding and library preparation was performed according to recommendations of the service provider for amplicon sequencing (https://en.novogene.com/next-generation-sequencing-services/microbial-genome/amplicon-sequencing/). Sequencing was performed using the Illumina HiSeq platform generating paired-end 250 bp reads. After filtration, the sequence depth ranged from 6000 to 8000 reads per amplicon sample. The indel frequency and patterns induced by VRS1-33RGEN, NUD-45RGEN and NUD-50RGEN vectors were analyzed. The threshold for mutation detection was adjusted to the level of one percent. Indel frequency was normalized to the control GFP vector co-transformation efficiency.

Results

Cultivar selection. The regeneration test was performed in order to select the candidate cultivars for further establishment

[1] Supplemantary Materials are available in the online version of the paper: http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx16.pdf

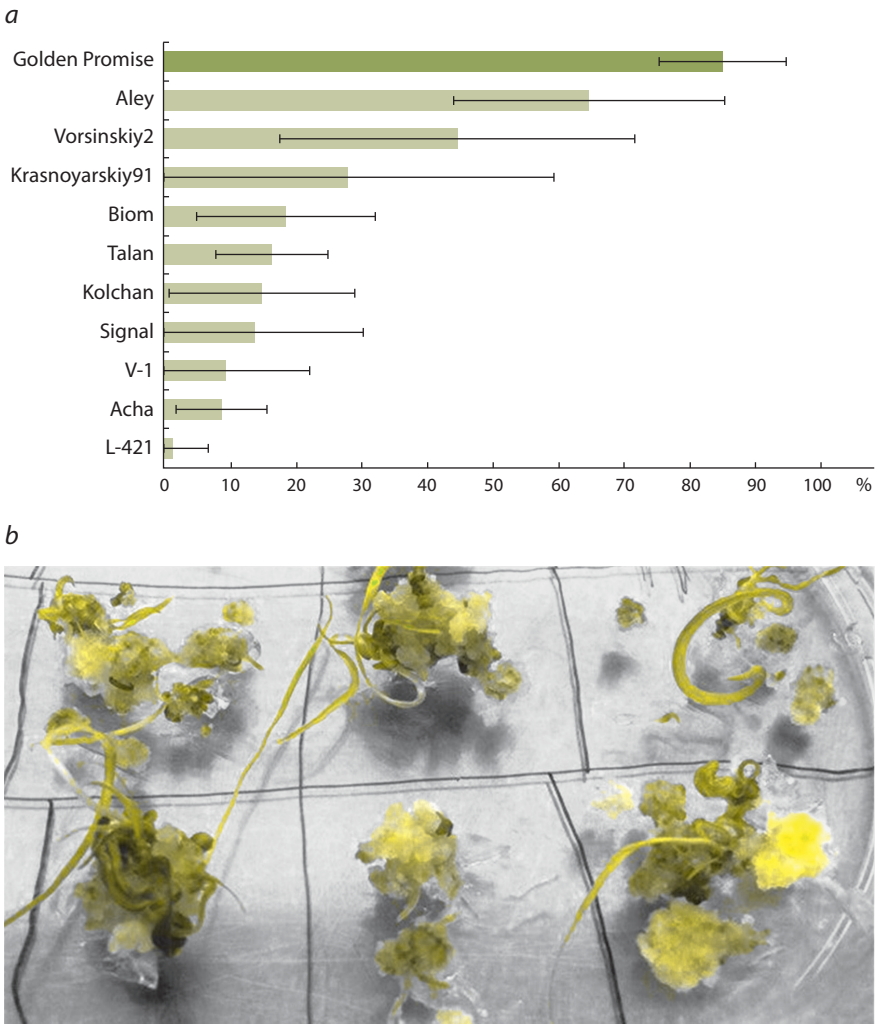


Fig. 1. *In vitro* regeneration from immature embryos of 10 Siberian barley cultivars in comparison to the model cultivar Golden Promise.

a – numbers represent percent of explants producing regenerated plants. Horizontal bars represent standard deviation; *b* – plantlet regeneration from callus of the Siberian barley cultivar Aley.

of targeted genome modification protocols. A standard protocol for *Agrobacterium*-mediated barley transformation using immature embryos (Harwood et al., 2009) was adopted and control regeneration tests with neither *Agrobacterium* inoculation nor use of selective agents were performed. Fig. 1 (*a*) shows the percentage of explants which gave rise to regenerated plants. Nine out of ten Siberian barley cultivars showed significantly ($p < 0.05$) lower regeneration efficiency than the model cultivar Golden Promise, whereas only one cultivar from the experimental group did not differ significantly ($p > 0.05$) from this control. Aley evidently performed best across all experimental repetitions showing an overall efficiency over 60 % (see Fig. 1). Consequently, this cultivar was chosen for the following genome modification experiment.

Target site selection and vector construction. The barley genes *Nud* and *Vrs1* were selected for targeted mutagenesis. To reveal the sequence of these genes in the Siberian cultivar Aley, specific primers were designed based on the barley reference sequence and a fragment containing the first exon of the respective gene was amplified and sequenced. Alignment to *Nud* and *Vrs1* sequences available in databases showed high identity of the Aley gene variants to the reference (Suppl. Figure). Target sites were selected in the first exon of each gene, two sites for *Nud* and one for *Vrs1*. The generic vector pSH121 (Fig. 2, *a*) was used to generate the three target-specific vectors used for transformation experiments (Table 1).

Evaluation of genome modifications in protoplasts. Protoplasts were isolated from seedlings of barley cv. Aley and co-transformed with two vectors, more specifically, any one of the RGEN vectors and the control vector pYF133 harboring a GFP expression cassette (see Fig. 2, *a* and *b*). Anticipating that the transformation efficiency of the co-transformed GFP plasmid is equal to that of the gRNA/Cas9 vector, the proportion of green fluorescing cells was used to normalize the cleavage activity of the respective guide-RNA tested (Lin et al., 2018). Genomic DNA was isolated from protoplasts and used as a template for the amplification of target sequences. Mutations were detected in each target site and occurred with different frequency (Table 2, Fig. 2, *c*). The Nud-45 guide-RNA showed the highest efficiency in this experiment (22 %). There were only few mutation types detected for each target site (see Fig. 2, *c*). Three different deletion sizes were detected for the Nud-45 target site (–1, –2 and –9 nucleotides), two deletion sizes for the Nud-50 target site (–5 and –6 nt) as well as one deletion and one insertion size for the Vrs1-33 target site (–3 and +1 nt).

Discussion

Little is known about the mechanisms which are causative for the high genotype dependence of genetic engineering. Most available reports of targeted barley genome modifications describe mutations in the Golden Promise genome. We aimed to demonstrate successful targeted genome modifications in cells of a non-model elite Siberian barley cultivar. The protoplast system is a well established tool for assessing the efficiency of targeted genome modifications in plants. The evaluation of RGEN cleavage efficacy *in vivo* allows one to select the best variants of target site/guide RNA pairs (Budhagatapalli et al., 2016).

We selected two target genes controlling domestication traits in barley. The *Nud* and *Vrs1* genes control hulled *vs.* naked and two rowed *vs.* six rowed barley variants, respectively. The selected cv. Aley features a hulled and two-rowed phenotype and its genome contains wild-type alleles of both genes. Two sites in the *Nud* and one site in the *Vrs1* coding sequence were targeted.

Table 1. Target sites, target-specific parts of guide-RNAs and transformation vectors (PAM, protospacer-adjacent motif; CDS, coding sequence)

Gene	Target site with PAM (underlined)	Target position in the CDS	Target-specific part of guide-RNA	Final vector
Nud	GGAGACCCAGGAGCCCCAGTGG	45–64, exon 1	GGAGACCCAGGAGCCCCAG	NUD-45RGEN
Nud	GCTCCTGGGTCTCCGAGATCAGG	50–69, exon 1	GCTCCTGGGTCTCCGAGATC	NUD-50RGEN
Vrs1	GTGGACACGACTTTCTTCGCGG	33–52, exon 1	GTGGACACGACTTTCTTCG	VRS1-33RGEN

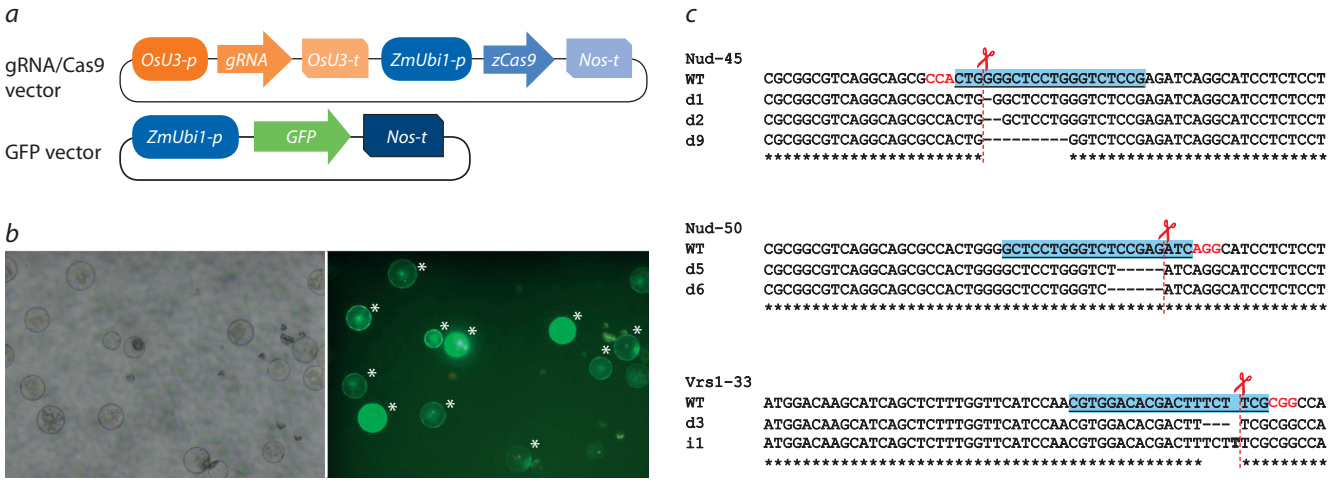


Fig. 2. Protoplast transformation and detection of site-directed mutations.

a – vector architectures used for protoplast transformation; gRNA/Cas9 vector corresponds to pSH121; GFP vector – to pYF133; *OsU3-p* – rice *U3* promoter; *gRNA* – chimeric guide RNA; Os*U3-t* – rice *U3* terminator element; *ZmUbi1-p* – maize *Ubiquitin-1* promoter; *zCas9* – maize codon-optimized Cas9 endonuclease; *Nos-t* – 3′-signal of nopaline synthase gene; *b* – GFP detection in transformed protoplasts; bright field (left) and GFP filter (right). GFP-positive cells are marked with asterisk; *c* – mutation types obtained in Aley protoplasts for the three target sites (marked blue, PAM in red).

Table 2. Mutation detection in protoplasts with the given mutation frequencies being normalized to transformation efficiency

Guide-RNA	Total number of reads	Transformation efficiency	Mutation type*	Number of reads with mutation	Mutation frequency, %
Nud-45	6758	0.66	–G (–1)	691	15.5
			–GG (–2)	210	4.7
			–GGGCTCCTG (–9)	81	1.8
Nud-50	7821	0.46	–CTCGGA (–6)	158	4.4
			–CTCGG (–5)	112	3.1
Vrs1-33	6553	0.35	–TTC (–3)	74	3.2
			+T (+1)	66	2.9

* Number of inserted or deleted nucleotides is indicated in parenthesis.

Aley protoplast transformation efficiency was estimated from the proportion of GFP-positive cells which ranged from 0.35 to 0.66. This result is well comparable with previously published data (Bai et al., 2014; Lin et al., 2018). For all three selected target sites, mutated variants were obtained at frequencies of 6 to 22 % (normalized to transformation efficiency). There is no published data of targeted genome modification efficiency in barley protoplasts, but in comparison to other Poaceae family species, comparable mutation frequencies were obtained (Lin et al., 2018). However, the diversity of mutation types seen in the present study is comparatively low. There was no predominant type of mutations common for all target sites, i.e. mutation patterns were different for each particular case. We assume that the mutation type depends on target site properties; for example, the 9-nucleotides deletion of the Nud-45 site and the three nucleotides deletion for Vrs1-33 site might be due to sequence-specific microhomologies, and the insertion of T to Vrs1-33 site could be due to the reconstruction of a short CTTT repeat within the target site.

Our data show that RGEN-mediated genome modification is possible in cells of Siberian barley. To obtain plants of desirable genotypes with predefined genome modifications,

the genotype dependency of gene transfer mechanisms and *in vitro* regeneration has to be considerably reduced.

The number of genotypes hitherto engineered using Cas endonuclease technology is highest in rice (45 genotypes), which is followed by tomato (10), wheat (7), potato (4), oilseed rape (3), and further by switchgrass, soybean, maize, grapes and cucumbers with two genotypes per crop, and finally by barley, orange, grapefruit, apple, flax and cotton with only one genotype per crop (Korotkova et al., 2019). Further development of Cas endonuclease technology and its broad application potential for crop improvement requires involvement of more genotypes and varieties. Our results reveal a wide range of *in vitro* regeneration efficiency for a preselected group of 10 Siberian barley cultivars. Only one out of ten cultivars is comparable in regeneration efficiency with model cultivar Golden Promise. Aley is our current prime candidate cultivar for further establishment of stable genetic transformation. Identification of transformation amenability loci in the genome of Golden Promise and introduction of respective alleles into genomes of elite cultivars via marker-assisted selection has been suggested to create elite germplasm with increased transformation amenability (Hisano et al., 2017). Another approach may involve a transient overexpression of genes which enhance cellular totipotency. The maize *Baby boom* (*Bbm*) and *Wuschel2* (*Wus2*) genes were successfully used to stimulate transformation in maize and sorghum (Lowe et al., 2016, 2018). Further studies on the genetic control of barley transformation and regeneration ability and the utilization of known "transformation amenability" genes in genetic engineering experiments may facilitate the transition from fundamental research to practical applications.

Conclusion

Our study demonstrates the technical limitations of RGEN application for local cultivars. We showed that only a small portion of Siberian elite barley cultivars has useful *in vitro* regeneration ability. At the same time, we demonstrated at the cellular level that important genes of a local Siberian cultivar can readily be modified at predefined target motifs by Cas endonuclease technology. These results indicate that further work in the field of crop improvement has to be focused on developing efficient genetic engineering and *in vitro* regeneration systems and/or straightforward and universally useful methods for Cas9/gRNA delivery and targeted genome modification without the necessity of *in vitro* regeneration.

Acknowledgements

This study was supported by the Russian Science Foundation, project No. 16-14-00086.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bai Y., Han N., Wu J., Yang Y., Wang J., Zhu M., Bian H. A transient gene expression system using barley protoplasts to evaluate microRNAs for post-transcriptional regulation of their target genes. Plant Cell Tiss. Organ Cult. (PCTOC). 2014;119(1):211-219. DOI 10.1007/s11240-014-0527-z.

Budhagatapalli N., Schedel S., Gurushidze M., Pencs S., Hiekel S., Rutten T., Kusch S., Morbitzer R., Lahaye T., Panstruga R., Kumlehn J., Hensel G. A simple test for the cleavage activity of customized endonucleases in plants. Plant Methods. 2016;12:18. DOI 10.1186/s13007-016-0118-6.

Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. Nat. Biotechnol. 2016;34(2):184-191. DOI 10.1038/nbt.3437.

Fang Y.D., Akula C., Altpeter F. Agrobacterium-mediated barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using green fluorescent protein as a visual marker and sequence analysis of the T-DNA::barley genomic DNA junctions. J. Plant Physiol. 2002;159:1131-1138. DOI 10.1078/0176-1617-00707.

Gerasimova S.V., Khlestkina E.K., Kochetov A.V., Shumny V.K. Genome editing system CRISPR/Cas9 and peculiarities of its application in monocots. Russ. J. Plant Physiol. 2017;64(2):141-155. DOI 10.1134/S1021443717010071.

Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat. Methods. 2009;6:343-345. DOI 10.1038/nmeth.1318.

Gruber A.R., Lorenz R., Bernhart S.H., Neuböck R., Hofacker I.L. The Vienna RNA websuite. Nucleic Acids Res. 2008;36(Web Server issue):W70-W74. DOI 10.1093/nar/gkn188.

Harwood W.A., Bartlett J.G., Alves S.C., Perry M., Smedley M.A., Leyland N., Snape J.W. Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques. Methods Mol. Biol. 2009;478:137-147. DOI 10.1007/978-1-59745-379-0_9.

Hisano H., Meints B., Moscou M.J., Cistue L., Echávarri B., Sato K., Hayes P.M. Selection of transformation-efficient barley genotypes based on TFA (transformation amenability) haplotype and higher resolution mapping of the TFA loci. Plant Cell Rep. 2017;36(4):611-620. DOI 10.1007/s00299-017-2107-2.

Holme I.B., Wendt T., Gil-Humanes J., Deleuran L.C., Starker C.G., Voytas D.F., Brinch-Pedersen H. Evaluation of the mature grain phytase candidate HvPAPhy_a gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs. Plant Mol. Biol. 2017;95(1-2):111-121. DOI 10.1007/s11103-017-0640-6.

Holubova K., Hensel G., Vojta P., Tarkowski P., Bergougnoux V., Galuszka P. Modification of barley plant productivity through regulation of cytokinin content by reverse-genetics approaches. Front. Plant Sci. 2018;9:1676. DOI 10.3389/FPLS.2018.01676.

Kapusi E., Corcuera-Gómez M., Melnik S., Stoger E. Heritable genomic fragment deletions and small indels in the putative ENGase gene induced by CRISPR/Cas9 in barley. Front. Plant Sci. 2017;8:540. DOI 10.3389/fpls.2017.00540.

Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019. (In press).

Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. Crop genes modified using the CRISPR/Cas system. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2017;7(8). DOI 10.1134/S2079059717050124.

Kumar N., Galli M., Ordon J., Stuttmann J., Kogel K.H., Imani J. Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9 gene-editing system. Plant Biotechnol. J. 2018;16(11):1892-1903. DOI 10.1111/pbi.12924.

Kumlehn J., Hensel G. Genetic transformation technology in the Triticeae. Breed. Sci. 2009;59:553-560. DOI 10.1270/jsbbs.59.553.

Lin C.S., Hsu C.T., Yang L.H., Lee L.Y., Fu J.Y., Cheng Q.W., Wu F.H., Hsiao H.C.W., Zhang Y., Zhang R., Chang W.J., Yu C.T., Wang W., Liao L.J., Genvin S.B., Shih M.C. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. Plant Biotechnol. J. 2018;16(7):1295-1310. DOI 10.1111/pbi.12870.

Lowe K., La Rota M., Hoerster G., Hastings C., Wang N., Chamberlin M., Wu E., Jones T., Gordon-Kamm W. Rapid genotype "independent" *Zea mays* L. (maize) transformation via direct somatic

embryogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2018;54(3):240-252. DOI 10.1007/s11627-018-9905-2.

Lowe K., Wu E., Wang N., Hoerster G., Hastings C., Cho M.J., Scelonge C., Lenderts B., Chamberlin M., Cushatt J., Wang L., Ryan L., Khan T., Chow-Yiu J., Hua W., Yu M., Banh J., Bao Z., Brink K., Igo E., Rudrappa B., Shamseer P.M., Bruce W., Newman L., Shen B., Zheng P., Bidney D., Falco C., Register J., Zhao Z.Y., Xu D., Jones T., Gordon-Kamm W. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve Monocot transformation. Plant Cell. 2016;28(9):1998-2015. DOI 10.1105/tpc.16.00124.

Pourkheirandish M., Hensel G., Kilian B., Senthil N., Chen G., Sameri M., Azhaguvel P., Sakuma S., Dhanagond S., Sharma R., Mascher M., Himmelbach A., Gottwald S., Nair S.K., Tagiri A., Yukuhiro F., Nagamura Y., Kanamori H., Komatsuda T. Evolution of the grain dispersal system in barley. Cell. 2015;162(3):527-539. DOI 10.1016/J.CELL.2015.07.002.

Shan Q., Wang Y., Li J., Gao C. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. Nature Protoc. 2014;9(10):2395-2410. DOI 10.1038/nprot.2014.157.

Taketa S., Amano S., Tsujino Y., Sato T., Saisho D., Kakeda K., Nomura M., Suzuki T., Matsumoto T., Sato K., Kanamori H., Kawasaki S., Takeda K. Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008;105(10):4062-4067. DOI 10.1073/pnas.0711034105.

Wang W., Akhunova A., Chao S., Akhunov E. Optimizing multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for wheat. BioRxiv. DOI 10.1101/051342.

Wong N., Liu W., Wang X. WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. Genome Biol. 2015;16: 218. DOI 10.1186/s13059-015-0784-0.

ORCID ID

S.V. Gerasimova orcid.org/0000-0001-8626-1831

C. Hertig orcid.org/0000-0002-2320-7579

S. Hiekel orcid.org/0000-0001-7649-3989

R. Hoffie orcid.org/0000-0003-1013-6027

N. Budhagatapalli orcid.org/0000-0002-5537-8276

G. Hensel orcid.org/0000-0002-5539-3097

J. Kumlehn orcid.org/0000-0001-7080-7983

E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1040-1045
DOI 10.18699/VJ18.448

Вирус Зика обладает онколитической активностью в отношении клеток U87 глиобластомы человека

В.А. Святченко[1] ✉, И.А. Разумов[1, 2], Е.В. Протопопова[1], А.В. Демина[1], О.И. Соловьева[2], Е.Л. Завьялов[2], В.Б. Локтев[1, 2]

[1] Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Глиобластома – высокозлокачественная опухоль головного мозга. Виротерапия с использованием онколитических вирусов начинает широко использоваться в клинической практике для лечения злокачественных опухолей человека. Целью настоящей работы было исследование возможных онколитических свойств вируса Зика в отношении глиобластом человека. В экспериментах *in vitro* показано, что вирус Зика способен избирательно лизировать опухолевые клетки глиобластомы человека U87 MG, индекс селективности (отношение инфекционного титра для опухолевых клеток к титру на нормальных нетрансформированных клетках) равнялся $2 \cdot 10^2$. Избирательность репликативной активности вируса Зика в отношении клеток глиобластомы U87 MG дополнительно подтверждена методом непрямой иммунофлуоресценции. На иммунодефицитных SCID мышах с привитыми подкожными ксенографтами глиобластомы человека U87 MG показана выраженная противоопухолевая активность вируса Зика при проведении курса (ежедневно, в течение 4 дней) интратуморального введения $5 \cdot 10^5$ ТЦД$_{50}$ вируса Зика. Рост опухоли ингибировался более чем в 10 раз, вплоть до полного ее исчезновения. Индекс торможения роста опухоли составил 92.63 %. Рецидивов (метастазов) повторного роста опухоли не зарегистрировано в течение 64 сут наблюдения. Представленные в настоящей работе результаты показывают перспективность дальнейших исследований вируса Зика как потенциального онколитического агента против глиобластом человека.

Ключевые слова: вирус Зика; виротерапия; глиобластома U87; ксенотрансплантация.

Zika virus has an oncolytic activity against human glioblastoma U87 cells

V.A. Svyatchenko[1] ✉, I.A. Razumov[1, 2], E.V. Protopopova[1], A.V. Demina[1], O.I. Solovieva[2], E.L. Zavjalov[2], V.B. Loktev[1, 2]

[1] State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Glioblastoma is a highly lethal brain cancer. Virotherapy with the use of oncolytic viruses has since recently been regarded as a promising approach for the clinic treatment of human glioblastomas. The purpose of this work was to perform a primary evaluation of the Zika virus as a potential oncolytic agent against glioblastomas. *In vitro* experiments showed that the Zika virus strain MR 766 is able to selectively infect and lyse neoplastic cells of the human glioblastoma cell line U87 MG. The selectivity index (SI, the ratio of infectious titer for tumor cells to titer on normal untransformed cells) was $2 \cdot 10^2$. The selectivity of the replicative activity of Zika virus in relation to U87 MG glioblastoma cells was additionally confirmed by indirect immunofluorescence. Using the model of immunodeficient SCID mice with subcutaneous xenografts of human glioblastoma U87 MG, a strong antitumor activity of the Zika virus under a course (daily for 4 days) of intratumoral administration of $5 \cdot 10^5$ TCID$_{50}$ of Zika virus was shown. Treatment with Zika virus resulted in more than a 10-fold reduction in mean volumes of tumors. The tumor growth inhibition index was 92.63 %. Recurrences (metastases) of tumor re-growth were not registered within 64 days of observation. This result demonstrated the prospect of further in-depth studies of the Zika virus as a potential oncolytic agent against human glioblastomas.

Key words: Zika virus; virotherapy; glioblastoma U87 MG; xenotransplantation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Святченко В.А., Разумов И.А., Протопопова Е.В., Демина А.В., Соловьева О.И., Завьялов Е.Л., Локтев В.Б. Вирус Зика обладает онколитической активностью в отношении клеток U87 глиобластомы человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1040-1045. DOI 10.18699/VJ18.448

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Svyatchenko V.A., Razumov I.A., Protopopova E.V., Demina A.V., Solovieva O.I., Zavjalov E.L., Loktev V.B. Zika virus has an oncolytic activity against human glioblastoma U87 cells. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1040-1045. DOI 10.18699/VJ18.448 (in Russian)

Received October 8, 2018
Revised November 6, 2018
Accepted November 6, 2018

✉ e-mail: svyat@vector.nsc.ru

Глиобластома человека играет ведущую роль среди злокачественных опухолей головного мозга. Использование традиционных методов лечения онкологических заболеваний: лучевой терапии, химиотерапии и хирургического удаления опухоли, а также их комбинаций – обладает весьма низкой эффективностью (Stupp et al., 2009). Обычно продолжительность жизни пациентов после постановки диагноза составляет менее двух лет. Одна из причин такой неэффективности традиционных методов лечения глиобластом – выраженная гетерогенность опухоли. В ткани опухоли обнаруживают нетрансформированные и опухолевые клетки, а также популяцию стволовых опухолевых клеток глиобластомы (glioblastoma stem cells – GSCs) (Chen et al., 2012). По всей вероятности, GSC предопределяют высокий уровень злокачественности опухоли у человека. Стволовые клетки обеспечивают высокий уровень клеточной пролиферации, формирование сосудов при быстром росте опухоли и ее инвазивный потенциал (Bao et al., 2006; Alvarado et al., 2017). Обычно глиобластомы редко метастазируют за пределы центральной нервной системы, а у большинства пациентов после хирургического вмешательства выявляются рецидивы опухоли в пределах 2–3 см от исходной полости резекции (Wallner et al., 1989). Эта особенность глиобластом предполагает возможную перспективность локальных методов противоопухолевой терапии, включая применение онколитических вирусов (Alonso et al., 2012; Kaufmann, Chiocca, 2014; Miska et al., 2016; Cassady et al., 2017; Cattaneo, Russell, 2017; Shchelkunov et al., 2018). Принято считать, что эффективность виротерапии зависит от способности вирусов специфично инфицировать и лизировать опухолевые клетки в организме и обеспечивать формирование противоопухолевого иммунитета (Cattaneo, Russell, 2017).

Вирус Зика является представителем рода *Flavivirus* (семейство Flaviviridae), который включает более 53 видов РНК-содержащих вирусов (Simmonds et al., 2017). Многие из них вызывают различные заболевания человека: лихорадку денге, лихорадку Западного Нила, желтую лихорадку и ряд других вирусных инфекций. Вирус Зика был открыт в 1948 г. и долгое время считался непатогенным для человека. Недавняя вспышка заболевания лихорадкой Зика в Бразилии и ассоциированные с ней случаи микроцефалии новорожденных стимулировали исследования этого вируса (Garcez et al., 2016; Lazear et al., 2016; Li et al., 2016; Ming et al., 2016; Qian et al., 2016; Shan et al., 2016). Было установлено, что вирус Зика инфицирует клетки-предшественники центральной нервной системы эмбриона, что сопровождается потерей способности клеток к пролиферации, дифференцировке и их последующей гибели. Для взрослого организма, напротив, вирус Зика малопатогенен: приблизительно в 80 % случаев он вызывает бессимптомную инфекцию, а в большинстве остальных случаев вызывает легкую лихорадку, не требующую лечения. Это послужило основанием для исследования онколитической активности вируса Зика против стволовых клеток глиобластомы (Zhu et al., 2017). Удалось обнаружить онколитическую активность адаптированного к мышам вируса Зика на мышиных моделях с использованием клеток глиобластом мыши.

Цель настоящей работы – исследование способности вируса Зика к избирательному инфицированию и лизису клеток глиобластомы человека U87 MG *in vitro* и его противоопухолевой активности *in vivo*, на модели ксенотрансплантации клеток U87 MG иммунодефицитным мышам SCID с последующим введением вируса Зика в опухоль.

Материалы и методы

Клеточные линии. В работе использовали: культуру опухолевых клеток глиобластомы человека U87 MG (ATCC HTB 14), культуры клеток почки эмбриона зеленой мартышки Vero E6 (ATCC CRL-1586) и почки эмбриона человека HEK293A (TermoFisher R70507), диплоидную нетрансформированную эпителиальную культуру клеток легких эмбриона человека MRC5 (ATCC CCL 171). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (1 : 1), содержащей 10 % фетальной сыворотки (Invitrogen), 80 мкг/мл гентамицина сульфата при 37 °C в культуральных пластиковых флаконах (Costar). Для снятия клеток с субстрата применяли 0.25 % раствор трипсина и 0.02 % раствор Версена в соотношении 1 : 1.

Вирус Зика штамм MR766 (ATCC® VR-84™) культивировали на монослойной культуре клеток Vero E6. При достижении 85–90 % цитопатогенного воздействия вируса на клеточную культуру собирали культуральную среду и осветляли центрифугированием (1 500 g, 10 мин), после чего вирус очищали с использованием центрифужных концентраторов Vivaspin 20 (Sartorius Stedim Biotech). Инфекционную активность вируса в полученных вирусосодержащих суспензиях определяли на культуре клеток Vero E6 микрометодом согласно (Chanas et al., 1976).

Исследование селективной репликативной и литической активности вируса Зика *in vitro*. Культуры опухолевых (U87 MG), перевиваемых (Vero E6 и HEK 293A), а также нормальных нетрансформированных (MRC5) клеток человека, культивируемые на 96-луночных культуральных планшетах, инфицировали стандартными десятикратными разведениями вируса Зика. Инфицированные клетки инкубировали 6 сут при 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO_2. Регистрацию цитолитического (цитопатического) эффекта на клетки осуществляли с использованием МТТ-теста (Niks, Otto, 1990). Литическую активность вируса в отношении опухолевых и нормальных клеток выражали через $ТЦД_{50}$/мл (50 % тканевая цитопатогенная доза).

Для подтверждения способности вируса Зика к избирательной репликации в клетках глиобластомы использовали метод непрямой иммунофлуоресценции. Субконфлюентные культуры U87 MG и MRC5, культивируемые в 24-луночных культуральных планшетах, инфицировали с множественностью 0.1 $ТЦД_{50}$/кл. Инфицированные клетки инкубировали 6 сут, после чего фиксировали охлажденным до –20 °C 70 % этанолом. Неспецифическое связывание блокировали посредством добавления блокирующего буфера (1 % БСА, 0.1 % Твин-20 в ФСБ) с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 1 ч. После удаления блокирующего буфера добавляли специфические к вирусу Зика мышиные иммуноглобулины в разведении 1 : 500 и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После двукратной промывки

блокирующим буфером добавляли вторичные флуоресцентные антитела в разведении 1 : 500 (кроличий антимышиный IgG конъюгат, Alexa Fluor® 488, MolecularProbes, Eugene) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После двукратной промывки проводили учет результатов при помощи флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert.

Животные. Исследование выполнено на самцах мышей линии SCID (SHO-*PrkdcscidHrhr*) SPF-статуса в возрасте 6–7 нед. Животные содержались в Центре генетических ресурсов лабораторных животных на базе ЦКП «SPF-виварий» Института цитологии и генетики СО РАН однополыми семейными группами по 2–5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (IVC) системы Opti Mice (Animal Care Systems) в контролируемых условиях, при температуре 22–26 °C, относительной влажности 30–60 % и световом режиме свет/темнота 14/10 с рассветом в 01:00. Корм Ssniff (Германия) и вода после обратного осмоса, обогащенная минеральной смесью «Северянка» (Санкт-Петербург), животным предоставлялись *ad libitum*. В течение эксперимента состояние мышей регистрировали ежедневно. В частности, оценивали изменения состояния кожных покровов, двигательной активности и поведения. Если мышь демонстрировала выраженные признаки токсичности, например изогнутость, сгорбленность, снижение активности, и потерю массы тела более 20 %, то эти особи подвергались эвтаназии в соответствии с требованиями гуманного отношения к животным. Запланированную эвтаназию осуществляли передозировкой CO_2, сопровождаемой цервикальной дислокацией.

За 2–3 нед до начала эксперимента культуру клеток глиомы U87 MG (ATCC HTB 14), которая хранится в криобанке ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН в жидком азоте, размораживали и культивировали в течение 5–7 пассажей на среде DMEM/F12 (1:1) с 10 % фетальной сыворотки (Invitrogen). Перед инъекцией клетки опухоли снимали с подложки раствором трипсин/версен и после 5 мин центрифугирования при 1000 об/мин осадок тщательно ресуспендировали в среде без сыворотки, доводя до концентрации 100 тыс. клеток в 1 мкл или 10^8 клеток в 1 мл. Для получения солидной опухоли глиомы U87 мышам в лопаточную область подкожно вводили по 10 млн клеток в объеме 100 мкл среды DMEM/F12 без сыворотки.

Противоопухолевую активность вируса Зика *in vivo* определяли на базе ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора в условиях BSL-3. Животных содержали в микроизоляторах, расположенных в потоке стерильного воздуха на полках чистой комнаты Duo-Flo Unit, model H-5500, Labproducts Inc. Все экспериментальные процедуры с животными, а также манипуляции по смене подстила и кормов проводили в кабинете биобезопасности 2-го класса Steril GARDIII Advance model SG603. По достижении опухолями объемов 80–90 мкл обрабатывали мышей испытуемым штаммом вируса Зика. Вирус вводили курсом из четырех ежедневных инъекций, интратуморально в дозе $5 \cdot 10^5$ $ТЦД_{50}$ в 50 мкл. Мышам контрольной группы интратуморально вводили физраствор в том же объеме – 50 мкл. Привитые опухоли измеряли штангельциркулем один раз в четыре дня, объем опухолей рассчитывали по формуле: (длина × ширина × высота)/2. Регистрировали динамику роста привитых опухолей и клинические проявления. Через 64 дня с начала цикла интратуморальной обработки мышей подвергали эвтаназии в соответствии с требованиями гуманного отношения к животным, опухоли резецировали с последующим взвешиванием и фотографированием.

Результаты и обсуждение

Исследование потенциальной способности штамма MR766 вируса Зика к избирательной репликации и лизису клеток глиобластомы человека *in vitro* проводили в сравнительных экспериментах с использованием опухолевой клеточной линии U87 MG и нормальной нетрансформированной диплоидной культуры клеток MRC5 человека. Высокочувствительные к вирусу Зика перевиваемые клеточные линии Vero E6 и HEK293A использовали в качестве контрольных клеточных культур. Как видно из результатов, представленных в таблице, штамм MR766 вируса Зика проявил сходную инфекционную активность как в отношении клеток глиобластомы U87 MG, так и в отношении иммортализованных клеточных линий, широко используемых для его культивирования в лабораторной практике. В то же время вирус Зика со значительно меньшей эффективностью инфицировал и лизировал нормальные диплоидные клетки человека MRC5. Индекс селективности (отношение инфекционного титра для опухолевых клеток и перевиваемых трансформированных клеток к титру на нормальных нетрансформированных клетках) U87 MG/MRC5 составил $2 \cdot 10^2$.

Для дополнительного подтверждения избирательности инфекционной активности вируса Зика в отношении клеток глиобластомы U87 MG применяли метод непрямой иммунофлуоресценции. С этой целью монослой клеточных линий U87 MG и MRC5 инфицировали с множественностью 0.1 $ТЦД_{50}$/кл вируса Зика, инкубировали в течение 6 сут, после чего проводили анализ с использованием специфических антивирусных мышиных иммуноглобулинов и антивидового IgG конъюгата Alexa Fluor® 488 (рис. 1). Как видно, на инфицированной клеточной культуре глиобластомы наблюдается выраженная флуоресценция и отмечается ее полное отсутствие на инфицированных клетках MRC5. Эти результаты свидетельствуют о том, что при низкой множественности вирус Зика не способен эффективно инфицировать нормальные диплоидные клетки человека, но в то же время демонстрирует высокую репликативную активность в опухолевых клетках глиобластомы U87 MG.

С целью исследования противоопухолевой активности вируса Зика *in vivo* использовали иммунодефицитных мышей линии SCID с привитыми подкожными ксенографтами глиобластомы человека. В ксенографты U87 MG, по достижении пальпируемых размеров (80–90 мкл), четырехкратно (ежедневно, 1 раз/сут) вводили суспензию вируса Зика в дозе $5 \cdot 10^5$ $ТЦД_{50}$/мышь. Контрольным мышам по той же схеме интратуморально инъецировали физраствор. На рис. 2 представлена динамика изменений средних объемов контрольных опухолей ($n = 5$) и опухолей, обработанных вирусом Зика ($n = 5$). Вирус Зика эффективно ингибировал развитие и рост привитых опухолей U87 MG, и на 24-е сутки с момента первой интратуморальной инъекции различие размеров опухолей в контрольной

In vitro assessment of the oncolytic activity of Zika virus

Cell culture	U87 MG	Vero E6	HEK293A	MRC5
Titer, $TCID_{50}$/mL	$2 \cdot 10^5$ ($8 \cdot 10^4$–$5 \cdot 10^5$)*	$5 \cdot 10^5$ ($2 \cdot 10^5$–$1.2 \cdot 10^6$)	$2 \cdot 10^5$ ($7 \cdot 10^4$–$6.5 \cdot 10^5$)	10^3 ($6 \cdot 10^2$–$2.5 \cdot 10^3$)
Selectivity index	200	500	200	–

* Confidence range of infection titer values averaged over three replicates ($p < 0.05$).

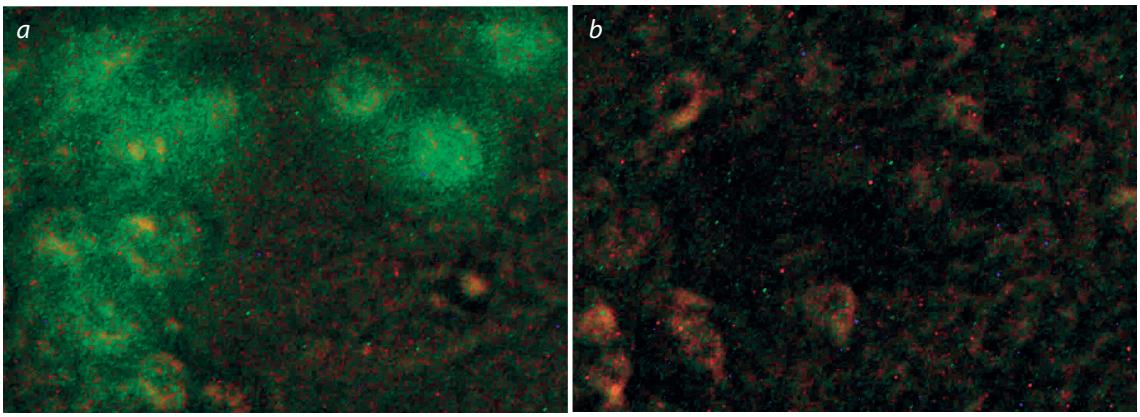


Fig. 1. Immunofluorescence staining of cell cultures infected with Zika (six days after infection with the dose 0.1 $TCID_{50}$/cell): *a*, U87MG; *b*, MRC5.

группе и группе с обработкой вирусом Зика становилось достоверным ($Z = 2.40227$, $p < 0.05$, тест Манна – Уитни). Было зарегистрировано более чем десятикратное снижение их средних объемов по сравнению с контрольными опухолями на момент завершения срока наблюдения через 64 сут от начала эксперимента ($Z = 2.50672$, $p < 0.05$, тест Манна – Уитни). Индекс торможения роста опухоли (ТРО) составил 92.63 %. У одного животного к окончанию срока наблюдения была обнаружена полная регрессия опухоли. Развитие отдаленных метастазов на период проведения эксперимента не зарегистрировано. После проведения эвтаназии подкожные ксенографты были резецированы, взвешены и сфотографированы (см. рис. 2). Средняя масса опухолей контрольных животных составила 6.51 ± 1.55 г, а опытной группы – 0.52 ± 0.30 г ($Z = 2.50672$, $p < 0.05$, тест Манна – Уитни).

Следует отметить, что указанный уровень противоопухолевой эффективности интратуморального введения вируса Зика был достигнут при использовании низкой дозы вируса ($5 \cdot 10^5$ $ТЦД_{50}$ на инъекцию). Вполне вероятно, что при использовании более высоких доз (10^7–10^8 $ТЦД_{50}$) будет достигаться более эффективная репликация вируса в клетках опухоли, что в итоге может привести к лизису клеток глиобластомы и полной регрессии всех привитых ксенографтов глиобластомы. Известно, что вирус Зика способен длительно персистировать в инфицированном организме, в том числе и в клетках нервной системы (Swartwout et al., 2017). Данное свойство вируса Зика может обеспечивать длительный контроль над развитием глиобластомы или появлением рецидивов этой опухоли. Об этом косвенно свидетельствует факт отсутствия

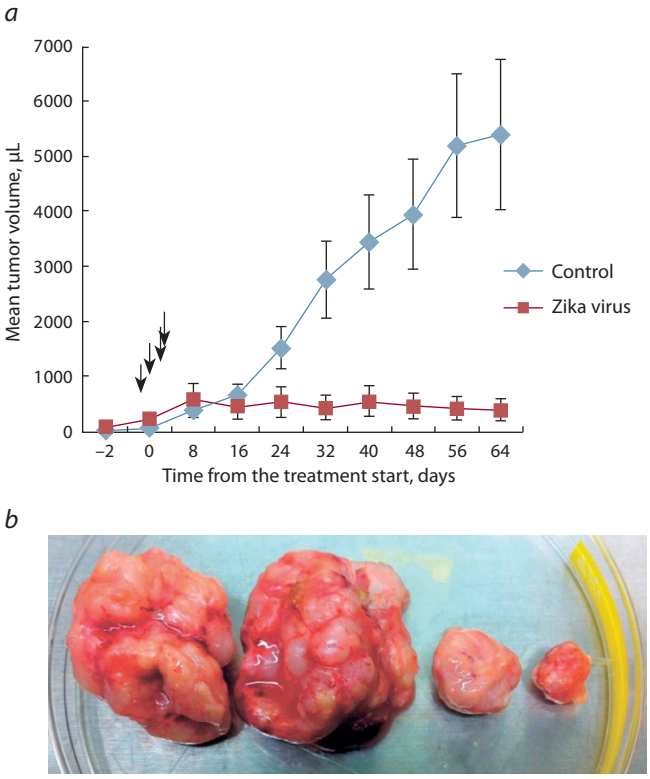


Fig. 2. Oncolytic performance of Zika against murine xenografts of glioblastoma U87 MG after intratumoral administration: *a*, dynamics of mean volume sizes; *b*, resected xenografts 64 days after the start of virotherapy: left two control animals; right, two experimental animals.

дальнейшего развития опухоли на протяжении 64 сут эксперимента после проведения однократного цикла виротерапии вирусом Зика.

В работе (Zhu et al., 2017) указано, что вирус Зика (на примере штаммов Dakar 1984 и Brazil 2015) инфицирует *in vitro* дифференцированные клетки глиобластомы с меньшей эффективностью, чем стволовые опухолевые клетки глиобластомы. Представленные нами данные показывают, что вирус Зика обладает выраженным онколитическим потенциалом против дифференцированной клеточной линии глиобластомы U87 MG человека как *in vitro*, так и *in vivo*. Онколитическая активность вируса Зика в отношении GSC и дифференцированных опухолевых клеток положительно характеризует возможный терапевтический потенциал вирус Зика против глиобластомы человека. Помимо этого, недавно была показана высокая противоопухолевая активность вируса Зика в отношении клеток нейробластомы человека (Mazar et al., 2018). В этой работе приведены данные, свидетельствующие о рецепторном взаимодействии вируса Зика с клеточным поверхностным гликопротеином CD24, и экспериментально доказана зависимость инфекционности вируса Зика для клеток от уровня презентации CD24 на клеточной поверхности.

Таким образом, представленные в настоящей работе результаты предполагают перспективность продолжения исследований вируса Зика как онколитического агента против глиобластом человека. В дальнейшем планируется исследовать противоопухолевую активность вируса Зика с использованием ортотопической модели мышиных ксенографтов глиобластом человека при интратуморальном и парентеральном введении, а также провести углубленное доклиническое исследование безопасности. Для снижения потенциальной нейротоксичности вируса Зика возможно внесение в его геном генетических модификаций. К настоящему времени картированы перспективные в этом отношении точечные мутации в 3′-нетранслируемом регионе и гене белка NS5 (Akiyama et al., 2016). В связи с последним надо отметить, что среди исследователей формируется мнение о достаточной безопасности и потенциальной перспективности использования для терапии глиобластом и нейробластом диких (генетически не модифицированных) штаммов вируса Зика, обусловленное высокой специфичностью вируса к опухолеобразующим и опухолевым клеткам и тем, что инфекция взрослых и детей протекает преимущественно бессимптомно и не вызывает выраженных патологических изменений как со стороны центральной нервной системы, так и со стороны организма в целом (Luplertlop et al., 2017; Mazar et al., 2018). Особенно большое значение это может иметь при поддерживающей терапии после операционного удаления глиобластом для предотвращения развития рецидивов опухоли.

Acknowledgements

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016 and the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Government procurement 141-00069-18-01 of March 17, 2018 for State Research Center of Virology and Biotechnology Vector. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (ICG SB RAS) was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Akiyama B.M., Laurence H.M., Massey A.R., Costantino D.A., Xie X., Yang Y., Shi P.-Y., Nix J.C., Beckham J.D., Kieft J.S. Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. Science. 2016;354:1148-1152. DOI 10.1126/science.aah3963.

Alonso M.M., Jiang H., Gomez-Manzano C., Fueyo J. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses. Methods Mol. Biol. 2012;797:111-125. DOI 10.1007/978-1-61779-340-0_9.

Alvarado A.G., Thiagarajan P.S., Mulkearns-Hubert E.E., Silver D.J., Hale J.S., Alban T.J., Turaga S.M., Jarrar A., Reizes O., Longworth M.S. Glioblastoma cancer stem cells evade innate immune suppression of self-renewal through reduced TLR4 expression. Cell. Stem. Cell. 2017;20:450-461.e4. DOI 10.1016/j.stem.2016.12.001.

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;444:756-760. DOI 10.1038/nature05236.

Cassady K.A., Bauer D.F., Roth J., Chambers M.R., Shoeb T., Coleman J., Prichard M., Gillespie G.Y., Markert J.M. Pre-clinical assessment of C134, a chimeric oncolytic herpes simplex virus, in mice and nonhuman primates. Mol. Ther. Oncolytics. 2017;5:1-10. DOI 10.1016/j.omto.2017.02.001.

Cattaneo R., Russell S.J. How to develop viruses into anticancer weapons. PLoS Pathog. 2017;13:e1006190. DOI 10.1371/journal.ppat.1006190.

Chanas A.C., Johnson B.K., Simpson D.I. Antigenic relationships of alphaviruses by a simple micro-culture cross-neutralization method. J. Gen. Virol. 1976;32:295-300. DOI 10.1099/0022-1317-32-2-295.

Chen J., Li Y., Yu T.S., McKay R.M., Burns D.K., Kernie S.G., Parada L.F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature. 2012;488:522-526. DOI 10.1038/nature11287.

Garcez P.P., Loiola E.C., Madeiro da Costa R., Higa L.M., Trindade P., Delvecchio R., Nascimento J.M., Brindeiro R., Tanuri A., Rehen S.K. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. Science. 2016;352:816-818. DOI 10.1126/science.aaf6116.

Kaufmann J.K., Chiocca E.A. Glioma virus therapies between bench and bedside. Neuro-Oncology. 2014;16:334-351. DOI 10.1093/neuonc/not310.

Lazear H.M., Govero J., Smith A.M., Platt D.J., Fernandez E., Miner J.J., Diamond M.S. A mouse model of Zika virus pathogenesis. Cell. Host. Microbe. 2016;19:720-730. DOI 10.1016/j.chom.2016.03.010.

Li H., Saucedo-Cuevas L., Regla-Nava J.A., Chai G., Sheets N., Tang W., Terskikh A.V., Shresta S., Gleeson J.G. Zika virus infects neural progenitors in the adult mouse brain and alters proliferation. Cell Stem Cell. 2016;19:593-598. DOI 10.1016/j.stem. 2016.08.005.

Luplertlop N., Suwanmanee S., Muangkaew W., Ampawong S., Kitisin T., Poovorawan Y. The impact of Zika virus infection on human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. J. Vector Borne Dis. 2017;54(3):207-214. PMID 29097635.

Mazar J., Li Y., Rosado A., Phelan P., Kedarinath K., Parks D., Alexander K., Westmoreland T. Zika virus as an oncolytic treatment of human neuroblastoma cells requires CD24. PLoS One. 2018;13(7):e0200358. DOI 10.1371/journal.pone.0200358.

Ming G.L., Tang H., Song H. Advances in Zika virus research: Stem cell models, challenges, and opportunities. Cell Stem Cell. 2016; 19:690-702. DOI 10.1016/j.stem.2016.11.014.

Miska J., Rashid A.I., Chang A.L., Muroski M.E., Han Y., Zhang L., Lesniak M.S. Anti-GITR therapy promotes immunity against malignant glioma in a murine model. Cancer Immunol. Immunother. 2016;65:1555-1567. DOI 10.1007/s00262-016-1912-8.

Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. J. Immunol. Methods. 1990;130:149-151. DOI 10.1016/0022-1759(90)90309-J.

Qian X., Nguyen H.N., Song M.M., Hadiono C., Ogden S.C., Hammack C., Yao B., Hamersky G.R., Jacob F., Zhong C. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. Cell. 2016;165:1238-1254. DOI 10.1016/j.cell.2016.04.032.

Simmonds P., Becher P., Buch J., Gould E. ICTV Virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. J. Gen. Virol. 2017;98(1):2-3. DOI 10.1099/jgv.0.000672.

Shan C., Xie X., Muruato A.E., Rossi S.L., Roundy C.M., Azar S.R., Yang Y., Tesh R.B., Bourne N., Barrett A.D. An infectious cDNA clone of Zika virus to study viral virulence, mosquito transmission, and antiviral inhibitors. Cell Host Microbe. 2016;19:891-900. DOI 10.1016/j.chom.2016.05.004.

Shchelkunov S.N., Razumov I.A., Kolosova I.V., Romashchenko A.V., Zavjalov E.L. Virotherapy of the malignant U87 human glioblastoma in the orthotopic xenotransplantation mouse SCID model. Dokl. Biochem. Biophys. 2018;478(1):30-33. DOI 10.1134/S1607672918010088.

Stupp R., Hegi M.E., Mason W.P., van den Bent M.J., Taphoorn M.J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Allgeier A., Fisher B., Belanger K. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EOR TC-NCIC trial. Lancet Oncol. 2009;10:459-466. DOI 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.

Swartwout B.K. Zlotnick M.G., Saver A.E., McKenna C.M., Bertke A.S. Zika virus persistently and productively infects primary adult sensory neurons *in vitro*. Pathogens. 2017;6(4). pii E49. DOI 10.3390/pathogens6040049.

Zhu Z., Gorman M.J., McKenzie L.D., Chai J.N., Hubert C.G., Prager B.C. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. J. Exp. Med. 2017;214(10):2843-2857. DOI 10.1084/jem.20171093.

ORCID ID

V.A. Svyatchenko orcid.org/0000-0002-2729-0592

I.A. Razumov orcid.org/0000-0002-6756-1457

E.V. Protopopova orcid.org/0000-0002-2782-8364

A.V. Demina orcid.org/0000-0002-9345-8787

O.I. Solovieva orcid.org/0000-0002-8218-2690

E.L. Zavjalov orcid.org/0000-0002-9412-3874

V.B. Loktev orcid.org/0000-0002-0229-321X

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1046-1054
DOI 10.18699/VJ18.449

The bristle pattern development in *Drosophila melanogaster*: the prepattern and *achaete-scute* genes

D.P. Furman[1, 2] ✉, T.A. Bukharina[1] ✉

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

The external drosophila mechanoreceptors, residing on the head and body of imago, are represented by bristles of different sizes (macrochaetes and microchaetes). Macrochaetes are arranged in the species-specific bristle pattern, where each of them is strictly positioned. The bristle pattern is formed starting from its prototype (prepattern) in the imaginal disc. The position specificity of future mechanoreceptors is determined by local expression of two proneural genes, *achaete* (*ac*) and *scute* (*sc*) belonging to the *AS-C* complex, in response to the action of certain factors, referred to as prepattern factors, nonuniformly distributed in the ectoderm of imaginal discs. The topography of their total distribution defines the bristle prepattern. Thus, the full-fledged adult bristle pattern is the result of interaction of two systems – the prepattern and the system responding to prepattern, i. e., the *achaete* and *scute* genes. A considerable volume of miscellaneous experimental data related to various aspects in development of the bristle pattern has been so far accumulated; however, any formalized and detailed representation of the molecular genetic interaction of the prepattern factors with both each other and the *achaete-scute* genes is yet absent. This review systematizes the available data on the regular patterns of this interaction and shows that local expression of these genes is determined by hierarchical two-level control system comprising both direct and indirect regulators of their activities. A generalized scheme of the system containing the functional interactions of its components is proposed. The structural organization and principles of operation of the hierarchical molecular genetic system enabling the local expression of *ASC* genes and the resulting formation of ordered bristle pattern are described.

Key words: *Drosophila melanogaster*; macrochaetes; proneural cluster; bristle pattern; prepattern; *achaete-scute* gene complex.

Становление щетиночного узора у *Drosophila melanogaster*: предструктура и комплекс генов *achaete-scute*

Д.П. Фурман[1, 2] ✉, Т.А. Бухарина[1] ✉

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

Внешние механорецепторы дрозофилы, локализованные на голове и теле имаго, представлены щетинками разного размера – макро- и микрохетами. Макрохеты образуют устойчивую структурную композицию, так называемый щетиночный узор, специфичный для каждого вида дрозофилы, в котором каждая из макрохет занимает строго определенное положение. Формирование щетиночного узора начинается с формирования его прообраза в имагинальном диске. Специфичность позиций будущих механорецепторов определяется локальной экспрессией двух пронейральных генов – *achaete* (*ac*) и *scute* (*sc*), входящих в комплекс *AS-C*, в ответ на действие неких факторов, за которыми закрепилось название «факторы предструктуры», гетерогенно распределенных в эктодерме имагинальных дисков. Топография их совокупного распределения и создает прообраз (предструктуру) щетиночного узора. Таким образом, полноценный щетиночный узор является результатом взаимодействия двух систем: предструктуры и системы ответа на предструктуру – генов *achaete* и *scute*. К настоящему времени накоплено значительное число разрозненных экспериментальных данных, касающихся различных аспектов формирования щетиночного узора, однако формализованное представление полного спектра молекулярно-генетических взаимодействий факторов предструктуры как между собой, так и с генами комплекса *AS-C*, в литературе отсутствует. В обзоре систематизированы данные о закономерностях этих взаимодействий. Показано, что экспрессия пронейральных генов *achaete-scute* детерминируется иерархически организованной двухуровневой системой управления, содержащей как прямые, так и непрямые регуляторы их активности. Предложена обобщенная схема системы, включающая функциональные взаимодействия ее компонентов.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; макрохеты; щетиночный узор; пронейральный кластер; предструктура; генный комплекс *achaete-scute*.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Furman D.P., Bukharina T.A. The bristle pattern development in *Drosophila melanogaster*: the prepattern and *achaete-scute* genes. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8): 1046-1054. DOI 10.18699/VJ18.449

Received July 9, 2018
Revised October 12, 2018
Accepted October 15, 2018

✉ e-mail: furman@bionet.nsc.ru; bukharina@bionet.nsc.ru

Development of ordered spatial structures of various degrees of complexity is one of the most important events in the development of multicellular organisms. The patterns of this process and underlying mechanisms are the subject of long-term study and discussion. The bristle pattern of *Drosophila melanogaster* is among the attractive model objects for studying this issue; this bristle pattern is formed of 20 pairs of external sensory organs, macrochaetes (large bristles), located at fixed positions on the fly head and body. The number and arrangement of bristles forming the bristle pattern are so constant and characteristic of individual Drosophila species that allows each bristle to be named according to its position and the bristle pattern to be used as a species-specific criterion in classification.

The adult sensory organ comprises four cells, namely, the shaft, socket, neuron, and glial cell. All these cells originate from a single cell, the sensory organ precursor (SOP) cell. Each SOP cell develops from cells of proneural clusters, that is, groups of 20–30 cells in the ectoderm of imaginal discs. The cells of the cluster differ from all the remaining cells of imaginal disc by the presence of the proneural proteins, Achaete (AC) and Scute (SC). Each sensory organ develops from its own proneural cluster. During development, the proneural clusters are formed and SOP cells are separated at the third instar larval and early prepupal stages. The bristle positions on the body of an adult fly are strictly determined by the positions of SOP cells (reviewed in Modolell, Campuzano, 1998; Gomez-Skarmeta et al., 2003; Furman, Bukharina, 2008, 2017; Bukharina, Furman, 2015; Troost et al., 2015).

At the very first stages of the research into the mechanisms underlying genetic determination of the bristle pattern, Aleksandr Serebrovsky, Nikolay Dubinin, and their colleagues clarified that the *achaete-scute* genes, represented by a set of alleles, played the key role in this process. Characteristic of the flies carrying different alleles is the absence of certain bristles from the standard set. The bristle development at strictly specified positions was supposed to be associated with a local gene activity (Serebrovsky, 1930; Dubinin, 1932). However, the mechanisms leading to local activation of the *achaete-scute* genes remained vague and for a long time were the subject of discussions. The most popular hypothesis among the proposed variants interpreting this phenomenon was the hypothesis proposed by Curt Stern in 1954 (Stern, 1954, 1968). This hypothesis postulates that the local activation of the *achaete-scute* genes is a response to induction with prepattern factors, distributed in the ectoderm of imaginal discs in a discrete manner. As a result of this induction, cells localized to certain regions of the imaginal disc acquire the ability to follow a neural developmental pathway and form proneural clusters (Reeves, Posakony, 2005). Thus, the bristle pattern emerges due to the interaction of two systems – the prepattern and the system responding to the prepattern, i. e., the *achaete-scute* genes.

In the current concept of macrochaete morphogenesis and the mechanisms of bristle pattern development, the Stern hypothesis has been confirmed at a molecular genetic level. In particular, the structure–function organization of the *achaete-scute* gene complex (*AS-C*) has been clarified and the transcription factors influencing its expression have been identified, including U-shaped (USH), Pannier (PNR), and the proteins encoded by the *iroquois* gene complex (*Iro-C*), such as, Araucan (ARA), Caupolican (COUP), and Mirror (MIRR). These are the prepattern factors in terms of the Stern hypothesis.

In turn, expression of the *u-shaped*, *pannier*, and *iroquois* complex genes is determined by their own set of factors – the segmentation proteins Decapentaplegic (DPP), Hedgehog (HH), Engrailed (EN), and Wingless (WG), which act at early stages of imaginal disc compartmentalization. Thus, the *AS-C* transcription activation comprises a hierarchy of developmental events provided for by a concerted action of genes and gene ensembles and ends with development of bristles at strictly determined positions (Dahmann, Basler, 2000; Calleja et al., 2002; Aldaz et al., 2003; Ikmi et al., 2008; Michel, Dahmann, 2016).

This review systematizes the published data on the factors that initiate a local expression of the *ac-sc* genes and their interactions at the stage of proneural cluster formation.

Abbreviations

ac, *achaete*; AC, Achaete
ARA, Araucan
AS-C, *achaete-scute* gene complex
bHLH, basic helix-loop-helix
BRK, Brinker
BX, Beadex
CHM, Chameau
CHN, Charlatan
ci, *cubitus interruptus*
COUP, Caupolican
DA, Daughterless
dCtBP (drosophila C-terminal binding protein)
DLL, Distal-less
DPP, Decapentaplegic
EN, Engrailed
E(spl), Enhancer of Split
EYG, Eyegone
HH, Hedgehog
Iro-C, *iroquois* gene complex
MIRR, Mirror
PNR, Pannier
SAL, Spalt
SAL-R, Spalt-related
sc, *scute*; SC, Scute
SENS, Senseless
SGG, Shaggy
SOP cell, sensory organ precursor cell
SPI, Spitz
SSDP, sequence-specific single-stranded DNA-binding protein
TOE, Twin of eyegone
TOU, Toutatis
TUP, Tailup
USH, U-shaped
VG, Vestigial
VN, Vein
WG, Wingless

Compartmentalization of the wing imaginal disc

The main morphogenetic events that determine development of the bristle pattern on the body of drosophila are associated with the pair of wing imaginal discs, each giving rise to half of an adult fly thorax.

The disc develops from 10–50 cells of an early embryo, which as early as the cellular blastoderm stage are predetermined to form the imago's wing structures and notum (Bate, Martinez-Arias, 1991; Potter, Xu, 2001; Aldaz, Escudero, 2010). At this stage, the cells differ in the amounts of some proteins, which later on determine the main stages in disc compartmentalization. These proteins include EN, DPP, Distal-less (DLL), Vestigial (VG), WG, and HH (Blair, 1995; Brook, 2000; Held, 2002; Hooper, Scott, 2005; Beira, Paro, 2016). Note that DPP, WG, and HH form a concentration gradient, while the EN protein is confined to a narrow band with a width of one cell.

As a mature morphological structure, the imaginal disc is identifiable at the first instar larval stage. Soon after the disc is formed, it divides into compartments with different developmental fates (Aegerter-Wilmsen et al., 2007; Restrepo et al., 2014) (Fig. 1).

Initially, the imaginal disc is divided into the anterior and posterior compartments with further separation of the dorsal and ventral part in each of them (Nienhaus et al., 2012). The compartmentalization is determined by differential expression of several genes. The gene *cubitus interruptus* (*ci*) is expressed in the anterior part of the disc and the gene *engrailed* (*en*), in the posterior part. The dorsal disc region is determined by coexpression of the *vg* and *ap* genes and the ventral region, by expression of the gene *wg*. The regions where the genes determining compartments are expressed do not overlap and the corresponding boundaries are indentified as conditional anterior–posterior and dorsal–ventral axes of the disc (Brook, 2000; Delanoue et al., 2002).

The further events in compartmentalization are controlled by a cascade of genes and the key initiator of the cascade is the morphogene Decapentaplegic (DPP) (Restrepo et al., 2014). Expression of the gene *dpp* and production of the corresponding protein, DPP, are observed in a narrow band of cells. This band, well evident after specific protein staining, lies along the anterior–posterior disc axis (Zecca et al., 1995; Nellen et al., 1996; Foronda et al., 2009; Beira, Paro, 2016). From this band, the morphogen spreads over the entire disc forming a concentration gradient. DPP, being involved in the corresponding signaling pathway, determines the further direction in development of different disc regions depending on the set of proteins they contain (Zecca et al., 1995; Gómez-Skarmeta et al., 2003; Garcia-Bellido, 2009). In particular, the region carrying the protein Brinker (BRK) will give rise to wing structures. The role of Brinker is to counteract Dpp signalling by repressing Dpp pathway target genes (Martín et al., 2004; Affolter, Basler, 2007; Schwank et al., 2008; Restrepo et al., 2014). The presumptive notum is determined by the expression of *Iro-C*, proteins Eyegone (EYG) and Twin of eyegone (TOE) continues further subdivision of the presumptive thorax (Diez del Corral et al., 1999; Aldaz et al., 2003; Barrios, Campuzano, 2015; Barrios et al., 2015).

The major developmental event in macrochaete morphogenesis is specification of the proneural clusters in the presumptive notum region; this event is initiated by the proteins of *Iro-C* and PNR (Ikmi et al., 2008). In this process, the presence of PNR is a necessary but not sufficient condition. It is known that the proneural cluster is formed of the cells carrying PNR but lacking the USH (Gómez-Skarmeta et al., 2003; Villa-Cuesta et al., 2007).

This is the general scheme of wing imaginal disc compartmentalization, which forms the background for development of the bristle pattern.

The *achaete-scute* genes as the key component in the molecular genetic system responsible for macrochaete development

The central players in the morphogenesis of individual macrochaetes and the overall bristle pattern are the genes *achaete* and *scute* (*ac-sc*), components of the similarly named gene complex (*AS-C*). This complex comprises four genes (*achaete*, *scute*, *lethal of scute*, *asense*), encoding basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factors. A local expression of *ac-sc* provides for emergence of the bristles at strictly specified positions (see Fig. 1, *b*), whereas inactivation of these genes results in the absence of some or all macrochaetes of the standard set on the body of an adult fly. Ectopic *achaete-scute* gene expression in the ectoderm of imaginal disc and the resulting switch of this developmental mechanism in the corresponding region to the neural pathway, gives additional or ectopic bristles (Rodríguez et al., 1990; Modolell, 1997).

The *achaete-scute* genes determine development of the complementary sets of the notum bristles (Campuzano, Modolell, 1992; Modolell, 1997; García-Bellido, de Celis, 2009).

In this process, the "area of responsibility" of the *achaete* gene is confined to development of the dorsocentral macrochaetes, while the *scute* gene expression is sufficient for development of the complete bristle set (Rodríguez et al., 1990).

The specificity in time and site of *achaete-scute* gene expression is determined by two types of enhancers. The enhancers of the first type, which are localized beyond *AS-C* at a distance of up to 100 kb, are necessary for *achaete-scute* gene expression in all cells of each proneural cluster (Gómez-Skarmeta et al., 1995). In particular, the dorsocentral enhancer drives *achaete-scute* gene expression in the proneural clusters for dorsocentral bristles. As has been shown, the protein PNR (Ramain et al., 1993; Gómez-Skarmeta et al., 1995; Garcia-Garcia et al., 1999) and some proteins of the EGFR signaling pathway (Culi et al., 2001) bind to this enhancer. The Iroquois complex proteins, namely, ARA, COUP, and MIRR bind to another enhancer of this type, the L3-TSM enhancer (Kehl et al., 1998; Ikmi et al., 2008).

Enhancers of the second type, SOPEs (sensory organ precursor enhancers), are responsible for *achaete-scute* expression in the SOP cell (Ayyar et al., 2010). Each of these genes has its own SOPE (Giagtzoglou et al., 2003; Jafar-Nejad et al., 2003). These enhancers carry sites for a number of transcription factors, namely, E boxes (CANNTG) for binding the proneural proteins AC and SC, α-boxes (ACTACAG) for binding transcription factors of the NF-κB/Rel family, AT-rich β-boxes with still unknown functions, N boxes for binding the proteins Hairy (CACGCG) and E(spl) (CACGAG and CACAAG), and S boxes for binding Senseless (SENS). It is known that Charlatan (CHN) also binds to certain still

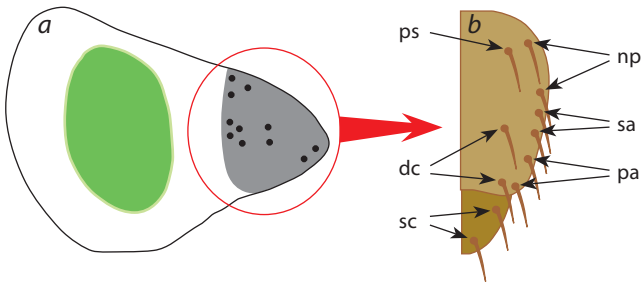


Fig. 1. Schemes of the wing imaginal disc (*a*) and the right half of adult fly notum (*b*).

The regions that give rise to the adult heminotum and wing blade, shown with gray and green, respectively. Black dots in scheme (*a*) denote the future proneural clusters and in scheme (*b*) localizations of macrochaetes (ps, presutural; dc, dorsocentral, np, notopleural; sa, supraalar; pa, postalar; and sc, scutellar).

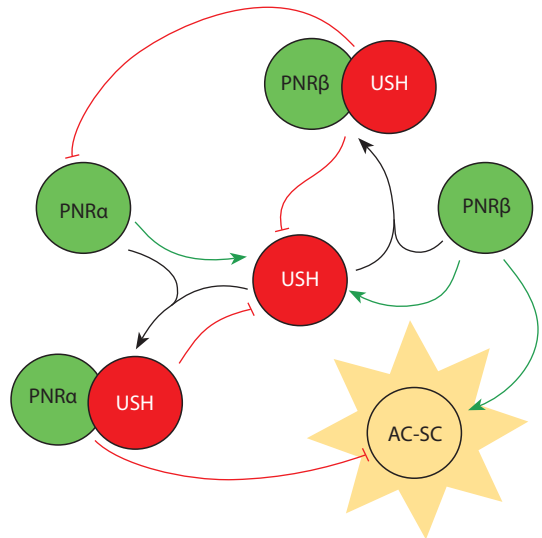


Fig. 2. Scheme of interactions between two PNR protein isoforms, USH and AS-C.

Black arrows indicate formation of PNR/USH heterodimers; green and blunt-end red arrows denote activating and repressive regulatory effects on genes coding PNR, USH and AC-SC proteins, respectively.

unidentified SOPE sites. The sets of specific sequences in the second type enhancers for the *achaete-scute* genes are different. In particular, the SOPE for *achaete* gene lacks α-boxes (Jafar-Nejad et al., 2003; Ayyar et al., 2007, 2010).

Direct regulators of *achaete-scute* expression: traditional prepattern factors

The spatial expression of the *achaete-scute* genes within the imaginal disc depends on combination of the transcription factors that specify development of macrochaetes at specific positions, thereby determining the bristle pattern geometry. These factors are currently regarded as the corresponding factors postulated by the Stern hypothesis (Stern, 1954, 1968; Gómez-Skarmeta et al., 2003). This set traditionally comprises the proteins of *Iro-c* (ARA, COUP, and MIRR) as well as PNR, USH, and Hairy, directly influencing the *achaete-scute* gene expression (Cubadda et al., 1997; Modolell, Campuzano, 1998). In particular, ARA, COUP, and MIRR drive development in the region that will give rise to the lateral notum and PNR, to the central notum (Tomoyasu et al., 1998; Garcia-Garcia et al., 1999; Calleja et al., 2002). Below, we will briefly consider the structure–function characteristics of the above listed regulators involved in *achaete-scute* expression.

The transcription factors Araucan, Caupolican, and Mirror contain homeodomains and directly bind to the first type enhancers, thereby activating *achaete-scute* expression (Kehl et al., 1998). These three proteins are encoded by the similarly named *Iro-C* genes. Phenotypically, mutations in these genes cause the absence of macrochaetes in the lateral notum. The bristles in the flies carrying such mutations form a characteristic comb, resembling the Iroquois hair dressing, after which they were named.

The *Iro-C* occupies about 130 kb in the genome (Cavodeassi et al., 2001). Expression of the genes *ara*, *coup*, and *mirr* commences at the end of the second instar and considerably increases in the third instar. The regions of *ara* and *coup* expression are completely identical but differ from the region of *mirr* gene expression. The presence of MIRR protein is characteristic of the imaginal disc regions where the proneural clusters will later appear as well as the SOP cells for notopleural and supraalar bristles, while the proteins ARA and COUP are detectable at the sites of the future proneural clusters for the anterior notopleural and posterior postalar bristles (Kehl et al., 1998; Ikmi et al., 2008).

The transcription factors Pannier and U-shaped both belong to the GATA-binding proteins (Ramain et al., 1993; Garcia-Garcia et al., 1999). As has been demonstrated, the protein PNR exists as two isoforms, PNRα and PNRβ. Expression of the corresponding mRNAs is controlled by two alternative promoters. The cells expressing PNR may contain either one or both isoforms, the ratio of which depends on USH, since the heterodimer PNRβ/USH has a negative effect on PNRα expression (Fromental-Ramain et al., 2008). The ratio of these isoforms also to a considerable degree determines the transcription activity of *achaete-scute* genes. It has been shown that PNRβ activates transcription, whereas PNRα/USH inhibits it (Fromental-Ramain et al., 2008, 2010). Figure 2 schematizes these interactions.

The regions of *pannier* and *u-shaped* gene expression in the imaginal disc partially overlap, that creates different conditions for the *achaete-scute* functional state and, consequently, for the macrochaete development within these regions, depending on the contents of the corresponding proteins (Modolell, Campuzano, 1998; Sato, Saigo, 2000).

Recent data provides more details for the role played by PNR in the regulation of *achaete-scute* gene expression. These data demonstrate that a certain protein complex containing several proteins along with PNR (in particular, SSDP (sequence-specific single-stranded DNA-binding protein) and Chip (Ramain et al., 2000; Bronstein et al., 2010) acts as the activator in question (find more details below).

The transcription factor Hairy contains a bHLH domain to bind to the N box CACGCG in the regulatory regions of its target genes, thereby prohibiting its transcription (Rushlow et al., 1989; Ohsako et al., 1994; Gómez-Skarmeta et al., 1995). Mutations in the gene *hairy* induce development of additional bristles (Ingham et al., 1985; Skeath, Carroll, 1991). As has

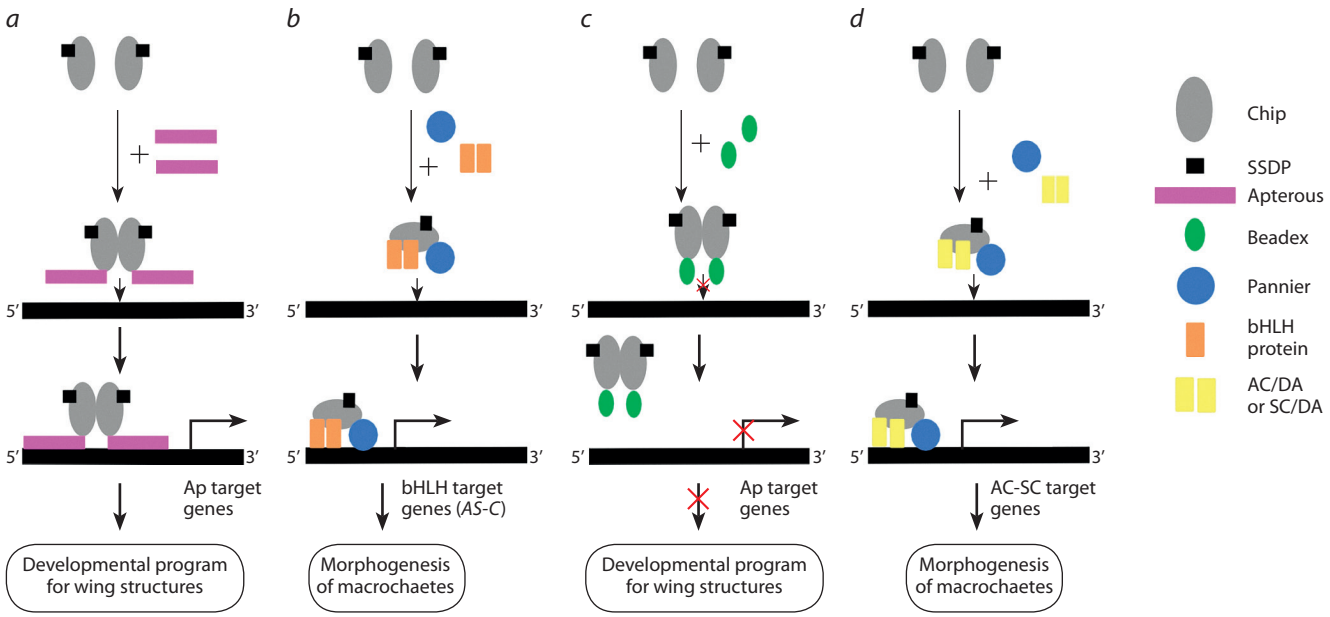


Fig. 3. Roles of the complexes containing SSDP, Chip, bHLH proteins, PNR, AP, and BX in determination of the cell fate (based on Bronstein et al., 2010). For details, see body text.

been experimentally shown, Hairy directly represses transcription of the *achaete-scute* genes; however, a binding site for this factor has been so far detected only in the regulatory region of the *achaete* gene (Wainwright, Ish-Horowicz, 1992; Ohsako et al., 1994; Gómez-Skarmeta et al., 1995, 2003; Costa et al., 2014).

Prepattern factors: new players

Recently, new data have been obtained on the proteins and protein complexes that bind to regulatory regions in the *achaete-scute* genes and influence their activity along with the traditional prepattern factors. These new factors include NFκB/Rel family proteins; dCtBP (drosophila C-terminal binding protein) cofactor; the complexes formed by Chip and SSDP; homeodomain-containing proteins Apterous (AP) and Tailup (TUP; synonym, Islet); and the zinc finger domain-containing protein Beadex (BX; synonym, dLMO, Drosophila LIM-only).

The proteins and protein complexes involved in a direct regulation of the *achaete-scute* gene expression

The NF-κB/Rel family proteins are considered to play an important role in the *achaete-scute* expression pattern. Three drosophila proteins belonging to this family have been identified, namely, Dorsal (DL), Dorsal related immunity factor (DIF), and Relish (Rel). They influence the *achaete-scute* expression both directly binding to the α-boxes in the *achaete-scute* regulatory regions responsible for transcription initiation and via posttranscriptional interactions with achaete-scute mRNA altering its stability and translation efficiency. There are the data demonstrating that a low content of the NF-κB/Rel family proteins in combination with a high level of Achaete-Scute (AC-SC) proteins triggers a neural fate of the cell, whereas a high level of NF-κB/Rel proteins at a low level of AC-SC proteins, on the contrary, excludes this developmental direction (Ayyar et al., 2007, 2010).

The corepressor dCtBP forms a complex with the heterodimer USH/PNR; this complex represses the *achaete-scute* gene transcription. The flies carrying a mutant *dCtBP* gene develop additional bristles, which correlates with the presence of additional SOP cells in proneural clusters (Stern et al., 2009).

The complexes obligatory containing Chip and SSDP play a special part in development of the stereotype bristle pattern; these complexes function in different imaginal disc compartments and at different stages of macrochaete development. These complexes are represented by three types: the first type comprises the complexes that contain bHLH proteins (including AC-SC and DA) and PNR along with Chip and SSDP; the second type complexes involve AP or TUP; and the third type contains BX (Ramain et al., 2000; Chen et al., 2002; Matthews, Visvader, 2003; de Navascués, Modolell, 2007; Zenvirt et al., 2008; Bronstein et al., 2010). Each component in these complexes fulfills its own function. According to the latest data, Chip acts as an adapter and forms the background for assembly of the complexes by recruiting proteins of various families; bHLH proteins, AP, and TUP provide for site specificity of these complexes in binding to DNA; PNR is responsible for reinforcing the interaction between enhancer and promoter; and SSDP acts as a transcription activator. The schemes for assembly of such complexes involving the listed proteins and their roles in determination of cell developmental fate are shown in Fig. 3.

The 2Chip/2AP/2SSDP heterohexamer initiates expression of the AP target genes with subsequent activation of the programs that provide for development of the wing structures (see Fig. 3, *a*). The Chip/SSDP/PNR/2bHLH pentamers are necessary for establishment of the presumptive notum in the imaginal disc (see Fig. 3, *b*). It is known that the regions of *apterous* and *pannier* gene expression in the disc partially

overlap, so that the cells localized to the overlapping region contain both types of complexes, 2Chip/2AP/2SSDP and Chip/SSDP/PNR/2bHLH, thereby being potentially able to form both wing and notum structures. The alternative developmental program is selected with involvement of the protein BX, playing the part of a kind of switch (Matthews, Visvader, 2003; Bronstein et al., 2010). In the cells containing Beadex, AP is displaced from 2Chip/2AP/2SSDP to give a new complex, 2Chip/2BX/2SSDP. Since BX is incapable of binding DNA, such a complex is unable to provide transcription of the AP target genes, thereby preventing formation of the wing structures (see Fig. 3, *c*). A finer structuring of the presumptive notum involves the complexes Chip/SSDP/PNR/2bHLH. By activating the *achaete-scute* genes, they determine the positions of proneural clusters in the central notum (see Fig. 3, *b*). In the cells of these proneural clusters, AC-SC proteins form the multimers Chip/SSDP/PNR/AC/DA or Chip/SSDP/PNR/SC/DA, which initiate transcription of the AC-SC target genes and create the conditions for these cells to follow a neural developmental pathway (see Fig. 3, *d*) (Bronstein et al., 2010).

The heterohexamer 2Chip/2TUP/2SSDP influences the *achaete-scute* transcriptional activity. In the cells of the future proneural clusters for dorsocentral macrochaetes, this complex binds to the *achaete-scute* DC enhancer and activates *achaete-scute* transcription (van Meyel et al., 1999; Biryukova, Heitzler, 2005; de Navascués et al., 2007). Thus, the effects of the complexes 2Chip/2TUP/2SSDP and Chip/SSDP/PNR/2bHLH in these regions of the imaginal disc are analogous. Since the TUP expression is observed in a narrower region as compared with PNR, it is assumed that TUP more finely specifies the positions of proneural clusters. As has been shown, the presence of the TUP protein at the sites for future proneural clusters for the remaining macrochaetes blocks emergence of additional SOP cells within the cluster. Two mechanisms underlying this effect are considered, namely, inhibition of *achaete-scute* expression via the TUP interaction with transcription activators or repression of the AC-SC target genes (de Navascués, Modolell, 2010).

The proteins indirectly influencing the *achaete-scute* gene activity

Along with the above listed transcription factors that have binding sites in the regulatory regions of *achaete-scute* genes, a set of proteins also influences the *achaete-scute* expression in an indirect manner. This set includes the proteins Toutatis (TOU) and Osa, transcription factors Bar (BarH1 and BarH2) and WG, histone acetyltransferase Chameau (CHM), kinase Shaggy (SGG), as well as the proteins of EGFR signaling pathway.

The proteins Toutatis and Osa modulate *achaete-scute* gene transcription by interacting with the complexes containing Chip and PNR. It is known that Toutatis increases transcription, whereas Osa decreases it. These proteins are believed to be involved in chromatin remodeling, entailing the changes in the efficiency of enhancer–promoter interaction (Heitzler et al., 2003; Vanolst et al., 2005).

The homeodomain-containing proteins BarH1 and BarH2 are necessary for development of the presutural macrochaetes (see Fig. 1). These proteins are encoded by similarly named adjacent genes of the small complex *Bar* (Higashijima et al., 1992). Their expression is controlled by the DPP and WG. Experiments have demonstrated that the Bar proteins are involved in *achaete-scute* activation (Sato et al., 1999); however, their direct interaction with the regulatory regions of *achaete-scute* genes has not been demonstrates so far.

WG is a negative regulator for the *achaete-scute* genes. The role of factor consists in expression activation of the gene *shaggy*. The produced Shaggy kinase phosphorylates PNR, which, being phosphorylated, is unable to bind to the enhancers of the first type and loses its function of a direct activator for *achaete-scute* gene transcription (Yang et al., 2012).

The acetyltransferase Chameau is another experimentally confirmed indirect negative regulator for the *achaete-scute* genes. As has been shown, *chm* genetically interacts with *ush*, *chip*, and *pnr*. Presumably, CHM may be involved in the activation of downstream targets of AC and SC in the formed proneural clusters (Hainaut et al., 2012).

The zinc finger transcription factors Spalt (SAL) and Spalt-related (SAL-R) are required in the presumptive notum when the future proneural clusters for the majority of macrochaetes are determined (including the dorsocentral, scutellar, and notopleural macrochaetes). The genes *sal* and *sal-r* are united together and have a complex regulatory region, one part of which controls *sal*/*sal-r* expression in the corresponding regions of the imaginal disc. Transcriptional activity of these genes is controlled by the proteins DPP and WG. The proteins SAL and SAL-R repress the *Iro-C* transcription, which entails prohibition of *achaete-scute* gene activation (de Celis et al., 1999; de Celis, Barrio, 2000; Sweetman, Münsterberg, 2006).

Proteins of the EGFR (MAP kinase) signaling pathway are involved in the establishment of presumptive bristle pattern; this pathway is initiated by two of the known ligands for this receptor, Vein (VN) and Spitz (SPI). In both cases, the result is transcription of the *achaete-scute* genes. The MAP kinase cascade triggered by the EGFR interaction with VN acts as an indirect regulator of the *achaete-scute* gene expression: first the *Iro-C* genes are transcribed, and then the proteins ARA, CAUP, and MIRR of this complex activate the *achaete-scute* genes (Wang et al., 2000; Zecca, Struhl, 2002; Letizia et al., 2007). The initiation of *achaete-scute* transcription when the signal is transmitted via the SPI ligand does not require any intermediate step, and EGFR acts as a direct regulator of the *achaete-scute* expression (Culi et al., 2001).

Conclusions

Development of the bristle pattern is a hierarchically organized process, where establishment of the prepattern, which determines positioning of adults bristles on the body of imago, is the most important and basic stage. According to the current concepts, prepattern is actually the combination of transcription factors characteristic of certain imaginal disc regions triggering and regulating expression of the *achaete-scute* genes. A developmentally final establishment of the prepattern takes place at the third instar larval stage. In turn, the main prerequisite for this is the difference in the cells forming the imaginal disc in the distributions of certain protein factors, which is determined by concentration gradients of the proteins encoded by segmentation genes and the morphogen DPP.

The general scheme illustrating the work of the system that determines the bristle pattern development is shown in Fig. 4.

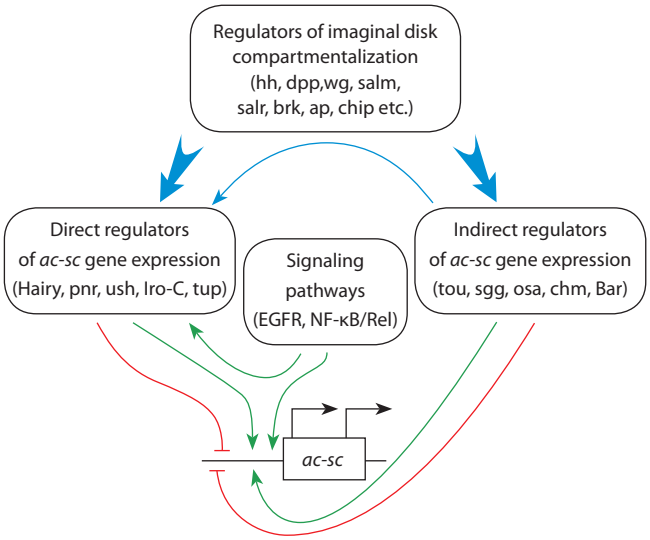


Fig. 4. The general scheme illustrating the work of the molecular genetic system that determines development of bristle pattern.

Designations: blue arrows indicate interactions between different regulator groups; green and blunt-end red arrows denote activating and repressive regulatory effects on the *ac-sc* expression, respectively.

A full-fledged adult bristle pattern is developed only in the case of coordinated functioning of the prepattern and the system responding to prepattern, the *achaete-scute* genes. The main factors of the prepattern directly regulating the *achaete-scute* expression are the proteins USH, PNR, ARA, COUP, MIRR, and Hairy as well as proteins belonging to the NF-κB/Rel family and EGFR signaling pathway.

Part of these proteins (HH, DPP, WG) act at early stages of imaginal disc compartmentalization, determined the expression of *brinker*, *apterous*, *chip*, *dCtBP*, *pannier*, *u-shaped*, *spalt* and *spalt-related* genes which proteins "specifies" compartmentalization of the imaginal disc. The other part (proteins of EGFR signaling pathway, ARA, COUP, MIRR, etc.) interacts with the corresponding enhancers to initiate expression of the *achaete-scute* genes, thereby determining the positions of proneural clusters.

Acknowledgements

The work was supported by ICG SB RAS budget project (No. 0324-2018-0017).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Aegerter-Wilmsen T., Aegerter C.M., Hafen E., Basler K. Model for the regulation of size in the wing imaginal disc of *Drosophila*. Mech. Dev. 2007;124(4):318-326. DOI 10.1016/j.mod.2006.12.005.

Affolter M., Basler K. The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. Nat. Rev. Genet. 2007;8(9): 663-674. DOI 10.1038/nrg2166.

Aldaz S., Escudero L.M. Imaginal discs. Curr. Biol. 2010;20(10):R429-R431. DOI 10.1016/j.cub.2010.03.010.

Aldaz S., Morata G., Azpiazu N. The Pax-homeobox gene *eyegone* is involved in the subdivision of the thorax of *Drosophila*. Development. 2003;130:4473-4482. DOI 10.1242/dev.00643.

Ayyar S., Negre B., Simpson P., Stollewerk A. An arthropod cis-regulatory element functioning in sensory organ precursor development dates back to the Cambrian. BMC Biol. 2010;24:127. DOI 10.1186/1741-7007-8-127.

Ayyar S., Pistillo D., Calleja M., Brookfield A., Gittins K., Goldstone C., Simpson P. NF-kB/Rel-mediated regulation of the neural fate in *Drosophila*. PLoS One. 2007;2:e1178. DOI 10.1371/journal.pone.0001178.

Barrios N., Campuzano S. Expanding the *Iroquois* genes repertoire: a non-transcriptional function in cell cycle progression. Fly (Austin). 2015;9(3):126-131. DOI 10.1080/19336934.2016.1139654.

Barrios N., González-Pérez E., Hernández R., Campuzano S. The homeodomain Iroquois proteins control cell cycle progression and regulate the size of developmental fields. PLoS Genet. 2015;11(8): e1005463. DOI 10.1371/journal.pgen.1005463.

Bate M., Martinez-Arias A. The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. Development. 1991;112(3):755-761.

Beira J.V., Paro R. The legacy of *Drosophila* imaginal discs. Chromosoma. 2016;125:573-592. DOI 10.1007/s00412-016-0595-4.

Biryukova I., Heitzler P. The *Drosophila* LIM-homeo domain protein Islet antagonizes pro-neural cell specification in the peripheral nervous system. Dev. Biol. 2005;288:559-570. DOI 10.1016/j.ydbio.2005.09.033.

Blair S.S. Compartments and appendage development in *Drosophila*. BioEssays. 1995;17(4):299-309. DOI 10.1002/bies.950170406.

Bronstein R., Levkovitz L., Yosef N., Yanku M., Ruppin E., Sharan R., Westphal H., Oliver B., Segal D. Transcriptional regulation by CHIP/LDB complexes. PLoS Genetics. 2010;6:e1001063. DOI 10.1371/journal.pgen.1001063.

Brook W.J. Hedgehog signaling and the axial patterning of *Drosophila* wings. Biochem. Cell Biol. 2000;78(5):585-591. DOI 10.1139/o00-072.

Bukharina T.A., Furman D.P. The mechanisms determining bristle pattern in *Drosophila melanogaster*. Rus. J. Dev. Biol. 2015;46:99-110. DOI 10.1134/S1062360415030029.

Calleja M., Renaud O., Usui K., Pistillo D., Morata G., Simpson P. How to pattern an epithelium: lessons from *achaete-scute* regulation on the notum of *Drosophila*. Gene. 2002;292:1-12. DOI 10.1016/S0378-1119(02)00628-5.

Campuzano S., Modolell J. Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. Trends Genet. 1992;8:202-206. DOI 10.1016/0168-9525(92)90234-U.

Cavodeassi F., Modolell J., Gomez-Skarmeta J.L. The *Iroquois* family of genes: from body building to neural patterning. Development. 2001;128:2847-2855.

Chen L., Segal D., Hukriede N.A., Podtelejnikov A.V., Bayarsaihan D., Kennison J.A., Ogryzko V.V., Dawid I.B., Westphal H. Ssdp proteins interact with the LIM-domain-binding protein Ldb1 to regulate development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002;99(22):14320-14325. DOI 10.1073/pnas.212532399.

Costa M., Calleja M., Alonso C.R., Simpson P. The bristle patterning genes *hairy* and *extramacrochaetae* regulate the development of structures required for flight in Diptera. Dev. Biol. 2014;388(2):205-215. DOI 10.1016/j.ydbio.2013.12.032.

Cubadda Y., Heitzler P., Ray R.P., Bourouis M., Ramain P., Gelbart W., Simpson P., Haenlin M. *u-shaped* encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes *achaete* and *scute* during the formation of bristles in *Drosophila*. Genes Dev. 1997;11:3085-3095. DOI 10.1101/gad.11.22.3083.

Culi J., Martin-Blanco E., Modolell J. The EGF receptor and N signalling pathways act antagonistically in *Drosophila* mesothorax bristle patterning. Development. 2001;128:299-308.

Dahmann C., Basler K. Opposing transcriptional outputs of Hedgehog signaling and engrailed control compartmental cell sorting at the *Drosophila* A/P boundary. Cell. 2000;100(4):411-422.

de Celis J.F., Barrio R. Function of the *spalt*/*spalt-related* gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. Mech. Dev. 2000; 91:31-41. DOI 10.1016/S0925-4773(99)00261-0.

de Celis J.F., Barrio R., Kafatos F.C. Regulation of the *spalt*/*spalt-related* gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. Development. 1999;126:2653-2662.

de Navascués J., Modolell J. *tailup*, a LIM-HD gene, and Iro-C cooperate in *Drosophila* dorsal mesothorax specification. Development. 2007;134:1779-1788. DOI 10.1242/dev.02844.

de Navascués J., Modolell J. The pronotum LIM-HD gene *tailup* is both a positive and a negative regulator of the proneural genes *achaete* and *scute* of *Drosophila*. Mech. Dev. 2010;127:393-406. DOI 10.1016/j.mod.2010.05.001.

Delanoue R., Zider A., Cossard R., Dutriaux A., Silber J. Interaction between apterous and early expression of *vestigial* in formation of the dorso-ventral compartments in the *Drosophila* wing disc. Genes Cells. 2002;7:1255-1266. DOI 10.1046/j.1365-2443.2002.00600.x.

Diez del Corral R., Aroca P., Gomez-Skarmeta J.L., Cavodeassi F., Modolell J. The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. Genes Dev. 1999;13:1754-1761.

Dubinin N.P. Step-allelomorphism and the theory of centres of the gene *achaete-scute.* J. Genet. 1932;26:37-58.

Foronda D., Pérez-Garijo A., Martín F.A. Dpp of posterior origin patterns the proximal region of the wing. Mech. Dev. 2009;126(3-4): 99-106. DOI 10.1016/j.mod.2008.12.002.

Fromental-Ramain C., Taquet N., Ramain P. Transcriptional interactions between the pannier isoforms and the cofactor U-shaped during neural development in *Drosophila*. Mech. Dev. 2010;127:442-457. DOI 10.1016/j.mod.2010.08.002.

Fromental-Ramain C., Vanolst L., Delaporte C., Ramain P. *pannier* encodes two structurally related isoforms that are differentially expressed during *Drosophila* development and display distinct functions during thorax patterning. Mech. Dev. 2008;125(1-2):43-57. DOI 10.1016/j.mod.2007.10.008.

Furman D.P., Bukharina T.A. How *Drosophila melanogaster* forms its mechanoreceptors. Curr. Genomics. 2008;9(5):312-323. DOI 10.2174/138920208785133271.

Furman D.P., Bukharina T.A. Analysis of the Neurogenesis:Prepattern Gene Network Controlling First Stage of Bristle Pattern Development in *Drosophila melanogaster*. Russ. J. Genet. Appl. Res. 2017; 7(5):550-557. DOI 10.1134/S2079059717050069.

Garcia-Bellido A. The cellular and genetic bases of organ size and shape in *Drosophila*. Int. J. Dev. Biol. 2009;53:1291-1303. DOI 10.1387/ijdb.072459ag.

García-Bellido A., de Celis J.F. The complex tale of the *achaete-scute* complex: a paradigmatic case in the analysis of gene organization and function during development. Genetics. 2009;182:631-639. DOI 10.1534/genetics.109.104083.

Garcia-Garcia M.J., Ramain P., Simpson P., Modolell J. Different contributions of *pannier* and *wingless* to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila.* Development. 1999;126:3523-3532.

Giagtzoglou N., Alifragis P., Koumbanakis K.A., Delidakis C. Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. Development. 2003;130:259-270. DOI 10.1242/dev.00206.

Gómez-Skarmeta J.L., Campuzano S., Modolell J. Half a century of neural prepatterning: the story of a few bristles and many genes. Nat. Rev. Neurosci. 2003;4:587-598. DOI 10.1038/nrn1142.

Gómez-Skarmeta J.L., Rodriguez I., Martinez C., Culi J., Ferres-Marco D., Beamonte D., Modolell J. Cis-regulation of *achaete* and *scute*: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. Genes Dev. 1995;9:2598-2608. DOI 10.1101/gad.9.15.1869.

Hainaut M., Sagnier T., Berenger H., Pradel J., Graba Y., Miotto B. The MYST-containing protein Chameau is required for proper sensory organ specification during *Drosophila* thorax morphogenesis. PLoS One. 2012;7:e32882. DOI 10.1371/journal.pone.0032882.

Heitzler P., Vanolst L., Biryukova I., Ramain P. Enhancer-promoter communication mediated by Chip during Pannier-driven proneural patterning is regulated by Osa. Genes Dev. 2003;17:591-596. DOI 10.1101/gad.255703.

Held L.I., Jr. Imaginal Discs: The Genetic and Cellular Logic of Pattern Formation. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2002.

Higashijima S., Kojima T., Michiue T., Ishimaru S., Emori Y., Saigo K. Dual *Bar* homeo box genes of *Drosophila* required in two photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development. Genes Dev. 1992;6:50-60.

Hooper J.E., Scott M.P. Communicating with Hedgehogs. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2005;6(4):306-317. DOI 10.1038/nrm1622.

Ikmi A., Netter S., Coen D. Prepatterning the *Drosophila* notum: the three genes of the *iroquois* complex play intrinsically distinct roles. Dev. Biol. 2008;317:634-648. DOI 10.1016/j.ydbio.2007.12.034.

Ingham P.W., Pinchin S.M., Howard K.R., Ish-Horowicz D. Genetic analysis of the hairy locus in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 1985;111(3):463-486.

Jafar-Nejad H., Acar M., Nolo R., Lacin H., Pan H., Parkhurst S.M., Bellen H.J. Senseless acts as a binary switch during sensory organ precursor selection. Genes Dev. 2003;17:2966-2978. DOI 10.1101/gad.1122403.

Kehl B.T., Cho K.O., Choi K.W. *mirror*, a *Drosophila* homeobox gene in the *Iroquois* complex, is required for sensory organ and alula formation. Development. 1998;125:1217-1227.

Letizia A., Barrio R., Campuzano S. Antagonistic and cooperative actions of the EGFR and Dpp pathways on the *iroquois* genes regulate *Drosophila* mesothorax specification and patterning. Development. 2007;134:1337-1346. DOI 10.1242/dev.02823.

Martín F.A., Pérez-Garijo A., Moreno E., Morata G. The brinker gradient controls wing growth in *Drosophila*. Development. 2004;131: 4921-4930. DOI 10.1242/dev.01385.

Matthews J.M., Visvader J.E. LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. EMBO Rep. 2003;4:1132-1137. DOI 10.1038/sj.embor.7400030.

Michel M., Dahmann C. Regulating mechanical tension at compartment boundaries in *Drosophila*. Fly. 2016;10(4):204-209. DOI 10.1080/19336934.2016.1207028.

Modolell J. Patterning of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. Perspect. Dev. Neurobiol. 1997;4(4):285-296.

Modolell J., Campuzano S. The *achaete-scute* complex as an integrating device. Int. J. Dev. Biol. 1998;42:275-282.

Nellen D., Burke R., Struhl G., Basler K. Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. Cell. 1996;85:357-368.

Nienhaus U., Aegerter-Wilmsen T., Aegerter C.M. In-vivo imaging of the Drosophila wing imaginal disc over time: novel insights on growth and boundary formation. PLoS One. 2012;7(10):e47594. DOI 10.1371/journal.pone.0047594.

Ohsako S., Hyer J.. Panganiban G., Oliver I., Caudy M. *hairy* function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. Genes Dev. 1994;8:2743-2755.

Potter C.J., Xu T. Mechanisms of size control. Curr. Opin. Genet. Dev. 2001;11(3):279-286.

Ramain P., Heitzler P., Haenlin M., Simpson P. *pannier*, a negative regulator of *achaete* and *scute* in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1. Development. 1993;119:1277-1291.

Ramain P., Khechumian R., Khechumian K., Arbogast N., Ackermann C., Heitzler P. Interactions between Chip and the achaete/scute-daughterless heterodimers are required for Pannier-driven proneural patterning. Mol. Cell. 2000;6:781-790. DOI 10.1016/S1097-2765(05)00079-1.

Reeves N., Posakony J.W. Genetic programs activated by proneural proteins in the developing *Drosophila* PNS. Dev. Cell. 2005;8:413-425. DOI 10.1016/j.devcel.2005.01.020.

Restrepo S., Zartman J.J., Konrad B. Coordination of patterning and growth by the morphogen DPP. Curr. Biol. 2014;24(6):R245-R255. DOI 10.1016/j.cub.2014.01.055.

Rodríguez I., Hernández R., Modolell J., Ruiz-Gómez M. Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordial. EMBO J. 1990;9:3583-3592.

Rushlow C.A., Hogan A., Pinchin S.M., Howe K.M., Lardelli M., Ish-Horowicz D. The *Drosophila* hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to N-myc. EMBO J. 1989;8:3095-3103.

Sato M., Kojima T., Michiue T., Saigo K. *Bar* homeobox genes are latitudinal prepattern genes in the developing *Drosophila* notum whose expression is regulated by the concerted functions of *decapentaplegic* and *wingless*. Development. 1999;126:1457-1466.

Sato M., Saigo K. Involvement of *pannier* and *u-shaped* in regulation of decapentaplegic-dependent *wingless* expression in developing *Drosophila* notum. Mech. Dev. 2000;93:127-138. DOI 10.1016/S0925-4773(00)00282-3.

Schwank G., Restrepo S., Basler K. Growth regulation by Dpp: an essential role for Brinker and a non-essential role for graded signaling levels. Development. 2008;135:4003-4013. DOI 10.1242/dev.025635.

Serebrovsky A.S. Untersuchungen iiber Treppenallelomorphism. IV. Transgenation scute-6 und ein Fall des "Nicht-Allelomorphiss" von Gliedem einer Allelomorphenreihe bei *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux' Arch. 1930;122:88-104.

Skeath J.B., Carroll S.B. Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. Genes Dev. 1991;5:984-995.

Stern C. Two or three bristles. Am. Sci. 1954;42:213-247.

Stern C. Genetic Mosaics and Other Essays. Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts. 1968.

Stern M.D., Aihara H., Roccaro G.A., Cheung L., Zhang H., Negeri D., Nibu Y. CtBP is required for proper development of peripheral nervous system in *Drosophila*. Mech. Dev. 2009;126:68-79. DOI 10.1016/j.mod.2008.10.003.

Sweetman D., Münsterberg A. The vertebrate *spalt* genes in development and disease. Dev. Biol. 2006;293:285-293. DOI 10.1016/j.ydbio.2006.02.009.

Tomoyasu Y., Nakamura M., Ueno N. Role of Dpp signalling in prepattern formation of the dorsocentral mechanosensory organ in *Drosophila melanogaster*. Development. 1998;125:4215-4224.

Troost T., Schneider M., Klein T. A re-examination of the selection of the sensory organ precursor of the bristle sensilla of *Drosophila melanogaster*. PLoS Genet. 2015;11(1):e1004911. DOI 10.1371/journal.pgen.1004911.

van Meyel D.J., O'Keefe D.D., Jurata L.W., Thor S., Gill G.N., Thomas J.B. Chip and Apterous physically interact to form a functional complex during *Drosophila* development. Mol. Cell. 1999;4:259-265. DOI 10.1016/S1097-2765(00)80373-1.

Vanolst L., Fromental-Ramain C., Ramain P. Toutatis, a TIP5-related protein, positively regulates Pannier function during *Drosophila* neural development. Development. 2005;132:4327-4338. DOI 10.1242/dev.02014.

Villa-Cuesta E., González-Pérez E., Modolell J. Apposition of *iroquois* expressing and non-expressing cells leads to cell sorting and fold formation in the *Drosophila* imaginal wing disc. BMC Dev. Biol. 2007;7:106. DOI 10.1186/1471-213X-7-106.

Wainwright S.M., Ish-Horowicz D. Point mutations in the *Drosophila* hairy gene demonstrate *in vivo* requirements for basic, helix-loop-helix, and WRPW domains. Mol. Cell Biol. 1992;12(6):2475-2483.

Wang S.H., Simcox A., Campbell G. Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. Genes Dev. 2000;14:2271-2276. DOI 10.1101/gad.827000.

Yang M., Hatton-Ellis E., Simpson P. The kinase Sgg modulates temporal development of macrochaetes in *Drosophila* by phosphorylation of Scute and Pannier. Development. 2012;139:325-334. DOI 10.1242/dev.074260.

Zecca M., Basler K., Struhl G. Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. Development. 1995;121:2265-2278.

Zecca M., Struhl G. Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. Development. 2002;129:1357-1368.

Zenvirt S., Nevo-Caspi Y., Rencus-Lazar S., Segal D. Drosophila LIM-only is a positive regulator of transcription during thoracic bristle development. Genetics. 2008;179(4):1989-1999. DOI 10.1534/genetics.108.090076.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1055-1062
DOI 10.18699/VJ18.450

Выявление и анализ динамических паттернов суточной экспрессии генов млекопитающих

О.А. Подколодная[1], Н.Н. Твердохлеб[1, 3], Н.Л. Подколодный[1, 2]

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

Целью исследования было выявление и анализ паттернов суточной динамики экспрессии генов, различающихся по форме кривой. Можно ожидать, что сходство паттернов суточной экспрессии генов (формы кривой) является отражением синхронизации экспрессии генов общими внешними и внутренними сигналами или участия в сходных биологических процессах. Разные сигналы, имеющие суточную динамику (свет, активность, питание, стресс, температура и т. д.), могут воздействовать на разные уровни регуляции экспрессии, что может проявляться в различной форме паттернов суточной экспрессии генов. Работа выполнена с использованием экспериментальных данных по экспрессии генов на уровне трансляции (профилирование рибосом) в печени и почках мыши (GSE67305 и GSE81283). Для выявления генов с суточным ритмом экспрессии был использован однофакторный дисперсионный анализ. Предложен подход к выявлению сходных по форме кривых суточной динамики экспрессии генов на основе кластерного анализа. Расстояние между генами рассчитывалось путем выравнивания фаз и поиска максимальной по циклическому сдвигу кросс-корреляции между паттернами суточной экспрессии этих генов. Данный подход позволил выявить гены, имеющие не только паттерны экспрессии с одним максимумом (синусоидальные, асимметричные со смещением влево или вправо, импульсные), но и сложные композитные сигналы с несколькими экстремумами. В результате впервые выявлены группы генов, объединенных по сходству формы кривой суточной экспрессии, без учета их фазовых характеристик. Функциональный анализ обогащения терминами генной онтологии групп генов с резко различающимися паттернами суточной экспрессии (синусоидальными и импульсными) в почках и печени мыши показал, что группа генов с синусоидальным паттерном суточной экспрессии в большей мере ассоциирована с регуляцией циркадного ритма и метаболизма. Группа генов с импульсным паттерном суточной экспрессии в значительной степени связана с защитными функциями организма, требующими формирования быстрого ответа. Показана информативность анализа динамических паттернов кривых суточной динамики экспрессии генов для функционального описания генов. Выделенные динамические паттерны суточной экспрессии имеют большое значение для дальнейшего изучения сложной циркадной регуляции, синхронизации и взаимодействия биологических процессов с суточной динамикой в организме млекопитающих.

Ключевые слова: циркадный ритм; трансляция; генные онтологии; тканеспецифичность; биологические процессы; динамические паттерны суточной экспрессии.

Detection and analysis of dynamic patterns of diurnal expression of mammalian genes

O.A. Podkolodnaya[1], N.N. Tverdokhleb[1, 3], N.L. Podkolodnyy[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics, SB RAS, Novosibirsk
[3] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The purpose of the study is to identify and analyze patterns of the diurnal dynamics of the expression of genes that differ in the shape of the curve. It can be expected that the similarity of the patterns of daily expression (shape of the curve) of genes is a reflection of the synchronization of gene expression by common external and internal signals or participation in similar biological processes. Different signals that have daily dynamics (light, activity, nutrition, stress, temperature, etc.) can affect different levels of expression regulation, which can be manifested in various forms of patterns of daily gene expression. In our research, we used experimental data on gene expression at the level of translation (ribosome profiling) in the liver and kidney of a mouse (GSE67305 and GSE81283). To identify genes with a daily rhythm of expression, we used a one-way analysis of variance. To identify similar-in-shape curves of the daily dynamics of gene expression, we propose an approach based on cluster analysis. The distance between the genes was calculated by aligning the phases and finding the maximum cross-correlation between the patterns of the daily expression of these genes by the cyclic shift. This approach allowed us to identify genes that have not only expression patterns with a single maximum (sinusoidal, asymmetrical, shifted to the left or right, pulsed), but also complex composite signals with several extremes. As a result, the groups of genes united by the similarity of the shape of the daily expression curve without regard to their phase characteristics were identified. GO enrichment analysis of groups of genes with sharply different patterns of daily expression (sinusoidal and pulsed) in the mouse kidneys and liver showed that the group of genes with a sinusoidal pattern was more associated with regulation of circadian rhythm and metabolism. The group of genes with a pulsed pattern is largely associated with the protective functions of the organism, which require the quick response. Thus, our studies have confirmed the effectiveness of the proposed approach to the analysis of the diurnal dynamics of gene expression. The identified dynamic patterns of diurnal expression are important for the

Received October 18, 2018
Revised November 16, 2018
Accepted November 16, 2018

e-mail: pnl@bionet.nsc.ru

further study of complex circadian regulation, synchronization and interaction of biological processes with diurnal dynamics in mammals.

Key words: circadian rhythm; translation; GO enrichment analysis; tissue specificity; biological processes; dynamic patterns of diurnal gene expression.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Подколодная О.А., Твердохлеб Н.Н., Подколодный Н.Л. Выявление и анализ динамических паттернов суточной экспрессии генов млекопитающих. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1055-1062. DOI 10.18699/VJ18.450

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Podkolodnaya O.A., Tverdokhleb N.N., Podkolodnyy N.L. Detection and analysis of dynamic patterns of diurnal expression of mammalian genes. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1055-1062. DOI 10.18699/VJ18.450 (in Russian)

Ритмичные изменения с периодом, близким к 24 часам, наблюдаются практически на всех уровнях функционирования организмов млекопитающих – от молекулярно-генетических до сложных физиологических процессов, согласованное протекание которых обусловлено различными синхронизирующими сигналами и механизмами. К настоящему времени выявлены проявления органо-/тканеспецифичности суточной ритмики экспрессии генов и показано, что более сорока процентов белок-кодирующих генов млекопитающих проявляют суточные осцилляции как минимум в одном органе на уровне мРНК (Zhang et al., 2014; Laing et al., 2015).

Циркадная регуляция функционирования генетических и метаболических сетей, путей передачи сигналов и т. д. осуществляется не только на уровне транскрипции, но и на уровне трансляции, посттранскрипционной и посттрансляционной модификации, транспорта и деградации мРНК и белков (Mendoza-Viveros et al., 2017). Нарушение циркадных ритмов может быть как причиной, так и следствием различных расстройств, включая метаболический синдром, воспалительные заболевания, ментальные расстройства, рак и др. (Sulli et al., 2018).

На сегодняшний день описаны механизм и различные факторы, определяющие суточные изменения в экспрессии генов (Flôres et al., 2016; Atger et al., 2017; Sulli et al., 2018). Основой функционирования этого механизма, безусловно, служат молекулярно-генетические циркадные осцилляторы, присутствующие практически в каждой клетке организма. У млекопитающих главный водитель циркадного ритма, сформированный нейронами супрахиазматических ядер гипоталамуса, синхронизует ритм всей сети периферических циркадных осцилляторов (Ripperger, Brown, 2010). Однако физическая активность, прием пищи, температура и другие внешние и внутренние физиологические сигналы, имеющие суточную динамику, также могут формировать циклические изменения в уровнях экспрессии генов в клетках периферических органов. Циклическая повторяемость этих сигналов приводит к формированию и закреплению механизмов поддержки такого рода суточных изменений, отличных от циркадных часов.

Выявление среди генов с суточной динамикой различных групп генов, участвующих в регуляции биологических процессов, протекающих с суточной периодичностью, расширяет возможности исследования регуляции физиологических процессов и последствий их нарушения. При анализе данных по динамике суточной экспрессии генов, как правило, внимание сосредоточено на анализе сходства и различия их фазовых характеристик (время суток с максимальным уровнем экспрессии) (Janich et al., 2015; Подколодный и др., 2017; Castelo-Szekely et al., 2017). Однако паттерны суточной экспрессии генов могут отличаться не только фазовыми характеристиками, но и формой кривой, описывающей циклическую динамику экспрессии.

Целью данной работы было выявление паттернов суточной динамики экспрессии генов, различающихся по форме кривой независимо от их фазы, и анализ групп генов, имеющих сходные динамические паттерны экспрессии.

Можно ожидать, что сходство паттернов суточной экспрессии (формы кривой) генов является отражением синхронизации экспрессии генов общими внешними и внутренними сигналами или участия в сходных биологических процессах. Это особенно актуально для исследования суточных ритмов, в формировании которых играют важную роль различные внешние и внутренние сигналы, имеющие суточную динамику, в частности свет, активность, питание, стресс, температура и т. д.

В работе предложен метод выявления сходных по форме кривых суточной динамики экспрессии генов. На этой основе выявлены группы генов, различающиеся динамическими паттернами суточной экспрессии. Результаты анализа обогащения терминами генной онтологии (Gene Ontology, здесь и далее – GO) выделенных групп генов с резко различающимися паттернами суточной экспрессии в почках и печени мыши подтвердили эффективность предложенного подхода к выявлению динамических паттернов кривых суточной динамики экспрессии генов, которые могут иметь большое значение для дальнейшего изучения сложной циркадной регуляции, синхронизации и взаимодействия биологических процессов с суточной динамикой в организме млекопитающих.

Материалы и методы

Использованы данные, полученные методом профилирования плотности рибосом на мРНК в печени и почках мыши, представленные в работах (Janich et al., 2015; Castelo-Szekely et al., 2017), которые доступны в базе данных GEO (печень: GSE67305 и почки: GSE81283). Этот подход позволяет получить информацию о транслируемых мРНК (транслятом) и их трансляционной активности в определенный момент времени *in vivo* (Ingolia, 2014). В настоящее время транслятом рассматривается как более точная, чем транскриптом, оценка уровня экспрессии и, как следствие, функциональности генов. Это связано

с тем, что корреляция данных протеома и транслятома достаточно высока, и ее значение существенно выше корреляции протеома и транскриптома (Smircich et al., 2015).

В эксперименте мыши содержались в условиях свето-темнового режима (12 ч свет/12 ч темнота) и свободного доступа к пище. Материал собирали каждые 2 ч в течение 24-часового суточного цикла (12 временных точек (ZT0–ZT22), где ZT0 – включение света; ZT12 – выключение света). Каждой временной точке соответствовали две независимые реплики эксперимента (два животных, у каждого забирали печень и почки), для которых были получены значения плотности профилирования рибосом на мРНК анализируемых генов, использованные в нашем исследовании. Таким образом, массив данных включал 10980 генов, экспрессирующихся в печени со значениями плотности рибосом на мРНК, и 12622 гена – в почках.

При первичном анализе используемых экспериментальных данных мы выявили точки в кривых суточной динамики экспрессии некоторых генов, в которых разброс значений в двух репликах существенно выше, чем в других точках кривой. Эти точки можно рассматривать как выбросы. Пример такой кривой суточной экспрессии гена *Slc19a2* (*Thiamine transporter 1*) в печени мыши с экстремальным значением разброса плотности рибосом на мРНК в точке ZT12 приведен на рис. 1.

Необходимо отметить, что причиной существенных вариаций в дисперсии, имеющих, скорее всего, случайный характер, могут быть не только ошибки измерений, но и биологическая вариабельность, свойственная природе данных.

Для выявления генов с суточным ритмом экспрессии использовался однофакторный дисперсионный анализ на данных, в которых удалены временные точки с экстремальными выбросами экспрессии. Если суммарная по всем временным точкам средняя внутригрупповая дисперсия измерений уровня экспрессии была ниже, чем общая дисперсия сигнала с уровнем значимости $p < 0.001$, то считалось, что гены обладают ритмичной экспрессией. Такой жесткий критерий был взят для отбора генов с ярко выраженной воспроизводимостью паттерна суточной экспрессии, чтобы уменьшить влияние случайных вариаций в измерениях на результаты анализа ритмичных генов.

Предварительно для анализа были отобраны гены, экспрессия которых воспроизводится в репликах. Используемый нами подход позволил выделить гены, имеющие не только простые паттерны экспрессии с одним максимумом, но и сложные, ежесуточно воспроизводимые паттерны экспрессии со многими экстремумами.

Для выявления экстремальных выбросов в экспрессии генов мы используем следующую процедуру. Для каждого гена проводится дисперсионный анализ с целью проверки гипотезы о равенстве всех средних значений экспрессии этого гена μ_i в каждой группе i, соответствующей измерениям в конкретной временной точке.

Нулевая гипотеза H_0: $\mu_1 = \mu_2 = \ldots = \mu_{12}$. Альтернативная гипотеза: H_a: $\mu_i \neq \mu_j$ для некоторых i и j. Для проверки нулевой гипотезы используется статистика:

$$F = \frac{\sum_j n_j (\bar{X}_{.j} - \bar{X}_{..})^2 / (k-1)}{\sum_i \sum_j (\bar{X}_{ij} - \bar{X}_{.j})^2 / (N-k)}, \quad (1)$$

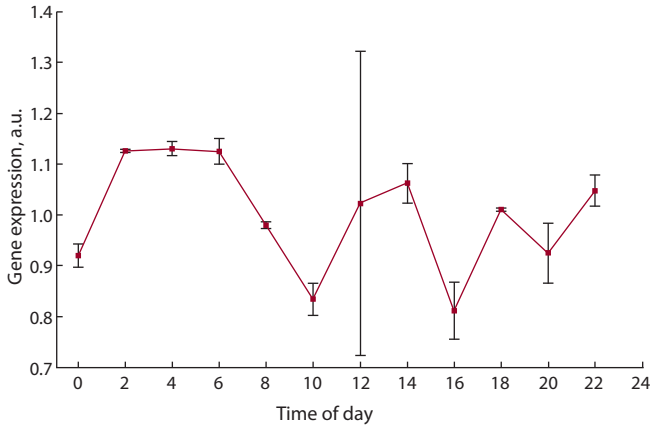


Fig. 1. An exemplary circadian pattern of the expression of the *Slc19a2* (*Thiamine transporter 1)* gene in the liver of a mouse with extreme dispersion of ribosome density on mRNA at ZT12.

которая имеет F распределение с степенями свободы $k-1$ и $N-k$. Здесь N – общее число измерений во всех группах; k – число групп; n_j – число наблюдений в j-группе; X_{ij} – i реплика ($i = [1, n_j]$) наблюдений экспрессии гена в j-группе ($j = 1, \ldots, k$); $\bar{X}_{.j} = \sum_i \bar{X}_{ij}/n_j$ – внутригрупповое среднее для j-группы; $\bar{X}_{..} = \sum_j \bar{X}_{.j}/k$ – общее среднее по всем группам. В нашем случае $N = 24$, $k = 12$, $n_j = 2$.

Пусть в результате получен уровень значимости α_0. Далее удаляем из анализа наблюдения последовательно одну из временных точек и проводим дисперсионный анализ для $k - 1$ групп. Таким образом, получаем 12 значений уровня значимости критерия F, рассчитанных по 11 временным точкам (α_i, $i = [1, 12]$). Если для некоторой временной точки i выполняется условие $\alpha_i < \alpha_0/k$, то временная точка i считается выбросом и удаляется из анализа. Для гена *Slc19a2* (*Thiamine transporter 1*), паттерн суточной экспрессии в печени мыши которого представлен на рис. 1, $\alpha_0 = 0.054$, т. е. нулевая гипотеза H_0 сохраняется и считается, что паттерн суточной экспрессии гена не воспроизводится. При удалении точки ZT12 с экстремальным значением разброса плотности рибосом на мРНК уровень достоверности, рассчитанный по оставшимся 11 точкам, равен: $\alpha_{12} = 8.45 \times 10^{-07}$, или с учетом поправки на множественное тестирование уровень значимости равен $1-(1-\alpha_{12})^{12} \approx 12\alpha_{12} = 0.00001$, т. е. показывает с высокой степенью значимости воспроизводимость в репликах паттерна суточной экспрессии этого гена. Таким образом, выявлено, что 5 % генов содержат «выброс» в данных по экспрессии в печени и 3 % – в почках. В результате из всего массива данных удалено примерно 0.42 % измерений в печени и 0.25 % в почках.

Для выявления устойчивых типов паттернов суточной экспрессии среди генов мы применяли метод иерархического кластерного анализа с алгоритмом вычисления расстояний между кластерами по методу дальнего соседа или полной связи, реализованный в пакете MATLAB (программа linkage с опцией ‘complete’) (Statistics and Machine Learning Toolbox, 2018). Термин «паттерн суточной экспрессии» в данной работе относится к форме сигна-

ла, без учета его суточной фазы. Поэтому при проведении кластерного анализа расстояние между i и j генами рассчитывалось на основе выравнивания фаз и поиска максимальной по циклическому сдвигу кросс-корреляции между паттернами суточной экспрессии этих генов:

$$\mathrm{dist}_{ij} = 1 - R_{ij}, \quad (2)$$

где $R_{ij} = \max_\tau \sum_t x_i(t) \cdot x_j(t-\tau)$; $x_i(t)$ – зависимость от времени t экспрессии i-го гена; $x_j(t-\tau)$ – циклический сдвиг фазы на время τ вектора суточной экспрессии j-го гена.

Для выделения групп генов с синусоидальными и импульсными паттернами суточной экспрессии применялся критерий на основе оценки значимости максимальной по циклическому сдвигу кросс-корреляции паттерна суточной экспрессии гена с соответствующими эталонными сигналами:

$$R_i = \max_\tau \mathrm{Corr}(x_i(t), \mathrm{signal}(t-\tau)). \quad (3)$$

В качестве эталонного синусоидального сигнала использовался $\mathrm{signal}(t) = \cos(2\pi\, t/24)$, а в качестве импульсного сигнала – $\mathrm{signal}(t) = [1, 0.3, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0.3]$, где $t = [0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22]$.

Паттерн суточной экспрессии гена считался подобным эталонному сигналу, если уровень значимости максимальной по циклическому сдвигу кросс-корреляции *p-value* < 0.001.

Анализ обогащения терминами GO групп генов проведен с использованием биоинформационного ресурса DAVID (Huang et al., 2009), который чаще всего применяется для такого рода анализа. Достоверность оценивали с помощью критерия Бенджамини–Хохберга с поправкой на множественность выбора (*p-value* < 0.05).

Результаты и обсуждение

Выявление динамических паттернов суточной экспрессии генов

На первом этапе работы были выявлены гены, демонстрирующие ритмичные изменения экспрессии с периодом 24 ч, оцениваемые по величине показателя профилирования рибосом, в печени и почках. Количество ритмичных генов составило 4906 из 10980 генов, экспрессирующихся в печени, и 4455 из 12622 в почках.

При более детальном рассмотрении кривых, описывающих суточную экспрессию этих генов, мы обнаружили большое разнообразие форм кривых. Кластерный анализ позволил выявить различные паттерны ритмичной экспрессии, имеющие характерную форму: синусоидальные сигналы, асимметричные сигналы со смещением влево или вправо, импульсные сигналы и сигналы с комбинацией этих паттернов (сложные сигналы).

На рис. 2 представлены примеры кластеров с разными типами паттернов суточной экспрессии в печени мыши, выявленных методами кластерного анализа: синусоидальный (*а*), импульсный (*б*), асимметричный с левой и правой асимметрией (*в*, *г*), сложносоставной (композитный) (*д*, *е*) типы паттернов.

Следует отметить, что гены, имеющие сложносоставной, или композитный, паттерн суточной экспрессии, очень различаются между собой, и поэтому полученные кластеры включают, как правило, либо отдельные гены (см. рис. 2), либо малое их число.

Гены со схожими паттернами суточной экспрессии могут иметь различающиеся параметры суточного рит-

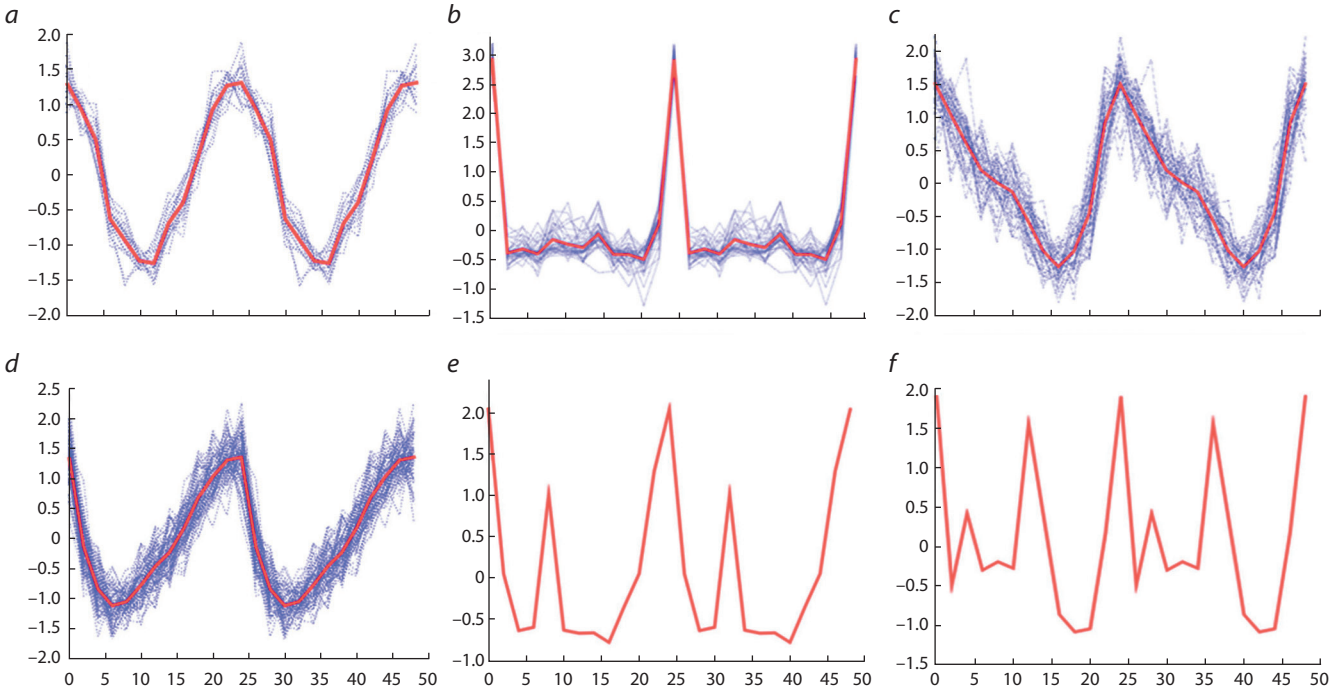


Fig. 2. Examples of gene clusters with different circadian expression patterns in the mouse liver detected by cluster analysis.

a, Sinusoidal circadian expression pattern; *b*, pulse circadian expression pattern; *c*, *d*, circadian expression patterns showing the left and right asymmetry, respectively; *e*, *f*, genes with complex circadian expression patterns.

ма. В этом состоит основное отличие нашего подхода от общепринятых подходов к поиску и анализу групп генов с циркадной динамикой, в частности выявления групп коэкспрессирующихся генов, групп генов, имеющих повышенный уровень экспрессии в определенный момент времени, групп генов со сходными фазами сигналов и т. д. (Janich et al., 2015; Подколодный и др., 2017; Castelo-Szekely et al., 2017). И это обусловливает также различие в биологической интерпретации групп генов со схожими паттернами суточной экспрессии.

Динамический паттерн суточной экспрессии (формы кривой) генов формируется под воздействием синхронизации экспрессии генов общими внешними и внутренними сигналами, имеющими суточную динамику (свет, активность, питание, стресс, температура и т. д.). Разные сигналы могут проявляться в различной форме паттернов суточной экспрессии генов. Поэтому можно ожидать, что гены, имеющие сходные паттерны суточной экспрессии (форму сигнала), будут иметь сходную функцию.

В настоящей работе мы рассмотрим группы генов с двумя полярными типами экспрессионных паттернов, а именно синусоидальными и импульсными.

Из общего числа генов с ритмичной экспрессией синусоидальный паттерн экспрессии в печени выявлен у 766, в почках – у 508. Генов с импульсным паттерном экспрессии в печени найдено 188, в почках – 64.

Необходимо отметить, что синусоидальный паттерн суточной экспрессии имеет максимально сглаженную форму среди всех типов ритмичных паттернов, тогда как импульсный сигнал имеет максимальную скорость изменения экспрессии и наиболее резкий фронт. Эти особенности важны при интерпретации групп генов с такими формами экспрессии.

Прежде всего возникает вопрос, насколько выявленные группы генов уникальны для каждого органа. В группе ритмичных генов с синусоидальным паттерном экспрессии общими для двух органов оказались 123 гена. В группе с импульсным паттерном экспрессии общих для двух органов ритмичных генов было только 9 (см. таблицу). Здесь и далее будут использованы следующие названия групп генов: L(only)COS (Liver only cosine) – гены с синусоидальным паттерном экспрессии только в печени; K(only) COS (Kidney only cosine) – гены с синусоидальным паттерном экспрессии только в почках; intersectCos (intersect cosine) – гены с синусоидальным паттерном экспрессии в почках и печени; L(only)IMP (liver only impulse) – гены с импульсным паттерном экспрессии только в печени; K(only)IMP (Kidney only impulse) – гены с импульсным паттерном экспрессии только в почках; intersectImp (intersect impulse) – гены с импульсным паттерном экспрессии в почках и печени.

Функциональный анализ обогащения терминами генной онтологии групп генов с различными паттернами суточной экспрессии

Чтобы получить представление о функциональных характеристиках выявленных нами групп генов, мы сосредоточили внимание на оценке обогащенности этих групп терминами GO категорий Cellular Component и Biological Process, а также перепредставлености генов

Numbers of genes with different patterns (sinusoidal and pulse) rhythmical in the liver, kidneys, or both

Pattern	Liver and kidneys	Liver only	Kidneys only
Sinusoidal	123 intersectCos	643 L(only)COS	385 K(only)COS
Pulse	9 intersectImp	177 L(only)IMP	55 K(only)IMP

KEGG Pathway в анализируемых группах, позволяющей ассоциировать их с определенными путями (см. Приложение)[1].

Группа генов с синусоидальным паттерном экспрессии в обоих органах получила название intersectCos. Эта группа характеризовалась обогащением терминами категории Cellular Component, которые свидетельствуют о преимущественно внутриклеточной локализации их белковых продуктов, как в мембранных, так и немембранных органеллах, в том числе в ядре и структурах цитоскелета.

Согласно результатам анализа обогащения терминами GO категории Biological Process, в группе генов intersectCos перепредставлены термины, связанные с регуляцией циркадного ритма, циркадной регуляцией транскрипции, ответом на стероидные гормоны, в частности глюкокортикоиды, метаболизмом липидов и окислительно-восстановительными процессами. Отметим также, что путь Circadian rhythm базы данных KEGG оказался единственным, чьи гены достоверно перепредставлены в группе intersectCos. Паттерн суточной экспрессии генов этой группы наиболее близок к классическому синусоидальному с периодом 24 ч. Можно предполагать, что как в печени, так и в почках суточная ритмичность экспрессии генов группы intersectCos, вероятнее всего, определяется прямым или косвенным регулирующим влиянием эндогенного осциллятора, например циркадного. Это тем более вероятно, что основные гены циркадного осциллятора, а именно *Arntl*, *Cry1*, *Nr1d1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Nr1d2*, *Npas2*, *Rorc*, входят в данную группу. А большинство биологических процессов, характерных для группы генов intersectCos, известны как находящиеся под контролем циркадных часов (Yan, 2015). В то же время нельзя исключить влияния других типов эндогенных осцилляторов, таких как регулируемые доступностью пищи (food entrained oscillator) (Flôres et al., 2016). Кроме того, условия проведения эксперимента не исключают, что ритмичность экспрессии некоторых генов данной группы в определенной степени может определяться и внешними ритмичными сигналами, такими как световой режим, режим питания.

В группу генов с синусоидальным паттерном экспрессии в печени (L(only)COS) входили 643 гена. Эта группа характеризовалась обогащением терминами GO катего-

[1] Приложение см. по адресу: http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx17.pdf

рии Cellular Component, которые свидетельствуют о локализации их белковых продуктов в мембранных органеллах, в частности эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях, аппарате Гольджи, а также во внеклеточных экзосомах.

Анализ обогащения терминами GO категории Biological Process показал, что в группе генов L(only)COS перепредставлены термины, связанные с метаболическими процессами широкого спектра биологических субстанций, включая липиды, жирные кислоты, аминокислоты, NAD, карбогидраты, и их регуляцией, а также апоптозом и ответом на инсулин.

Гены двух путей базы данных KEGG – Metabolic pathways и Carbon metabolism – перепредставлены в группе L(only)COS.

Группа ритмичных генов с синусоидальным паттерном экспрессии только в почках, получившее название K(only) COS, включала 385 генов и характеризовалась обогащением такими терминами категории Cellular Component, как внеклеточные экзосомы, эндоплазматический ретикулум, фокальные контакты.

Анализ обогащения GO терминами категории Biological Process показал, что в группе генов K(only)COS перепредставлены термины, резко отличающиеся от характерных для вышеописанных групп. Большая часть из них связана со сборкой и организацией клеточных компонентов, например актинового цитоскелета, адгезией, движением клеток или субклеточных компонентов. Кроме того, можно отметить термины, связанные с ответом на гипоксию.

Статистически значимого обогащения группы K(only) COS генами путей базы данных KEGG не наблюдается. Отметим, что общим для групп генов L(only)COS и K(only)COS, в отличие от группы intersectCos, является отсутствие терминов, ассоциированных с регуляцией циркадного ритма. В то же время нам удалось выявить тканеспецифичные особенности этих двух групп ритмичных генов. Прежде всего, различия касаются категории Cellular Component. Здесь при наличии общих терминов (*extracellular exosome* и *endoplasmic reticulum*) для группы генов печени характерны термины *mitochondrion*, *Golgi apparatus*, а для генов почек – *focal adhesion* и *cell junction*. Прослеживаются различия и для терминов категории Biological Process. Для генов печени характерны термины, связанные с процессами метаболизма, ответом на инсулин, апоптозом, тогда как для генов почек – термины, связанные с адгезией, движением клеток или субклеточных компонентов, ответом на гипоксию и стероидные гормоны.

Такие различия соответствуют функциональным особенностям двух органов. Печень играет особую роль в гомеостазе энергии, поэтому суточная ритмичность метаболических процессов именно в этом органе наиболее выражена и определяется не только циркадными часами, но и ритмами питания (Kornmann et al., 2007; Ribas-Latre, Eckel-Mahan, 2016). Нарушения пищевого поведения (голодание/переедание) являются мощными сигналами, опосредуемыми метаболическими или гормональными изменениями, способными перенастраивать периферические циркадные часы, в частности, в печени. Мутации генов циркадного осциллятора приводят к метаболическим нарушениям и развитию метаболических заболеваний, сопровождающихся нарушением чувствительности к инсулину (Zhou et al., 2014). Значительная часть энергии в организме продуцируется в печени митохондриями через окислительное фосфорилирование за счет метаболизма липидов и карбогидратов с наработкой ATP. С этой же органеллой связан собственный путь апоптоза клетки. Отметим, что циркадные часы и режим питания могут участвовать не только в транскрипционной, но и в трансляционной регуляции экспрессии генов в печени (Atger et al., 2017).

Процессы, которые оказались ритмичными в группе генов K(only)COS, важны для функционирования почек. Так, термины, связанные со сборкой и организацией клеточных компонентов, адгезией, движением клеток или субклеточных компонентов, могут быть отражением адаптации клеточных структур нефрона, например подоцитов, прежде всего к ритмичным изменениям показателей гидростатического давления в капиллярах клубочков, которое подвержено интенсивным суточным колебаниям (Firsov, Bonny, 2018). Эти показатели определяются огромным множеством системных и локальных факторов. Любой из них может находиться под контролем как центральной, так и локальной системы циркадных часов, определяющих их ритмичность (Firsov, Bonny, 2018). Одним из сигналов, способных перенастраивать циркадные часы почек, является уровень кислорода как в крови, так и в почечной ткани, который ритмично изменяется в течение суток, достигая максимума в первой половине активной фазы (Adamovich et al., 2017). Связь между циркадными часами и уровнем кислорода в почке опосредуется транскрипционным фактором HIF1, активность которого индуцируется гипоксией. Следует отметить, что плотность рибосом на мРНК гена *Hif1α* ритмично изменяется в почках в течение суток и воспроизводится в репликах.

Мутация этого гена отменяет регулирующее действие уровня кислорода на циркадные часы почек (Adamovich et al., 2017). Реципрокная регуляция циркадных часов и ответа на гипоксию происходят за счет транскрипционной регуляции, а также путем белок-белковых взаимодействий (Wu et al., 2017). Таким образом, ответ на гипоксию в почках – ритмичный процесс, регулируемый как на системном, так и на локальном уровне.

Использованный нами подход позволил выявить специфическое обогащение групп генов L(only)COS и K(only) COS терминами GO категории Biological Process, что позволяет предполагать наличие тесной взаимосвязи между соответствующими процессами и генами с ритмическим типом экспрессии. Можно полагать, что активность этих процессов тоже ритмична.

Группа генов с импульсным паттерном экспрессии, общим для двух органов, получила название intersectImp и включала всего 9 генов. Возможно, малое число генов данной группы не позволило получить статистически значимых результатов анализа с использованием системы DAVID. Единственное, что можно отметить, это перепредставленность термина *Chaperone* функциональной категории UP_KEYWORDS ($p = 0.0015$), где 4 из 9 генов оказались шаперонами. Безусловно, мы не можем делать

каких-либо заключений на основе этих данных, однако напомним о роли шаперонов в поддержании циркадной ритмики через механизм деградации циркадных белков по убиквитин-протеасомному пути (Ripperger, Brown, 2010). Следует отметить, что суточная ритмичность экспрессии шаперонов может зависеть не только от циркадных часов, но и от циклов питания и изменения температуры тела (Reinke et al., 2008).

Группа генов с импульсным паттерном экспрессии в печени, получившая название L(only)IMP, включала 177 генов. В этой группе отмечена перепредставленность терминов *extracellular exosome*, *respiratory chain* GO категории Cellular Components. Результаты анализа обогащения терминами категории Biological Process показали перепредставленность генов с аннотацией терминами, связанными с защитными реакциями клетки и организма (например, *acute inflammatory response*, *acute-phase response*, *blood coagulation*, *regulation of complement activation*, *regulation of humoral immune response*, *fibrinolysis*, *blood coagulation*). Другая группа терминов связана с промежуточным метаболизмом (в частности, *respiratory electron transport chain*, *ATP metabolic process*, *generation of precursor metabolites and energy*, *oxidative phosphorylation*). Это в значительной степени подтверждается перепредставленностью генов путей *Complement and coagulation cascades*, *Oxidative phosphorylation* и *Metabolic pathways*, описанных в базе данных KEGG.

Первая группа терминов связана с защитной функцией организма. Поскольку основная задача циркадных часов – синхронизация всех процессов, протекающих в организме для адаптации его к ритмически изменяющимся внешним воздействиям, очевидно, что защитные функции и циркадные часы должны быть взаимосвязаны. Действительно, эти две системы имеют многочисленные взаиморегулирующие связи (Cermakian et al., 2014). Печень служит источником многих компонентов защитной системы организма, в том числе острофазных белков, белков системы комплемента и ряда регуляторов системы активации комплемента, являющихся важными компонентами иммунитета, белков свертывающей и противосвертывающей системы крови. Многие из этих белков секреторные и кодируются генами группы L(only)IMP.

Вторая группа терминов, связанная с оксидативным фосфорилированием, соответствует процессам, происходящим в митохондриях. Суточная ритмичность многих митохондриальных процессов подтверждена при исследованиях как в тканях печени, так и на изолированных митохондриях (de Goede et al., 2018). Целостность механизма молекулярных циркадных часов, и центральных, и периферических, необходима для полноценной регуляции митохондриального дыхания в клетках печени (de Goede et al., 2018). Кроме того, было показано, что внешние воздействия – состав пищи, режим кормление/голодание и др. – могут быть дополнительными регуляторами ритмичности этих процессов в печени (de Goede et al., 2018).

Группа генов с импульсным паттерном экспрессии в почках, названная K(only)IMP, включала 55 генов. В этой группе GO анализ не выявил обогащения терминами ни одной из категорий при заданном уровне значимости критерия Бенджамини–Хохберга.

Заключение

Суточные ритмы биологических процессов могут отражаться в суточной синхронизации различных участников этого процесса, число находящихся в активной фазе которых в течение суток может не меняться. Поэтому подходы, связанные с выявлением групп генов, находящихся в активной фазе в определенное время суток, с последующим функциональным GO анализом этих групп (Janich et al., 2015; Подколодный и др., 2017; Castelo-Szekely et al., 2017) позволяют выявлять цикличность только тех процессов, которые существенно меняют число генов-участников рассматриваемого процесса в течение суток. Отсутствие детального описания стадий процессов с указанием генов, участвующих в них, затрудняет проведение анализа циркадной регуляции большинства биологических процессов.

Однако паттерны суточной экспрессии генов различаются не только фазовыми характеристиками, но и формой кривой, описывающей циклическую динамику экспрессии. Сходство формы кривой суточной динамики экспрессии генов может быть отражением участия в сходных процессах продуктов этих генов.

В настоящей работе предложен подход к выделению различных типов форм кривых суточной динамики экспрессии генов независимо от их фазы. Такой динамический паттерн суточной экспрессии генов можно рассматривать как дополнительную функционально важную характеристику генов. Это актуально именно для исследования суточной динамики экспрессии генов, которые могут реагировать на различные синхронизирующие сигналы: свет, физическую, эмоциональную или умственную активность, питание, стресс, изменение температуры и т. д. Разные сигналы могут воздействовать на различные уровни регуляции экспрессии, что может проявляться в различной форме паттернов суточной экспрессии генов.

Предложенный нами подход позволил выделить группы генов, сходные по форме кривой суточной экспрессии, без учета их фазовых характеристик. Выявлены группы, которые имеют не только паттерны экспрессии с одним максимумом (синусоидальные, асимметричные со смещением влево или вправо, импульсные), но и сложные, ежесуточно воспроизводящиеся, с несколькими максимумами.

Функциональный анализ обогащения терминами GO групп генов с резко различающимися паттернами суточной экспрессии (синусоидальными и импульсными) в почках и печени мыши показал, что группа генов с синусоидальным паттерном суточной экспрессии как в печени, так и в почках в большей мере ассоциирована с регуляцией циркадного ритма и метаболизма. В то же время нам удалось выявить тканеспецифичные особенности групп генов с синусоидальным паттерном суточной экспрессии, которые оказались связаны с функциональными особенностями двух органов. Группа генов с импульсным паттерном суточной экспрессии в значительной степени связана с защитными функциями организма, требующими формирования быстрого ответа. В формирование таких ответов существенный вклад должны вносить механизмы, способные обеспечить значительное увеличение экспрессии генов за короткое время. Одним из таких механизмов может быть регуляция эффективности трансляции генов (Janich et al., 2015; Castelo-Szekely et al., 2017).

Таким образом, наши исследования подтвердили эффективность предложенного подхода к выявлению и анализу кривых суточной динамики экспрессии генов. Выделенные динамические паттерны суточной экспрессии имеют большое значение для дальнейшего изучения сложной циркадной регуляции, синхронизации и взаимодействия биологических процессов с суточной динамикой в организме млекопитающих.

Acknowledgements

The development of data processing methods and software was supported by State Budgeted Project 0315-2016-0005 for the Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics, Novosibirsk. Data preparation, calculations, and biological interpretation were supported by State Budgeted Project 0324-2018-0017.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Подколодный Н.Л., Твердохлеб Н.Н., Подколодная О.А. Анализ циркадного ритма биологических процессов в печени и почках мыши. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(8): 903-910. DOI 10.18699/VJ17.311.
[Podkolodnyy N.L., Tverdokhleb N.N., Podkolodnaya O.A. Analysis of the circadian rhythm of biological processes in mouse liver and kidney. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(8):903-910. DOI 10.18699/VJ17.311. (in Russian)]

Adamovich Y., Ladeuix B., Golik M., Koeners M.P., Asher G. Rhythmic oxygen levels reset circadian clocks through HIF1α. Cell Metab. 2017;25(1):93-101. DOI 10.1016/j.cmet.2016.09.014.

Atger F., Mauvoisin D., Weger B., Gobet C., Gachon F. Regulation of mammalian physiology by interconnected circadian and feeding rhythms. Front. Endocrinol. (Lausanne). 2017;8:42. DOI 10.3389/fendo.2017.00042. eCollection 2017.

Castelo-Szekely V., Arpat A.B., Janich P., Gatfield D. Translational contributions to tissue specificity in rhythmic and constitutive gene expression. Genome Biol. 2017;18(1):116.

Cermakian N., Westfall S., Kiessling S. Circadian clocks and inflammation: reciprocal regulation and shared mediators. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 2014;62(4):303-318. DOI 10.1007/s00005-014-0286-x. Epub 2014 Apr 1.

de Goede P., Wefers J., Brombacher E.C., Schrauwen P., Kalsbeek A. Circadian rhythms in mitochondrial respiration. J. Mol. Endocrinol. 2018;60(3):R115-R130. DOI 10.1530/JME-17-0196. Epub 2018 Jan 29.

Firsov D., Bonny O. Circadian rhythms and the kidney. Nat. Rev. Nephrol. 2018;14(10):626-635. DOI 10.1038/s41581-018-0048-9.

Flôres D.E., Bettilyon C.N., Yamazaki S. Period-independent novel circadian oscillators revealed by timed exercise and palatable meals. Sci. Rep. 2016;6:21945. DOI 10.1038/srep21945.

Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat. Protoc. 2009;4:44-57.

Ingolia N.T. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. Nat. Rev. Genet. 2014;15(3):205-213. Epub 2014; Jan 28. DOI 10.1038/nrg3645.

Janich P., Arpat A.B., Castelo-Szekely V., Lopes M., Gatfield D. Ribosome profiling reveals the rhythmic liver translatome and circadian clock regulation by upstream open reading frames. Genome Res. 2015;25(12):1848-1859.

Kornmann B., Schaad O., Bujard H., Takahashi J.S., Schibler U. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. PLoS Biol. 2007;5(2):e34. DOI 10.1371/journal.pbio.0050034.

Laing E.E., Johnston J.D., Möller-Levet C.S., Bucca G., Smith C.P., Dijk D.J., Archer S.N. Exploiting human and mouse transcriptomic data: Identification of circadian genes and pathways influencing health. Bioessays. 2015;37(5):544-556. DOI 10.1002/bies.201400193.

Mendoza-Viveros L., Bouchard-Cannon P., Hegazi S., Cheng A.H., Pastore S., Cheng H.M. Molecular modulators of the circadian clock: lessons from flies and mice. Cell Mol. Life Sci. 2017;74(6):1035-1059. DOI 10.1007/s00018-016-2378-8.

Reinke H., Saini C., Fleury-Olela F., Dibner C., Benjamin I.J., Schibler U. Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. Genes Dev. 2008;22(3):331-345. DOI 10.1101/gad.453808.

Ribas-Latre A., Eckel-Mahan K. Interdependence of nutrient metabolism and the circadian clock system: Importance for metabolic health. Mol. Metab. 2016;14;5(3):133-152. DOI 10.1016/j.molmet.2015.12.006.

Ripperger J.A., Brown S.A. Transcriptional Regulation of Circadian Clocks. In: Albrecht U. (Ed.) The Circadian Clock. N. Y.: Springer, 2010;37-78.

Smircich P., Eastman G., Bispo S., Duhagon M.A., Guerra-Slompo E.P., Garat B., Goldenberg S., Munroe D.J., Dallagiovanna B., Holetz F., Sotelo-Silveira J.R. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. BMC Genomics. 2015;16:443. DOI 10.1186/s12864-015-1563-8.

Statistics and Machine Learning Toolbox™ User's Guide. 2018. The Math Works, Inc. https://uk.mathworks.com/help/pdf_doc/stats/stats.pdf

Sulli G., Manoogian E.N.C., Taub P.R., Panda S. Training the circadian clock, clocking the drugs, and drugging the clock to prevent, manage, and treat chronic diseases. Trends Pharmacol. Sci. 2018;39(9):812-827. DOI 10.1016/j.tips.2018.07.003. Epub 2018 Jul 27.

Wu Y., Tang D., Liu N., Xiong W., Huang H., Li Y., Ma Z., Zhao H., Chen P., Qi X., Zhang E.E. Reciprocal regulation between the circadian clock and hypoxia signaling at the genome level in mammals. Cell Metab. 2017;25(1):73-85. DOI 10.1016/j.cmet.2016.09.009.

Yan Q., Cellular Rhythms and Networks: Implications for Systems Medicine. (Springer Briefs in Cell Biology). Springer, 2015. DOI 10.1007/978-3-319-22819-8.

Zhang R., Lahens N.F., Balance H.I., Hughes M.E., Hogenesch J.B. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014;111(45): 16219-16224. PMID 25349387. DOI 10.1073/pnas.1408886111.

Zhou B., Zhang Y., Zhang F., Xia Y., Liu J., Huang R., Wang Y., Hu Y., Wu J., Dai C., Wang H., Tu Y., Peng X., Wang Y., Zhai Q. CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1. Hepatology. 2014;59(6):2196-206. DOI 10.1002/hep.26992.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1063-1069
DOI 10.18699/VJ18.451

Приоритизация генов, ассоциированных с патогенезом лейкоза у крупного рогатого скота

Н.С. Юдин[1, 2] ✉, Н.Л. Подколодный[1, 3], Т.А. Агаркова[4], Е.В. Игнатьева[1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[3] Институт вычислительной математики и математической геофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[4] Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

Перспективным подходом для искоренения инфекционных болезней сельскохозяйственных животных, особенно при отсутствии эффективных методов лечения и профилактики, считается направленная селекция по генетическим маркерам (однонуклеотидным полиморфизмам, минисателлитам). Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) распространен по всему миру и представляет одну из основных проблем для развития животноводства и продовольственной безопасности в России. Однако, как показали недавние полногеномные исследования, чувствительность/резистентность к инфекции ВЛКРС носит полигенный характер. Целью исследования было создание каталога генов крупного рогатого скота и других видов млекопитающих, вовлеченных в процесс патогенеза инфекции ВЛКРС, и приоритизация генов каталога с помощью методов биоинформатики. Путем ручного сбора информации из открытых источников нами создан каталог генов крупного рогатого скота и других видов млекопитающих, вовлеченных в процесс патогенеза инфекции ВЛКРС, включающий 446 генов. Приоритизацию генов каталога осуществляли на основе следующих критериев: 1) ген ассоциирован с лейкозом по данным полногеномного анализа ассоциаций; 2) ген ассоциирован с лейкозом по данным анализа ассоциаций «случай–контроль»; 3) роль гена в развитии лейкоза изучена в экспериментах по нокауту у мышей; 4) белок, кодируемый геном, участвует в белок-белковых взаимодействиях с вирусной частицей либо отдельным вирусным белком; 5) ген имеет аннотацию терминами Gene Ontology, которые являются перепредставленными для данного списка генов; 6) ген участвует в биологических путях из баз KEGG или REACTOME, которые являются перепредставленными для данного списка генов; 7) белок, кодируемый геном, имеет неслучайно высокое количество белок-белковых взаимодействий с белками, кодируемыми другими генами из каталога. На основе каждого критерия гену присваивали ранг. Затем ранги суммировали и определяли общий ранг. Приоритизация списка, включающего 446 генов, позволила выделить пять наиболее вероятных генов-кандидатов (*TNF*, *LTB*, *BOLA-DQA1*, *BOLA-DRB3*, *ATF2*), которые могут влиять на чувствительность/устойчивость крупного рогатого скота к заболеванию лейкозом.

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота; полногеномный анализ ассациаций; ген; однонуклеотидный полиморфизм; ассоциация; приоритизация; GO анализ; белок-белковое взаимодействие.

Prioritization of genes associated with the pathogenesis of leukosis in cattle

N.S. Yudin[1, 2] ✉, N.L. Podkolodnyy[1, 3], T.A. Agarkova[4], E.V. Ignatieva[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
[4] Siberian Federal Research Center of Agro-BioTechnologies, RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

Selection by means of genetic markers is a promising approach to the eradication of infectious diseases in farm animals, especially in the absence of effective methods of treatment and prevention. Bovine leukemia virus (BLV) is spread throughout the world and represents one of the biggest problems for the livestock production and food security in Russia. However, recent genome-wide association studies have shown that sensitivity/resistance to BLV is polygenic. The aim of this study was to create a catalog of cattle genes and genes of other mammalian species involved in the pathogenesis of BLV-induced infection and to perform gene prioritization using bioinformatics methods. Based on manually collected information from a range of open sources, a total of 446 genes were included in the catalog of cattle genes and genes of other mammals involved in the pathogenesis of BLV-induced infection. The following criteria were used to prioritize 446 genes from the catalog: (1) the gene is associated with leukemia according to a genome-wide association study; (2) the gene is associated with leukemia according to a case-control study; (3) the role of the gene in leukemia development has been studied using knockout mice; (4) protein-protein interactions exist between the gene-encoded protein and either viral particles or individual viral proteins; (5) the gene is annotated with Gene Ontology terms that are over-represented for a given list of genes; (6) the gene participates in biological pathways from the KEGG or REACTOME databases, which are over-represented for a given list of genes; (7) the protein encoded by the gene has a high number of protein-protein interactions with proteins encoded by other genes from the catalog. Based on each criterion, a rank was assigned to each gene. Then the ranks were summarized and an overall rank was determined. Prioritization of 446 candidate genes allowed us to identify 5 genes of interest

Received October 1, 2018
Revised November 22, 2018
Accepted November 22, 2018

✉ e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

(*TNF*, *LTB*, *BOLA-DQA1*, *BOLA-DRB3*, *ATF2*), which can affect the sensitivity/resistance of cattle to leukemia.

Key words: bovine leukemia virus; genome-wide association study; gene; single-nucleotide polymorphism; association; prioritization; GO analysis; protein-protein interactions.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Юдин Н.С., Подколодный Н.Л., Агаркова Т.А., Игнатьева Е.В. Приоритизация генов, ассоциированных с патогенезом лейкоза у крупного рогатого скота. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1063-1069. DOI 10.18699/VJ18.451

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yudin N.S., Podkolodnyy N.L., Agarkova T.A., Ignatieva E.V. Prioritization of genes associated with the pathogenesis of leukosis in cattle. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1063-1069. DOI 10.18699/VJ18.451 (in Russian)

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) – это онкогенный дельта-ретровирус, инфицирующий крупный рогатый скот (КРС), овец и другие виды млекопитающих. ВЛКРС родственен Т-лимфотропному вирусу человека типа 1 (HTLV-1) и вирусу иммунодефицита человека типа 1 (HIV-1) (Coffin et al., 2002). Инфекция ВЛКРС протекает у большинства животных бессимптомно, тогда как у 30–40 % развивается персистентный лимфоцитоз, который характеризуется размножением инфицированных провирусом В-лимфоцитов и повышением числа лейкоцитов в периферической крови КРС. Менее чем у 10 % инфицированных животных развивается тяжелая форма заболевания, которая приводит к появлению летальных лимфом или лимфосарком в различных органах (Barez et al., 2015). ВЛКРС распространен по всему миру и переносится между животными через кровь, молоко или другие биологические жидкости, которые содержат ДНК провирусов (Gutiérrez et al., 2015). В России лейкоз КРС представляет одну из основных проблем для развития животноводства и продовольственной безопасности. В ряде хозяйств поголовье инфицированных животных составляет до 40 %. По данным за 2010–2014 гг., экономические потери от лейкоза КРС в России достигают 2.5 млрд руб. в год (Stepanova, 2016).

Традиционные меры борьбы с лейкозом включают изоляцию или ликвидацию инфицированного скота по результатам серологической и гематологической диагностики инфекции ВЛКРС, но эти меры экономически неприемлемы в хозяйствах с высокой долей инфицированных животных (Rodríguez et al., 2011). Перспективным подходом для ликвидации инфекционных болезней сельскохозяйственных животных, особенно при отсутствии эффективных методов лечения и профилактики, считается направленная селекция по генетическим маркерам, ассоциированным с устойчивостью к инфекции организма-хозяина (Bishop, 2014). Например, при геномной оценке молочного скота уже сейчас учитывается устойчивость к маститу (Koeck et al., 2012).

Известно, что некоторые породы КРС обладают врожденной устойчивостью к инфицированию ВЛКРС (FAO, 2007). Путем анализа фенотипов и родословных (Abdalla et al., 2013), а также с использованием матрицы аддитивной генетической дисперсии–ковариации (Abdalla et al., 2016) было показано, что коэффициент наследуемости чувствительности к ВЛКС у животных голштинской и джерсейской пород составляет около 0.08. Проведенные ранее многочисленные исследования показали, что ДНК-маркеры в генах-кандидатах (например, определенные аллели в гене *BOLA-DRB3*, кодирующем белок DRB3, относящийся к главному комплексу гистосовместимости MHC II) вносят существенный вклад в вариабельность к инфицированию ВЛКРС между отдельными животными (Xu et al., 1993; Juliarena et al., 2008; Miyasaka et al., 2013). При этом одни аллели в гене *BOLA-DRB3* ассоциированы с чувствительностью/резистентностью к ВЛКРС у животных голштинской породы и не ассоциированы у животных джерсейской породы. Однако, как показал недавний полногеномный анализ ассоциации (GWAS) чувствительности/резистентности к инфекции, чувствительность к ВЛКРС носит полигенный характер (Abdalla et al., 2016; Brym et al., 2016; Carignano et al., 2018).

Целью исследования было создание каталога генов КРС и других видов млекопитающих, вовлеченных в процесс патогенеза инфекции ВЛКРС, а также приоритизация генов каталога с помощью методов биоинформатики.

Материалы и методы

Создание каталога генов. Набор ключевых слов для поиска публикаций в PubMed был сформирован на основе методики, использованной нами ранее для поиска информации о генах человека, участвующих в ответе на вирус клещевого энцефалита (Ignatieva et al., 2017). В ходе этой работы был проведен экспертный анализ абстрактов и полных текстов научных статей, полученных из PubMed по названию вируса. Выявлены следующие типы экспериментов, указывающих на причастность того или иного гена к ответу организма-хозяина на вирус клещевого энцефалита: 1) идентификация аллельных вариантов генов, ассоциированных с тяжестью заболевания; 2) обнаружение влияния нокаута определенного гена на клинические показатели, характеризующие ход заболевания; 3) анализ дифференциальной экспрессии генов *in vivo* у больных людей и инфицированных животных либо *in vitro* в клетках, зараженных вирусом; 4) выявление прямых физических взаимодействий между белками организма-хозяина и вирусными белками (либо РНК) *in vitro*. Поэтому для поиска публикаций в PubMed, содержащих данные о генах, вовлеченных в патогенез лейкоза у крупного рогатого скота, нами были использованы следующие комбинации ключевых слов: 1) (Bovine leukosis OR Bovine leukemia virus) AND association; 2) (Bovine leukosis OR Bovine leukemia virus) AND Knockout; 3) (Bovine leukosis OR Bovine leukemia virus) AND Expression; 4) (Bovine leukosis OR Bovine leukemia virus) AND (PPI OR Physical interactions).

Данные о генах/белках экстрагировали из отобранных публикаций вручную. Названия генов корректировали в соответствии с их официальными названиями из базы данных Entrez Gene. Сведения о каждом гене/белке помещали в определенную категорию (таблицу) в соответствии с типом доказательства его участия в патогенезе инфекционного процесса. Наименование категорий (таблиц) и их описание приведены в табл. 1.

Функциональная аннотация генов осуществлялась с помощью системы DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Huang et al., 2009). В качестве референсного списка генов использовали список генов из полного генома *Bos taurus.* Термины из словаря базы Gene Ontology и биологические пути из баз KEGG и REACTOME считали перепредставленными для данного списка генов при FDR < 0.05 и Fold Enrichment > 3.

Обучающее множество генов содержало 21 ген из созданного нами каталога. Каждый из них удовлетворял хотя бы одному критерию (табл. S14)[1]. Первый критерий – ген содержался также в диаграмме bta05166 базы KEGG Pathway, описывающей процесс инфицирования клеток организма-хозяина вирусом HTLV-1 (Human T-cell leukemia virus 1). Таких генов было найдено 19. Вирус HTLV-1 является наиболее близкородственным представителем того же семейства (*Deltaretrovirus*), что и ВЛКРС (Coffin et al., 2002), на основе чего можно ожидать, что процесс инфицирования вирусами HTLV-1 и ВЛКРС активирует сходные процессы в клетках организма-хозяина. Второй критерий – ген имел следующие экспериментальные свидетельства (см. табл. 1) его вовлеченности в ответ на инфекцию вирусом ВЛКРС: аллельные варианты по данным экспериментов «случай–контроль»; нокаут; наличие физических (белок-белковых) взаимодействий с белками ВЛКРС (табл. S2, S3, S6). Таких генов было выявлено шесть.

Реконструкция сетей белок-белковых взаимодействий. Данные о белок-белковых взаимодействиях экстрагировали из базы данных IID (Integrated Interactions Database, версия от 2018-05) (Kotlyar et al., 2016).

Поскольку протеом вида *Bos taurus* изучен еще не в достаточной степени, поиск белок-белковых взаимодействий производили для списка генов человека, ортологичных генам из каталога. Поиск соответствия между символами генов вида *Bos taurus* и символами ортологичных генов вида *Homo sapiens* осуществляли в программе Ortholog Conversions (https://biodbnet-abcc.ncifcrf.gov/db/dbOrtho.php) ресурса bioDBnet. В отдельных случаях поиск ортологов выполняли с помощью геномного браузера UCSC genome browser (https://genome.ucsc.edu/), который визуализирует выравнивание последовательности ДНК искомого гена с последовательностями ортологичных генов других видов.

На основе данных из базы IID нами были реконструированы две сети: сеть всех белок-белковых взаимодействий между генами/белками человека (H_PPI) и сеть белок-белковых взаимодействий для генов/белков, ассоциированных с лейкозом (L_PPI). Сеть H_PPI содержала N = 18238 вершин (белков), 1562726 ребер (взаимодействий) и имела среднюю степень вершины 171. Сеть L_PPI содержала n = 428 вершин, 2352 ребра и имела среднюю степень вершины, равную 11.

Расчет значимости генов на основе сети белок-белковых взаимодействий. Для расчета индекса значимости или веса w_i некоторого гена g_i, кодирующего белок p_i, была использована следующая процедура.

1. Формирование для белка p_i таблицы 2×2, описывающей соотношение числа белков, взаимодействующих с белком p_i в сети L_PPI и в сети H_PPI.

Network*	Number of proteins		Network size except p_i protein
	interacting with p_i protein	not interacting with p_i protein	
L_PPI	$n_{11} = d_i$	$n_{12} = n-1-d_i$	$n_1 = n-1$
H_PPI\L_PPI	$n_{21} = D_i - d_i$	$n_{22} = N - D_i - n + d_i$	$n_2 = N - n$
H_PPI	$n_{.1} = D_i$	$n_{.2} = N - D_i$	$n = N - 1$

* H_PPI\L_PPI is the human PPI network from which proteins involved in L_PPI are removed. A dot in an index indicates summarizing over the index; d_i and D_i are the numbers of interactions of p_i protein in the L_PPI and H_PPI networks, respectively.

2. Расчет отношения шансов (odds ratio – OR) для каждого белка p_i:

$$\mathrm{OR} = \frac{d_i/(n-1-d_i)}{(D_i-d_i)/(N-D_i-n+d_i)} = \frac{d_i(N-D_i-n+d_i)}{(D_i-d_i)\,(n-1-d_i)}. \quad (1)$$

Далее мы будем использовать логарифмическую форму статистики ln(OR), которая асимптотически сходится к нормальному распределению N(0,σ) (Vsevolozhskaya, Zaykin, 2018), где

$$\sigma = \sigma(\ln(\mathrm{OR})) = \sqrt{\frac{1}{d_i} + \frac{1}{n-1-d_i} + \frac{1}{D_i-d_i} + \frac{1}{n-D_i-n+d_i}}. \quad (2)$$

Нулевая гипотеза H_0: ln(OR) = 0 означает, что отношение числа белков, взаимодействующих с белком p_i, к числу не взаимодействующих с ним белков в сети L_PPI равно этому показателю в сети с белками, не входящими в сеть L_PPI, т.е. белок p_i взаимодействует с белками из сети L_PPI так же, как и с другими белками.

Альтернативная гипотеза H_1: ln(OR) > 0 означает, что белок p_i чаще взаимодействует с белками из сети L_PPI, чем с другими белками.

Для гена g_i в качестве индекса значимости I_i будем использовать нижнюю границу 95 % доверительного интервала для статистики ln(OR):

$$I_i = \ln(\mathrm{OR}) - 1.96\,\sigma. \quad (3)$$

Значение $I_i > 0$ будет указывать на то, что гипотеза H_0 отвергается. В этом случае мы будем использовать значение I_i как значимость или вес гена g_i, полученный на основе сети белок-белковых взаимодействий:

$$\text{если } I_i > 0, \text{ то } w_i = I_i, \text{ иначе } w_i = 0. \quad (4)$$

Приоритизацию генов осуществляли на основе нескольких критериев, после чего по каждому критерию гену присваивали ранг. Затем ранги суммировали и определяли общий ранг. В работе использовали следующие критерии.

[1] Табл. S1–S15 см. в Приложении по адресу: http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx18.pdf

Table 1. Categories of genes/proteins of cattle and other mammalian species included in the list of genes involved in the development of BLV infection

Category (proof method)	Description	Number of		Table no. in the Supplement
		genes	publications	
Genome-wide association analysis	Genes containing or adjacent to SNPs associated with BLV infection development according to GWAS data	53	3	S1
Allelic variants	Allelic variants of SNPs in these genes were associated with sensitivity/resistance to BLV infection in case–control studies*	3	6	S2
Knockout	Knockout of this gene in mice increases their resistance to the administration of the plasmid harboring the BLV nucleotide sequence	1	1	S3
Expression**	Genes encoding mRNAs (or proteins) whose expression increases/decreases after BLV infection	25	29	S4
DNA microarray	Genes encoding mRNAs whose expression increases/decreases in animals with persistent lymphocytosis according to hybridization with a DNA microarray	368	1	S5
Physical interaction	Genes encoding proteins that directly interact with BLV proteins	3	3	S6
Entire catalog	Catalog of genes of cattle and other mammal species involved in BLV infection development	446	43	S7

* Clinical severity or immunological parameters of infected animals were associated with one of the SNP alleles.

** When evidence existed that the level of the active protein form altered in response to BLV infection, the gene encoding this protein was also added to this class.

Критерий 1. Ген ассоциирован с лейкозом по данным экспериментов GWAS. Ассоциированным генам присваивается ранг 1, остальным генам присваивается ранг 0.

Критерий 2. Ген ассоциирован с лейкозом по данным анализа «случай–контроль» для отдельного гена. Ассоциированным генам присваивается ранг 1, остальным генам – ранг 0.

Критерий 3. Роль гена в развитии лейкоза изучена в экспериментах по нокауту у мышей. Таким генам присваивается ранг 1, остальным генам – 0.

Критерий 4. Белок, кодируемый геном, участвует в белок-белковых взаимодействиях с вирусной частицей либо отдельным вирусным белком. Такие гены получают ранг 1, а остальным генам присваивается ранг 0.

Критерий 5. Ген имеет аннотацию терминами Gene Ontology, которые, по данным нашего анализа, являются перепредставленными для списка генов каталога (FDR < 0.05, Fold Enrichment > 3). Гены, аннотированные такими терминами, получают ранг 1, остальным генам присваивается ранг 0.

Критерий 6. Ген участвует в биологических путях из баз KEGG или REACTOME, которые, по данным нашего анализа, являются перепредставленными для списка генов каталога (FDR < 0.05, Fold Enrichment > 3). Такие гены получают ранг 1, а остальным генам присваивается ранг 0.

Критерий 7. Ранг каждого гена приравнивался индексу значимости (или веса) w_i, рассчитанному на основе описанной выше процедуры анализа сетей белок-белковых взаимодействий H_PPI и L_PPI.

Примененные в данной работе критерии выполняют две задачи. Первая задача состояла в том, чтобы отобрать гены, имеющие наиболее убедительные экспериментальные свидетельства их вовлеченности в ответ на инфекцию ВЛКРС (критерии 1–4). Вторая задача – придать вес генам/белкам, принадлежащим к функционально связанному подмножеству, контролирующему патогенез заболевания, т. е. приоритизировать их.

Результаты

Создание каталога генов

Поиск по PubMed выявил 43 экспериментальные статьи, описывающие вовлечение генов/белков КРС и других видов млекопитающих в процесс инфицирования ВЛКРС. В результате ручной аннотации данного набора статей нами был создан каталог, включающий 446 генов КРС и других видов млекопитающих, вовлеченных в процесс патогенеза инфекции ВЛКРС (табл. 1).

Функциональная аннотация генов с помощью системы DAVID

С помощью системы DAVID были выявлены 200 перепредставленных терминов из словаря биологических процессов базы Gene Ontology, а также группы генов, аннотированные этими терминами (см. табл. 2 и табл. S8). Большая часть выявленных GO терминов характеризует процессы, связанные с ответом организма на вирус и иммунными реакциями. Объединенный список генов, связанных со всеми 200 перепредставленными GO терминами, включал 162 гена (табл. S9).

Кроме того, было выявлено, что гены из рассматриваемого списка неслучайно часто встречаются в семнадцати биологических путях из баз KEGG и REACTOME (15 и 2 соответственно) (табл. S10). Большинство выявленных биологических путей связано с развитием заболеваний, таких как воспалительное заболевание кишечника, болезнь

Шагаса, малярия, африканский трипаносомоз, туберкулез, корь, грипп А, ревматоидный артрит, лейшманиоз, стафилококковая инфекция, коклюш, герпес. Объединенный список генов, связанных со всеми семнадцатью перепредставленными биологическими путями, включал 81 ген (табл. S11).

Значимость генов в сети белок-белковых взаимодействий

На основе анализа сетей H_PPI и L_PPI нами выявлено, что 167 генов из каталога имеют положительные значения индекса значимости w_i (табл. S12).

Наибольшие значения w_i (от 1.20 до 1.77) имели гены *SLC7A7*, *TYROBP*, *CD79A*, *MS4A1*, *CTSS*, *CD3E*, *C1QA*, *TLR8*, *IL2RA*, *CD2*, *FGL2*, *IL6R*, *CD63*, *TNFRSF1B*. Белковые продукты большинства из них участвуют в регуляции иммунных процессов (табл. S13). Кроме того, корреляционный анализ значения характеристики гена w_i и индекса принадлежности к обучающей выборке показал наличие высокого уровня корреляции $R = 0.187$ с уровнем значимости *p-value* < 0.001. Эти наблюдения указывают на то, что предложенный нами метод расчета значимости генов на основе сети белок-белковых взаимодействий адекватно оценивает значимость гена в контексте целевого признака и может быть использован в качестве дополнительного критерия при решении задачи приоритизации генов.

Ранжирование генов

На основе описанной процедуры ранжирования (см. Материалы и методы) были определены ранги всех генов из сформированного нами каталога (446 генов). Наивысшие итоговые ранги (5.77 и 5.05) выявлены у генов *TNF* и *HLA-DPA1*/*BOLA-DQA1*. Еще три гена (*HLA-DRB1*/*BOLA-DRB3*, *ATF2*, *LTB)* набрали более 4 баллов (табл. 3). У двадцати генов (*CTSS*, *CD3E*, *LTA*, *C1QA*, *IL2RA*, *CD2*, *IL6R*, *TNFRSF1B*, *CTLA4*, *CSNK2B*, *IL10*, *LCP2*, *SELPLG*, *IL6*, *C1QC*, *CD19*, *IL1B*, *IL18*, *SYK*, *HGF*) суммарный балл принимал значение от 3 до 3.36. Полные сведения по ранжированию генов представлены в табл. S15.

Обсуждение

Для выявления приоритетных генов-кандидатов, связанных с развитием лейкоза, нами собран каталог, включающий 446 генов, выявленных на основе различных экспериментальных подходов (GWAS, исследование белок-белковых взаимодействий *in vitro* и т. д.). Оказалось,

Table 2. Some overrepresented (FDR < 0.05, Fold Enrichment > 10) terms* in the Gene Ontology vocabulary detected by the DAVID resource in analysis of 446 genes in the catalog

Go term	Number of genes	Fold Enrich-ment	FDR
Interferon-alpha biosynthetic process	5	37.4	4.7E–03
Regulation of interferon-alpha biosynthetic process	5	37.4	4.7E–03
Interferon-gamma biosynthetic process	9	24.0	1.2E–06
Regulation of interferon-gamma biosynthetic process	7	21.8	5.3E–04
Regulation of tolerance induction	6	18.7	1.7E–02
Tolerance induction	6	16.0	4.1E–02
Positive regulation of activated T cell proliferation	8	13.6	2.1E–03
Activated T cell proliferation	10	12.1	1.4E–04
Regulation of activated T cell proliferation	9	11.6	1.2E–03
Positive regulation of interferon-gamma production	16	11.5	6.5E–09
Positive regulation of alpha-beta T cell activation	12	11.5	6.9E–06
Regulation of interferon-gamma production	22	11.0	4.2E–13
Interferon-gamma production	22	10.4	1.9E–12
Cytokine biosynthetic process	22	10.3	2.3E–12
Regulation of alpha-beta T cell activation	14	10.3	1.0E–06
B cell receptor signaling pathway	9	10.2	3.5E–03
Negative regulation of mononuclear cell proliferation	11	10.0	1.7E–04
Negative regulation of lymphocyte proliferation	11	10.0	1.7E–04

* The complete list of overrepresented terms found at FDR < 0.05 and Fold Enrichment > 3 is presented in Table S8.

Table 3. Ranks of the five most significant genes in the catalog of genes involved in BLV infection development according to criteria 1–7 and their integral score

Gene designation		Criteria							Integral score
Human	Bovine	1	2	3	4	5	6	7	
TNF	*TNF*	1	1	1	0	1	1	0.77	5.77
HLA-DPA1	*BOLA-DQA1*	1	1	0	0	1	1	1.05	5.05
HLA-DRB1	*BOLA-DRB3*	1	1	0	0	1	1	0.45	4.45
ATF2	*ATF2*	0	0	0	1	1	1	1.11	4.11
LTB	*LTB*	1	0	0	0	1	1	1.03	4.03

Underlined are genes belonging to the test sample.

что группы генов, выявленных каждым из методов, слабо перекрываются между собой. Так, ни один ген из списков дифференциально экспрессируемых генов не был подтвержден другими экспериментальными методиками. Мы связываем это обстоятельство с тем, что дифференциальная экспрессия изучалась в клетках определенного типа (дендритные клетки, Т-хелперы и др.) и в определенный временной период (табл. S4 и S5), а ассоциативные исследования (табл. S1 и S2) позволяют выявить гены, влияющие на интегральные характеристики всего организма на всех этапах патологического процесса. Отсутствие пересечения между группами генов, полученными в экспериментах по белок-белковым взаимодействиям либо нокауту, с другими группами генов, по-видимому, связано с очень малым количеством генов, исследованных в этих типах экспериментов.

Для приоритизации нами использованы две группы качественно различных критериев. Первая группа (критерии 1–4) отражает наличие экспериментальных данных, свидетельствующих об ассоциации гена с заболеванием либо об известном механизме его участия в биологическом процессе. Совокупное количество генов, положительно оцененных хотя бы по одному из четырех критериев, составляет 12 % от их общего числа (54 гена из 446). При этом ни один ген не имел положительных баллов по всем четырем критериям, и только ген *TNF* имел положительную оценку по трем критериям из четырех.

Получив такой результат, мы приняли решение разработать добавочные критерии. При этом основывались на предположении, что некая часть генов/белков из каталога представляет собой функционально связанное подмножество, контролирующее течение заболевания (лейкоз). Принадлежность гена/белка к этому подмножеству может указывать на то, что ген/белок задействован в ответе на инфекцию. Таким образом, были предложены критерии 5–7, характеризующие функциональную связь каждого из генов/белков со всем множеством других генов. Критерии этой группы положительно оценивали 162 (GO анализ), 81 (Pathway анализ) и 167 (ранг в сети белок-белковых взаимодействий) генов, что составляло 36, 18 и 37 % от общего количества генов соответственно. В целом положительную оценку хотя бы по одному из указанных критериев получили 235 генов (53 %). Положительную оценку по каждому из трех критериев (критерии 5–7) получили 57 генов (13 %). Анализ оценок всего множества генов из каталога, выявленных на основе каждого из трех критериев, и индексов принадлежности генов к обучающей выборке показал наличие значимых корреляций (во всех случаях *p-value* < 0.001).

В результате ранжирования наибольшее количество баллов (от 4 до 5.77) получили пять генов (*TNF*, *BOLA-DQA1*, *BOLA-DRB3*, *ATF2*, *LTB*) (см. табл. 3). Четыре из них (*TNF*, *LTB*, *BOLA-DQA1*, *BOLA-DRB3*) оказались вовлечены в иммунный ответ. Гены *TNF* и *LTB* кодируют белки из семейства белков фактора некроза опухолей, в которое входят около 48 белков (Kim et al., 2005). Оба гена были идентифицированы как потенциальные гены-кандидаты при полногеномном анализе ассоциаций с инфицированием ВЛКРС (Carignano et al., 2018). Аллель G в промоторе гена *TNF*, на расстоянии 824 п. н. от старта транскрипции, ассоциирован с развитием лимфомы у вирусоносителей лейкоза КРС, повышенным числом провирусов в геноме и низкой транскрипционной активностью промотора *TNF* при люциферазном анализе *in vitro* (Konnai et al., 2006; Lendez et al., 2015). Нокаут этого гена у мышей делает их более чувствительными к введению плазмиды, содержащей нуклеотидную последовательность ВЛКРС (Müller et al., 2003). Белок LTB синтезируется активированными Т- и В-лимфоцитами, естественными киллерами, образует гетеротример с лимфотоксином-альфа и, таким образом, «заякоривает» лимфотоксин-альфа на клеточной мембране лимфоцита (Nakamura et al., 1995). Такой гетеротример функционирует как лиганд для рецептора TNFRSF3/LTBR и участвует в развитии иммунного ответа, обеспечивая межклеточную коммуникацию (Crowe et al., 1994). Считается, что основная функция LTB заключается в стимулировании развития лимфоидной ткани, в первую очередь лимфатических узлов (Onder et al., 2013).

Гены *BOLA-DQA1* и *BOLA-DRB3* относятся к генам главного комплекса совместимости, локализованного на хромосоме 23. Показано, что различные аллели гена *BOLA-DRB3* ассоциированы с чувствительностью/резистентностью к инфицированию ВЛКРС (Lewin, 1994). По-видимому, резистентность к вирусу связана с присутствием полярного мотива в позициях 70–71 полипептида в области вероятного пептид-связывающего домена (Xu et al., 1993). Аллель DRB3.2*0902 достоверно ассоциирован с генетической устойчивостью к развитию персистентного лимфоцитоза и пониженным числом провирусов (Juliarena et al., 2008). Аллели BoLA-DQA1*0204 и BoLA-DQA1*10012 были ассоциированы с низкой и высокой провирусной нагрузкой соответственно (Miyasaka et al., 2013).

Пятый из числа наиболее значимых генов – *ATF2*. Он кодирует транскрипционный фактор activating transcription factor 2, известный также как CREB2 (Cyclic AMP-responsive element-binding protein 2). Белок ATF2 способен индуцировать экспрессию длинного терминального повтора ВЛКРС *in vitro* (Willems et al., 1992).

Группа, включавшая двадцать следующих по значимости генов (от 3 до 3.36 балла), содержала существенное количество генов, связанных с функционированием иммунной системы (табл. S15). Среди таких генов был *LTA*, кодирующий лимфотоксин-альфа, относящийся к семейству белков фактора некроза опухолей (Kim et al., 2005). Уровень белка LTA в крови является хорошим предиктором скорости развития СПИД у ВИЧ-инфицированных пациентов (Medrano et al., 1998). Шесть из двадцати генов, имевших оценку от 3 до 3.36 балла (*IL2RA*, *IL6R*, *IL10*, *IL6*, *IL1B*, *IL18*), кодируют интерлейкины и/или их рецепторы, и три гена (*CD3E*, *CD2*, *CD19*) кодируют поверхностные антигены, экспрессирующиеся на лимфоидных клетках.

Таким образом, нами создан каталог генов КРС и других видов млекопитающих, вовлеченных в процесс патогенеза инфекции ВЛКРС, включающий 446 генов. Приоритизация полученного списка генов методами биоинформатики позволила выделить пять наиболее вероятных генов-кандидатов, которые могут влиять на чувствительность/устойчивость КРС к заболеванию лейкозом. Экспертный анализ данных литературы выявил потенциальную воз-

можность участия каждого из пяти высокоприоритетных генов в патогенезе заболевания, подтвердив тем самым эффективность выбранного нами метода приоритизации. Дальнейшие экспериментальные исследования этих генов позволят получить информацию, значимую для понимания механизмов патогенеза лейкоза у КРС, что крайне важно для выработки практических рекомендации для ликвидации этой вирусной инфекции, в том числе с помощью геномной и маркер-ассоциированной селекции.

Acknowledgements

This work was supported by the Integrated Program of Basic Research II.1 SB RAS, project 0324-2018-0027. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (ICG SB RAS) was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Abdalla E.A., Peñagaricano F., Byrem T.M., Weigel K.A., Rosa G.J. Genome-wide association mapping and pathway analysis of leukosis incidence in a US Holstein cattle population. Anim. Genet. 2016; 47(4):395-407. DOI 10.1111/age.12438.

Abdalla E.A., Rosa G.J., Weigel K.A., Byrem T. Genetic analysis of leukosis incidence in United States Holstein and Jersey populations. J. Dairy Sci. 2013;96(9):6022-6029. DOI 10.3168/jds.2013-6732.

Barez P.Y., de Brogniez A., Carpentier A., Gazon H., Gillet N., Gutiérrez G., Hamaidia M., Jacques J.R., Perike S., Neelature Sriramareddy S., Renotte N., Staumont B., Reichert M., Trono K., Willems L. Recent Advances in BLV Research. Viruses. 2015;7:6080-6088. DOI 10.3390/v7112929.

Bishop S.C. Disease Genetics: Successes, Challenges and Lessons Learnt. Proc. 10th World Congr. Genet. Appl. to Livest. Prod., 2014.

Brym P., Bojarojc-Nosowicz B., Olenski K., Hering D.M., Rusc A., Kaczmarczyk E., Kaminski S. Genome-wide association study for host response to bovine leukemia virus in Holstein cows. Vet. Immunol. Immunopathol. 2016;175:24-35. DOI 10.1016/j.vetimm.2016.04.012.

Carignano H.A., Roldan D.L., Beribe M.J., Raschia M.A., Amadio A., Nani J.P., Gutierrez G., Alvarez I., Trono K., Poli M.A., Miretti M.M. Genome-wide scan for commons SNPs affecting bovine leukemia virus infection level in dairy cattle. BMC Genomics. 2018;19:142. DOI 10.1186/s12864-018-4523-2.

Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. (Eds.). Retroviruses. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

Crowe P.D., VanArsdale T.L., Walter B.N., Ware C.F., Hession C., Ehrenfels B., Browning J.L., Din W.S., Goodwin R.G., Smith C.A. A lymphotoxin-beta-specific receptor. Science. 1994;264(5159):707-710.

FAO. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Commission on genetic resources for food and agriculture organization of the United Nations. Rome, 2007. Available at http://www.fao.org/docrep/010/a1250e/a1250e00.htm

Gutiérrez G., Lomonaco M., Alvarez I., Fernandez F., Trono K. Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds. Vet. Microbiol. 2015;177:366-369. DOI 10.1016/j.vetmic.2015.03.001.

Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat. Protoc. 2009;4:44-57. DOI 10.1038/nprot.2008.211.

Ignatieva E.V., Igoshin A.V., Yudin N.S. A database of human genes and a gene network involved in response to tick-borne encephalitis virus infection. BMC Evol. Biol. 2017;17(Suppl.2):259. DOI 10.1186/s12862-017-1107-8.

Juliarena M.A., Poli M., Sala L., Ceriani C., Gutierrez S., Dolcini G., Rodríguez E.M., Marino B., Rodríguez-Dubra C., Esteban E.N. Association of BLV infection profiles with alleles of the *BoLA-DRB3.2* gene. Anim. Genet. 2008;39:432-438. DOI 10.1111/j.1365-2052.2008.01750.x.

Kim J.Y., Moon S.M., Ryu H.J., Kim J.J., Kim H.T., Park C., Kimm K., Oh B., Lee J.K. Identification of regulatory polymorphisms in the TNF-TNF receptor superfamily. Immunogenetics. 2005;57(5):297-303.

Koeck A., Miglior F., Kelton D.F., Schenkel F.S. Health recording in Canadian Holsteins: data and genetic parameters. J. Dairy Sci. 2012; 95:4099-4108.

Konnai S., Usui T., Ikeda M., Kohara J., Hirata T., Okada K., Ohashi K., Onuma M. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. Microbes Infect. 2006;8(8):2163-2171.

Kotlyar M., Pastrello C., Sheahan N., Jurisica I. Integrated interactions database: tissue-specific view of the human and model organism interactomes. Nucleic Acids Res. 2016;44(D1):D536-D541. DOI 10.1093/nar/gkv1115.

Lendez P.A., Passucci J.A., Poli M.A., Gutierrez S.E., Dolcini G.L., Ceriani M.C. Association of TNF-α gene promoter region polymorphisms in bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle with different proviral loads. Arch. Virol. 2015;160(8):2001-2007. DOI 10.1007/s00705-015-2448-5.

Lewin H.A. Host genetic mechanism of resistance and susceptibility to a bovine retroviral infection. Anim. Biotechnol. 1994;5:183-191. DOI 10.1080/10495399409525820.

Medrano F.J., Leal M., Arienti D., Rey C., Zagliani A., Torres Y., Sanchez-Quijano A., Lissen E., Clerici M. Tumor necrosis factor beta and soluble APO-1/Fas independently predict progression to AIDS in HIV-seropositive patients. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1998;14:835-843.

Miyasaka T., Takeshima S.N., Jimba M., Matsumoto Y., Kobayashi N., Matsuhashi T., Sentsui H., Aida Y. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. Tissue Antigens. 2013;81:72-82. DOI 10.1111/tan.12041.

Müller C., Coffey T.J., Koss M., Teifke J.P., Langhans W., Werling D. Lack of TNF alpha supports persistence of a plasmid encoding the bovine leukaemia virus in $TNF^{-/-}$ mice. Vet. Immunol. Immunopathol. 2003;92:15-22.

Nakamura T., Tashiro K., Nazarea M., Nakano T., Sasayama S., Honjo T. The murine lymphotoxin-beta receptor cDNA: isolation by the signal sequence trap and chromosomal mapping. Genomics. 1995; 30(2):312-319.

Onder L., Danuser R., Scandella E., Firner S., Chai Q., Hehlgans T., Stein J.V., Ludewig B. Endothelial cell-specific lymphotoxin-β receptor signaling is critical for lymph node and high endothelial venule formation. J. Exp. Med. 2013;210(3):465-473. DOI 10.1084/jem.20121462.

Rodríguez S.M., Florins A., Gillet N., de Brogniez A., Sánchez-Alcaraz M.T., Boxus M., Boulanger F., Gutiérrez G., Trono K., Alvarez I., Vagnoni L., Willems L. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. Viruses. 2011;3:1210-1248. DOI 10.3390/v3071210.

Stepanova T.V. Analysis of the economic damage caused by bovine leukemia from 2010 to 2014 in the Russian Federation. Russ. J. Agric. Socio-Economic Sci. 2016;8(56):49-56. DOI 10.18551/rjoas. 2016-08.08.

Vsevolozhskaya O.A., Zaykin D.V. Put the odds on your side: a new measure for epidemiological associations. 2018. https://arxiv.org/pdf/1806.04251.pdf

Willems L., Kettmann R., Chen G., Portetelle D., Burny A., Derse D. A cyclic AMP-responsive DNA-binding protein (CREB2) is a cellular transactivator of the bovine leukemia virus long terminal repeat. J. Virol. 1992;66:766-772.

Xu A., van Eijk M.J., Park C., Lewin H.A. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. J. Immunol. 1993;151:6977-6985.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1070-1077
DOI 10.18699/VJ18.452

Сенсорная пластичность нейронов ольфакторного эпителия мыши при ассоциативном обучении

А.В. Ромащенко[1, 2] ✉, П.Е. Киреева[1], М.Б. Шарапова[2], Т.А. Запара[1], А.С. Ратушняк[1]

[1] Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Традиционно основными структурами мозга, участвующими в запоминании информации, считаются отделы, которые осуществляют вторичную обработку сенсорной информации. Однако в последнее время появились данные о роли сенсорной пластичности в реализации процессов запоминания. В настоящей работе методом марганец-усиленной МРТ исследовано влияние ольфакторного ассоциативного обучения на функциональную активность нейронов обонятельного эпителия в ответ на индифферентный стимул, в качестве которого выступало апельсиновое масло. Обнаружено, что такая периферическая структура обонятельной системы взрослых мышей, как обонятельный эпителий (ОЭ), демонстрирует зависимую от опыта пластичность. В нашем эксперименте условное кондиционирование привело к изменению паттернов накопления Mn^{2+}, агониста кальциевых каналов, в клетках ОЭ в ответ на запах апельсинового масла в сравнении с контрольной группой и животными, которым был предложен запах без подкрепления. Для интерпретации полученных результатов сопоставлялось распределение контраста по зонам обонятельной луковицы в ответ на условный запах у обученных животных и у контрольных животных, которым предоставляли апельсиновое масло в трех концентрациях: исходной (использовалась при кондиционировании), в 4 раза большей и в 4 раза меньшей. Поскольку в группе обученных животных и контрольных, которым предъявляли стимул в 4 раза большей концентрации, полученные паттерны активации ОЭ совпали, можно заключить, что ассоциативное кондиционирование увеличило чувствительность нейронов ОЭ к условному стимулу, что согласуется с проведенными на тех же животных поведенческими тестированиями. Наблюдаемое усиление ответа ОЭ на запах апельсинового масла может, с одной стороны, быть результатом нейрогенеза, т. е. образования новых обонятельных нейронов, реагирующих на данный стимул, а с другой – следствием увеличения интенсивности ответа каждой отдельной клетки. Основываясь на данных по накоплению МРТ-контраста в обонятельных нейронах, можно говорить о более вероятном увеличении чувствительности ОЭ за счет сенсорной пластичности, а не за счет нейрогенеза. Таким образом, сенсорная пластичность ОЭ играет значимую роль в формировании нейронального ответа на предоставление изначально индифферентного запаха и является частью приспособительных реакций животного к изменяющимся условиям среды.

Ключевые слова: ольфакторное обучение; сенсорная пластичность; обонятельный эпителий; марганец-усиленная магнитно-резонансная томография.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Ромащенко А.В., Киреева П.Е., Шарапова М.Б., Запара Т.А., Ратушняк А.С. Сенсорная пластичность нейронов ольфакторного эпителия мыши при ассоциативном обучении. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1070-1077. DOI 10.18699/VJ18.452

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Romashchenko A.V., Kireeva P.E., Sharapova M.B., Zapara T.A., Ratushnyak A.S. Learning-induced sensory plasticity of mouse olfactory epithelium. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1070-1077. DOI 10.18699/VJ18.452(in Russian)

Received September 3, 2018
Revised October 23, 2018
Accepted October 23, 2018

✉ e-mail: yuter2006@yandex.ru

Learning-induced sensory plasticity of mouse olfactory epithelium

A.V. Romashchenko[1, 2] ✉, P.E. Kireeva[1], M.B. Sharapova[2], T.A. Zapara[1], A.S. Ratushnyak[1]

[1] Institute of Computational Technologies, SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Traditionally, studies of the neurobiology of learning and memory focus on the circuitry that interfaces between sensory inputs and behavioral outputs, such as the amygdala and cerebellum. However, evidence is accumulating that some forms of learning can in fact drive stimulus-specific changes very early in sensory systems, including not only primary sensory cortices but also precortical structures and even the peripheral sensory organs themselves. In this study, we investigated the effect of olfactory associative training on the functional activity of olfactory epithelium neurons in response to an indifferent stimulus (orange oil). It was found that such a peripheral structure of the olfactory system of adult mice as the olfactory epithelium (OE) demonstrates experience-dependent plasticity. In our experiment, associative learning led to changes in the patterns of OE cell activation in response to orange oil in comparison with the control group and animals that were given odor without reinforcement. To interpret the results obtained, we compared the distribution of MRI contrast across the zones of OE in response to a conditioned odor in trained animals and in control animals that were given orange oil at three concentrations: original (used for conditioning), 4-fold higher and 4-fold lower. Since the OE activation patterns obtained coincided in the group of trained animals and controls, which were stimulated with orange oil at the 4-fold higher concentration, it can be concluded that associative conditioning increased the sensitivity of the OE to the conditioned stimulus. The observed increase in OE response to orange oil may be the result of neurogenesis, i. e. the maturation of new olfactory neurons responsive to this stimulus, or the consequence of an increase in individual sensitivity of each OE neuron. Based on data of MRI contrast accumulation in mouse OE, the sensory plasticity way in learning-induced increase in sensitivity of OE to conditioned stimulus is more possible. Thus, the sensory plasticity of the OE plays a significant role in the formation of the neuronal response to the provision of an initially indifferent odor and is part of the adaptive responses to the environmental changing.

Key words: olfactory learning; sensory plasticity; olfactory epithelium; manganese-enhanced magnetic resonance imaging.

Запахи играют важнейшую роль в жизни млекопитающих, предоставляя особи сведения о положении в пространстве пищи и хищников. Поэтому способность к запоминанию новой запаховой информации, которая так или иначе может оказать влияние на выживаемость особи, является одним из необходимых адаптивных свойств организма. В большой части нейробиологических исследований, посвященных механизмам обучения и памяти, в качестве основной гипотезы рассматривают различные схемы взаимодействия между сенсорным входом и структурами, ответственными за реализацию поведенческой программы, такими как гиппокамп, амигдала и мозжечок (Gao, Suga, 2000; Weinberger, 2011). Однако в целом ряде исследований показано, что при некоторых формах обучения стимул-специфические изменения могут происходить не только в кортикальных структурах обработки информации, но и непосредственно в сенсорных клетках (McGann, 2015). При этом конкретные механизмы реализации структурной пластичности сенсорного входа до сих пор слабо изучены. В данной работе на модели ассоциативного ольфакторного обучения были проведены исследования функциональных изменений в обонятельных нейронах мыши, индуцированных кондиционированием с помощью запахового стимула.

В состав обонятельного эпителия входят три вида клеток: опорные, обонятельные рецепторные и базальные. Базальные клетки являются стволовыми и способны делиться и дифференцироваться как в опорные, так и в рецепторные обонятельные клетки (Moulton, Beidler, 1967; Schwob et al., 1995). Опорные клетки несут функции изоляции рецепторных клеток, выработки мукополисахаридов (Getchell, 1986). Рецепторные клетки представляют собой биполярные нейросенсорные клетки, расположенные между опорными и базальными клетками, аксоны которых идут из носовой полости в мозг через решетчатую кость и образуют синапсы с митральными клетками в гломерулярном слое обонятельной луковицы (ОЛ).

Обонятельная информация первоначально представляется паттернами нейронной активности нейронов ольфакторного эпителия (ОЭ) – обширной и функционально разнообразной популяции возбудимых клеток с рецепторами запаховых стимулов на поверхности, которых у мышей около 1300 типов (Zhang, Firestein, 2002). В каждом нейроне ОЭ экспрессируется какой-то один тип ольфакторного рецептора (ОР). Нейроны с одинаковым типом ОР на поверхности, несмотря на то, что равномерно распределены по носовой полости, иннервируют одну и ту же гломерулу в ОЛ. Таким образом, сенсорные нейроны представляют обонятельную информацию в мозг в форме стимул-специфичных комбинаций входных сигналов к клубочкам ОЛ. Эти паттерны гломерулярного ввода служат основой для всей последующей обработки обонятельной информации (Carey et al., 2009).

Магнитно-резонансная томография (МРТ) включает в себя целый ряд методов, которые позволяют исследовать не только морфологию различных структур, но и динамику разных процессов. Один из функциональных методов на основе ядерного магнитного резонанса – марганец-усиленная МРТ (МУ МРТ). Ионы Mn^{2+} являются агонистами потенциал-зависимых кальциевых каналов и через них способны проникать внутрь клетки (Aoki et al., 2004). Благодаря этому свойству ионов марганца, возможно применять МУ МРТ для оценки функциональной активности нейронов, в частности ольфакторных (Pautler, Koretsky, 2002). Поскольку марганец является парамагнетиком, ионы марганца (II) способны сокращать время спин-решетчатой релаксации протонов в постоянном магнитном поле при воздействии радиочастотной последовательности (T1 релаксация), т. е. могут выступать в качестве позитивного МРТ-контраста. Поэтому с помощью МРТ можно оценивать накопление Mn^{2+} в исследуемой ткани. В первом приближении уровень активности клеток ткани в ответ на стимул будет прямо пропорционален уровню МРТ-сигнала, который зависит от уровня активности кальциевых каналов. Данный метод не требует использования наркоза и напрямую отражает активность Ca^{2+}-каналов. Кроме того, он позволяет *in vivo* оценивать скорость аксонального транспорта (Smith et al., 2007).

Таким образом, цель настоящей работы состояла в том, чтобы исследовать роль сенсорной пластичности в формировании ольфакторной памяти. Для этого *in situ* мы провели оценку влияния ассоциативного кондиционирования на функциональную активность нейронов ОЭ в ответ на условный запаховый стимул методом МУ МРТ.

Материалы и методы

Животные. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Эксперименты поставлены на самцах мышей SPF-статуса инбредной линии BALB/C в возрасте 8–10 нед. (25–28 г). После отсадки в трехнедельном возрасте и до исследований мышей содержали группами по пять особей одного пола в стандартных клетках (35 × 25 × 12 см) при температуре 22–24 °C и искусственном световом режиме 14С : 10Т. Брикетированный корм («Чара», Павловский Посад) и воду до начала обучения мыши получали *ad libitum*. В качестве подстилочного материала использовали обеспыленные древесные опилки. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с биоэтическими нормами (Протокол биоэтической комиссии № 16-02-020 от 15.08.2016).

Ольфакторное обучение проводили, используя в качестве индифферентного запахового стимула апельсиновое масло (1 % водный раствор). В процессе обучения животных содержали в условиях ограниченного доступа к корму. Предоставление гранул еды служило подкрепляющим стимулом. Исходная выборка была разделена на три группы: животные, у которых предоставление еды было совмещено с воздействием запаховым стимулом (стимул с кондиционированием, СК+, $n = 6$); животные, у которых предоставление еды и запахового стимула были разнесены на 30 мин во времени (стимул без кондиционирования, СК–, $n = 6$); контрольная группа, которым запаховый стимул не предъявлялся, как и в других группах, животные получали корм два раза в день (Контроль, $n = 6$). В процессе обучения клетку в течение 2 мин продували воздухом, содержащим запах апельсинового масла, по окончании чего животное получало гранулы корма. Обучение проводили 2 раза в сутки в течение

14 дней, при этом животных содержали индивидуально. Для подачи стимула использовали ольфактомер следующей конструкции: воздушный насос (Barbus SB-348A) с помощью силиконового шланга и пластикового носика на 1 мл соединялся с закрытой клеткой, в которой находилась тестируемая особь. В пластиковый носик, вставленный в отверстие для поилки в крышке клетки, помещали кусок фильтровальной бумаги (0.5 × 2 см), на которую наносили 20 мкл 1 % апельсинового масла. Во время предъявления запахового стимула носик от автопипетки продували воздухом со скоростью 200 мл/мин.

Ольфакторный тест. Поведенческое тестирование проводили через двое суток после МРТ-сканирования и наркотизации. На две противоположные стенки клетки, в которой содержалось животное, прикрепляли с помощью скотча два куска фильтровальной бумаги (2 × 2 см). Далее тестируемому животному давали свободно перемещаться по клетке в течение 5 мин, после чего, не вынимая мышь из клетки, на фильтровальную бумагу наносили 20 мкл раствора апельсинового масла или дистиллированной воды (рис. 1, *б*). Затем в течение 3 мин с помощью цифровой камеры регистрировали поведение животного. Для оценки поведенческого ответа животного на предоставляемые запаховые стимулы на полученных видеозаписях подсчитывали время обнюхивания каждого куска фильтровальной бумаги и время исследования кормушки. Обнюхиванием считалось вставание на задние лапки рядом с запаховым стимулом (см. рис. 1, *б*).

Марганец-усиленная МРТ. При исследовании активности нейронов ОЭ мышей в ответ на предъявление запахового стимула методом МУ МРТ критерием оценки выступал уровень МРТ-сигнала в гломерулярном слое основной ОЛ, который зависел от локальной концентрации марганца. Исходя из наших экспериментов и данных литературы, накопление ионов марганца (Mn^{2+}) в нейронах основной ОЛ высокодостоверно коррелирует с уровнем активности кальциевых каналов клеток обонятельного эпителия (Aoki et al., 2004). Локальную концентрацию Mn^{2+} в гломерулярном слое ОЛ выражали как отношение уровня МРТ-сигнала в исследуемых областях к уровню МРТ-сигнала в референсе, которым служила микропробирка с фосфатным буфером (0.5 мл), помещенная вдоль головы мыши. МРТ-сканирование проводили через 2 ч после предъявления запахового стимула.

Для оценки паттернов активации нейронов ОЭ в ответ на запаховый стимул, мышам интраназально вводили 10 мкл 10 мМ раствора хлорида марганца, после чего животное помещали обратно в клетку и давали запаховый стимул сериями по 4 мин (1 мин стимул ON + 3 мин стимул OFF). Каждый запах экспонировался 4 раза. Чтобы снизить концентрацию стимула и предотвратить сенситизацию нейронов ОЭ, между предоставлениями клетку, в которой животное содержалось не менее суток до начала эксперимента, продували чистым воздухом. При каждом предъявлении использовали новый кусок фильтровальной бумаги с нанесенным на него тестируемым веществом.

Накопление ионов марганца в ОЛ мыши было исследовано с помощью магнитно-резонансной томографии на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл.

За 3 мин до исследования мышей обездвиживали газовой смесью (4 %) изофлюрана (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) и воздуха при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Мальта). Температуру животных поддерживали с помощью водного контура в томографическом столике-кроватке, имевшем температуру поверхности 30 °C. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N.Y., США), что позволяло контролировать глубину наркоза.

Информация о распределении ионов марганца в пределах обонятельной луковицы мыши была получена с помощью T1-взвешенных изображений с использованием метода RARE (rapid acquisition with relaxation enhancement). Параметры импульсной последовательности метода: TE = 10 мс, TR = 400 мс. Параметры изображения: размер 1.8 × 1.8 см; матрица 256 × 256 точек; толщина среза 0.5 мм; размеры вокселя 75 μм × 75 μм × 0.5 мм; расстояние между срезами 0.5 мм; количество срезов 9; ориентация срезов коронарная. Общее время сканирования составляло 7 мин.

Предварительную обработку МРТ-сканов выполняли в программе ImageJ. Обработка состояла из нескольких этапов: выравнивание изображений по горизонтали, выделение границ мозга мыши, изменение размеров изображения. Выравнивание геометрии и размеров мозга позволило сравнить уровень МРТ-сигнала в отдельных областях основной ОЛ у разных особей. Для анализа полученных результатов глобулярный слой обонятельных луковиц на каждом срезе был условно разделен на 12 областей. Всего на ОЛ приходилось пять срезов. Таким образом, исходное разрешение МРТ-скана было уменьшено до 250 μм × 250 μм × 0.5 мм. В пределах этих 12 областей уровень МРТ-сигнала усреднялся, после чего проводили различные межгрупповые сравнения и, таким образом, оценивали изменения нейрональной активности в ответ на запаховый стимул. Далее для визуализации полученных результатов использовали двухмерную «карту» ольфакторной луковицы, где по оси абсцисс располагали номер области (1–12), а по оси ординат – номер среза (1–5), с помощью псевдоокрашивания кодировали значение *t*-критерия Стьюдента, характеризующего достоверность отличий двух групп по накоплению контраста в данной зоне ОЛ.

Статистика. Для оценки взаимосвязи двух паттернов активации ОЭ использовали непараметрический коэффициент корреляции Спирмана, для множественных сравнений средних – LSD-тест (Least Significant Difference). Данные выражали как среднее ± SE.

Результаты

Поведенческий ответ мышей на условный запаховый стимул

Для исследования роли сенсорной пластичности в реализации механизмов ольфакторной памяти мы на первом этапе провели оценку формирования поведенческой реакции на условный запаховый стимул в процессе обучения. Поскольку применяемая нами схема предполагала использование в качестве положительного подкрепления

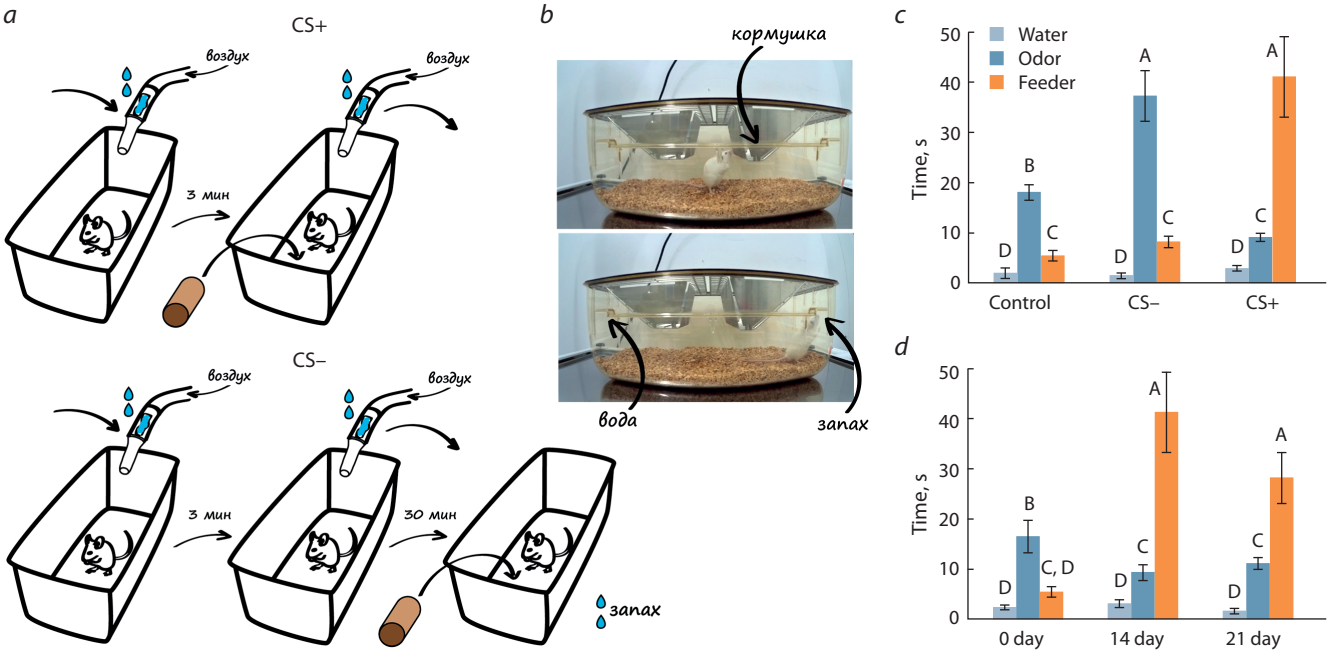


Fig. 1. The influence of associative learning on the behavioral response of mice to an indifferent olfactory stimulus.

(*a*) Training scheme: The conditional stimulus (CS+) was performed by blowing the cage housing the animal with air containing the stimulating olfactory agent (20 µL of 1 % orange oil applied to a piece of filter paper, air flux 250 mL/min) for 3 minutes. After the stimulus, food was presented. Conditioning without reinforcement (scheme below, CS–) was conducted basically as in the CS+ group, but food was presented 30 minutes after the end of the conditioning. (*b*) The olfactory test: top, the animal sniffs the above-mentioned source of the smell; bottom, the mouse examines the feeder. The stimulus was applied to the filter paper attached to the cage wall. On the opposite wall, a piece of filter paper of the same size with the solvent was attached. (*c*) The distribution of the time for sniffing filter paper with distilled water (white bars) and orange smell (gray bars) and the time of examination of the feeder (black bars) in animals of different groups, the CS+ group being examined on day 14 of training. (*d*) Dynamics of the behavioral response to the conditioned odor stimulus (smell of orange oil) of animals of the CS group. Parameters of the behavioral response of CS+ individuals before the start of the experiment (day 0) and after the end of training (days 14 and 21) are presented. *a–d* – significant differences by the LSD test ($p < 0.05$).

предоставление еды животным, содержащимся в условиях с ограниченным доступом к корму (см. рис. 1, *а*), то в качестве критериев поведенческого ответа на условный стимул мы рассматривали время обнюхивания особью источника запаха или фильтровальной бумаги с водой и время, проведенное ей рядом с кормушкой (см. рис. 1, *б*). Исходя из полученных результатов, только в группе СК+ через 14 дней после начала эксперимента наблюдалось достоверное увеличение времени исследования кормушки при предъявлении запаха апельсинового масла, при этом время обнюхивания источника стимула статистически значимо снижалось по сравнению как с мышами группы СК–, так и с контрольными животными (см. рис. 1, *в*). Этот эффект сохранялся по меньшей мере в течение недели после окончания обучения, что свидетельствует о стабильности сформированной поведенческой реакции на условный запаховый стимул (см. рис. 1, *г*). Мыши группы СК– достоверно больше времени тратили на обнюхивание запахового стимула в ольфакторном тесте по сравнению с особями контрольной и СК+ групп (см. рис. 1, *в*).

Исследование активности нейронов ольфакторного эпителия мышей в ответ на условный запаховый стимул

В настоящей работе для оценки изменения активности нейронов ОЭ была использована МУ МРТ. Данный метод позволяет оценить накопление в ткани ионов марганца, которые являются агонистами кальциевых каналов. Кроме того, показано, что перемещение марганца по внутриклеточному пространству происходит за счет аксонального транспорта, что позволяет исследовать данный процесс с помощью МУ МРТ (Smith et al., 2007). Таким образом, интенсивность и скорость накопления марганца в ткани дают возможность охарактеризовать различные аспекты нейрональной активности.

Процесс обработки получаемых T1-взвешенных МРТ-изображений схематично представлен на рис. 2, *а*. На каждом скане ОЛ условно выделены 12 зон, в пределах которых усредняли МРТ-сигнал, всего луковица была видна на пяти срезах. Таким образом, всю луковицу разделяли на 60 зон, по которым проводили межгрупповые сравнения, визуализировавшиеся в виде «тепловых» карт (рис. 2 и 3).

Исходя из полученных результатов, во всех трех исследуемых группах накопление марганца в глобулярном слое ОЛ мыши при предъявлении запаха апельсинового масла достоверно отличалось от распределения МРТ-сигнала в ОЛ без запаха, что свидетельствует о наличии реакции ОЭ животных на данный стимул (см. рис. 2, *б*, верхний ряд). При этом паттерны накопления Mn^{2+} в ОЛ в ответ на условный стимул высокодостоверно коррелировали во всех экспериментальных группах. Дальнейший анализ показал наличие достоверных отличий в зональном распределении МРТ-сигнала в ОЛ при межгрупповых сравнени-

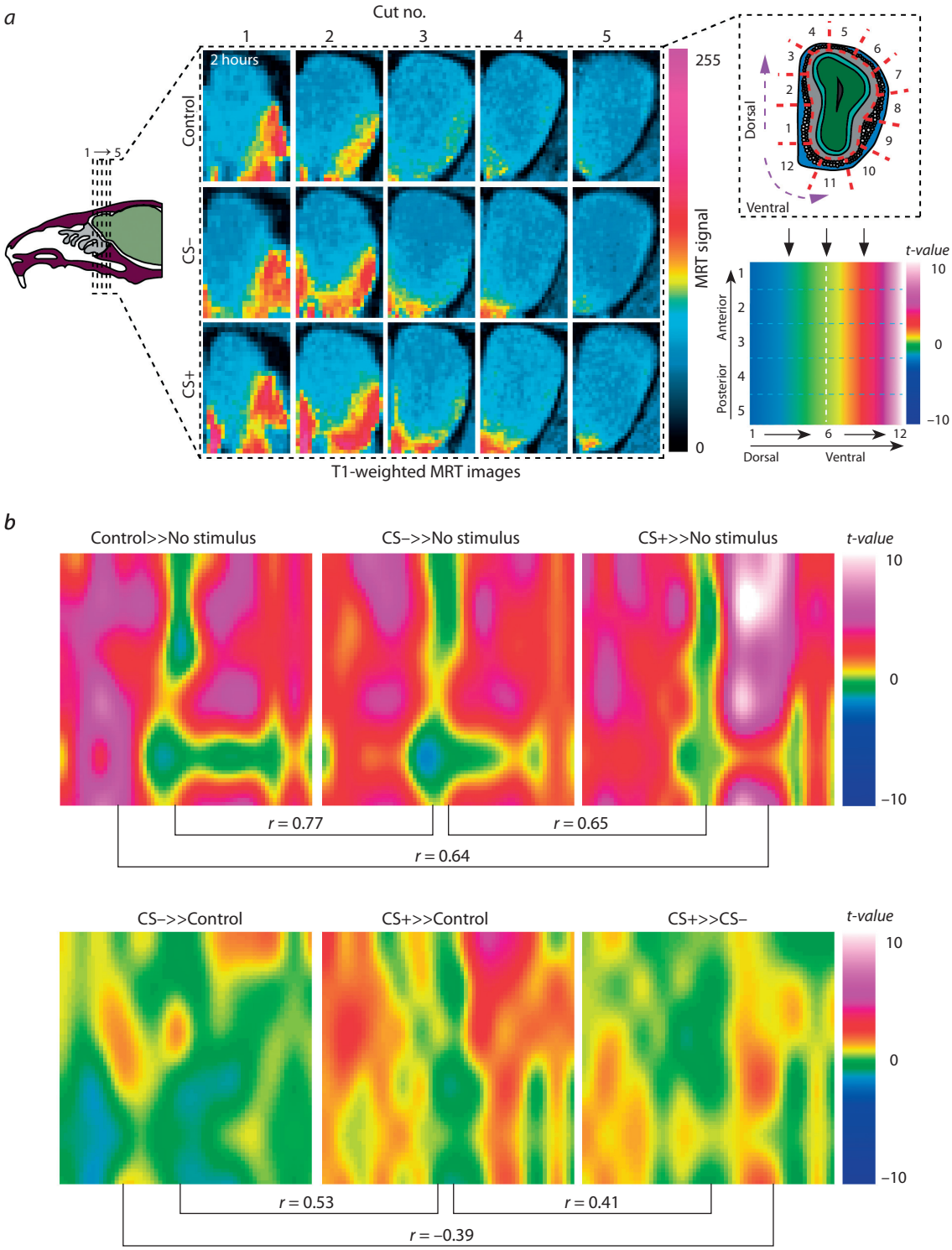


Fig. 2. The influence of associative learning on the patterns of accumulation of manganese ions in the olfactory bulbs (OBs) of mice in response to the smell of orange oil.

(*a*) Schematic processing of T1-weighted MRI scans and construction of thermal maps. Scans of mouse OBs of different experimental groups were made 2 hours after the presentation of orange oil and/or intranasal application of manganese chloride. The pseudo-coloring of T1-weighted scans shows the patterns and intensity of contrast agent accumulation in OBs of mice in response to the exposure of the orange oil odor. The red dashed line indicates the boundaries of each of the 12 zones of the globular layer in the cut. (*b*) Influence of conditioning on the patterns of accumulation of manganese ions in different zones of Balb/c male OBs in response to the smell of orange oil. Pseudo-coloring reflects the significance of the increase ($t > 0$) or the decrease ($t < 0$) of the MRI signal level in various compartments of an OB in response to the olfactory stimulus compared to the individuals administered manganese ions without odor stimulation (upper row). The bottom row presents the thermal maps obtained as a result of intergroup comparisons. The figure shows the correlation coefficients (r) of manganese distribution patterns in OBs. >> -*t*-test> 0 if the accumulation of the contrast agent in the given OB area in the group animals to the left of the sign was higher than that in the group on the right and *t*-test < 0 if otherwise.

ях. В группах СК+ и СК– достоверно большее количество марганца накапливалось в областях передней части ОЛ по сравнению с контролем. У животных группы СК+ по сравнению с контролем и СК– также достоверно возрастает уровень МРТ-сигнала в зонах задней части ОЛ (см. рис. 2, *б*, нижний ряд). Мыши группы СК– достоверно не отличаются от группы СК+ по уровню МРТ-сигнала в зонах передней части ОЛ и от контрольных животных по аккумуляции марганца в гломерулярном слое задней части ОЛ (см. рис. 2, *б*). Поэтому паттерны, полученные в результате межгрупповых сравнений СК–>>контроль и СК+>>СК–, находятся в обратной зависимости друг от друга (см. рис. 2).

Для интерпретации полученных результатов мы оценили распределение ионов марганца в ОЛ у контрольных животных, которым предоставляли запах апельсинового масла в 4 раза большей (АМ×4) и в 4 раза меньшей (АМ/4) концентрации относительно использованной при условном кондиционировании (см. рис. 3). Группы СК+ и АМ×4 достоверно не отличаются по распределению МРТ-сигнала в глобулярном слое ОЛ. Паттерны, полученные при сравнении групп СК+ и АМ×4 с группами СК– и АМ/4, высокодостоверно коррелируют друг с другом (см. рис. 3). При сравнении распределения контраста в ОЛ через 12 ч после экспозиции условного запаха и введения $MnCl_2$ достоверных различий между экспериментальными группами обнаружено не было (рис. 4).

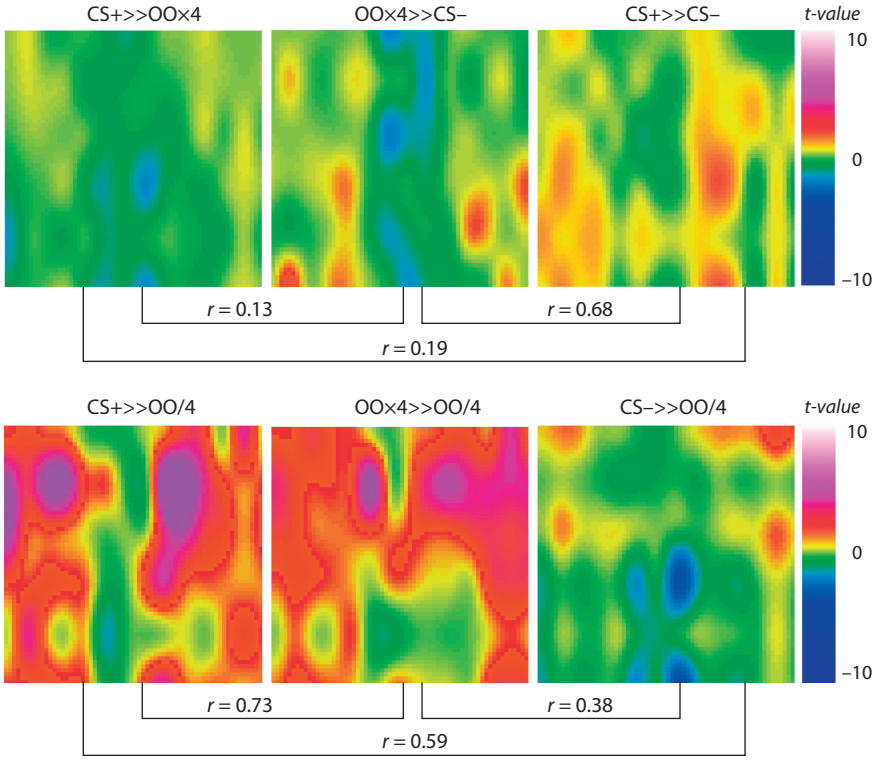


Fig. 3. Effect of the concentration of orange oil smell on manganese accumulation patterns in mouse OBs.

Pseudo-coloring on thermal maps reflects the significance of the increase ($t > 0$) or decrease ($t < 0$) of the intensity of contrast agent accumulation in various zones of the OB in response to the olfactory stimulus. We compared the contrast agent distribution patterns of conditioned (CS–, CS+) and naive animals, where the smell of orange oil (OO) was presented only once at concentrations 4 times larger (OO×4) or 4 times lower (OO/4) than that used in the conditioning process. The figure shows the correlation coefficients (r) of manganese distribution patterns in OBs. >> -t-test> 0 if the accumulation of manganese in the given OB area in the group animals to the left of the sign was higher than that in the group on the right and t-test < 0 if otherwise.

Обсуждение

Центральная нервная система способна быстро устанавливать связь между конкретными стимулами и последующими аверсивными и аттрактивными событиями. Считается, что обучение включает установление ассоциаций между нейтральными и эмоциональными стимулами в областях коры головного мозга и лимбической системы мозга. На сегодняшний день имеются свидетельства стимул-специфичных структурно-функциональных изменений уже на уровне сенсорных клеток в процессе ассоциативного обучения. В частности, в статье (Jones et al., 2008) показано, что после трех недель ассоциативного кондиционирования с использованием ацетофенона в качестве условного запахового стимула у мышей увеличивается количество нейронов в ОЭ, экспрессирующих рецептор M71, наиболее интенсивно реагирующий на ацетофенон. В работе (Kass et al., 2013) ассоциативное кондиционирование с помощью ацетофенона уже через три дня вызывало увеличение количества нейромедиатора, выделяемого обонятельными нейронами, экспрессирующими рецептор M71, в ответ на условный стимул. Наличие сенсорной пластичности было продемонстрировано и для рецепторных нейронов слуховой (Polley et al., 2004; Bieszczad, Weinberger, 2012; Zhang et al., 2013) и зрительной систем (Headley, Weinberger, 2013).

В нашем исследовании мы наблюдали изменение нейрональной активности обонятельных нейронов ОЭ в процессе ассоциативного ольфакторного обучения в ответ на индифферентный запаховый стимул. Как было показано в поведенческих экспериментах, использованная нами схема обучения приводила к формированию у мышей специфического поведенческого ответа на условный стимул. Далее с помощью МУ МРТ мы охарактеризовали параметры нейрональной активности у животных, подвергавшихся и не подвергавшихся ассоциативному кондиционированию. Обучение животных, содержащихся в условиях ограниченного доступа к пище, с использованием в качестве позитивного подкрепления предоставления корма, привело как к достоверному увеличению интенсивности, так и к изменению паттернов накопления марганца в глобулярном слое ОЛ по сравнению с контрольной группой и группой особей, которым стимул давали без подкрепления.

Ранее отмечалось также, что ассоциативное обучение увеличивает чувствительность особи к условному запаховому стимулу (McGann, 2015). Механизм этого феномена до сих пор до конца не ясен: увеличивается ли чувствительность ольфакторных нейронов (Kass et al., 2013), или возрастает их количество

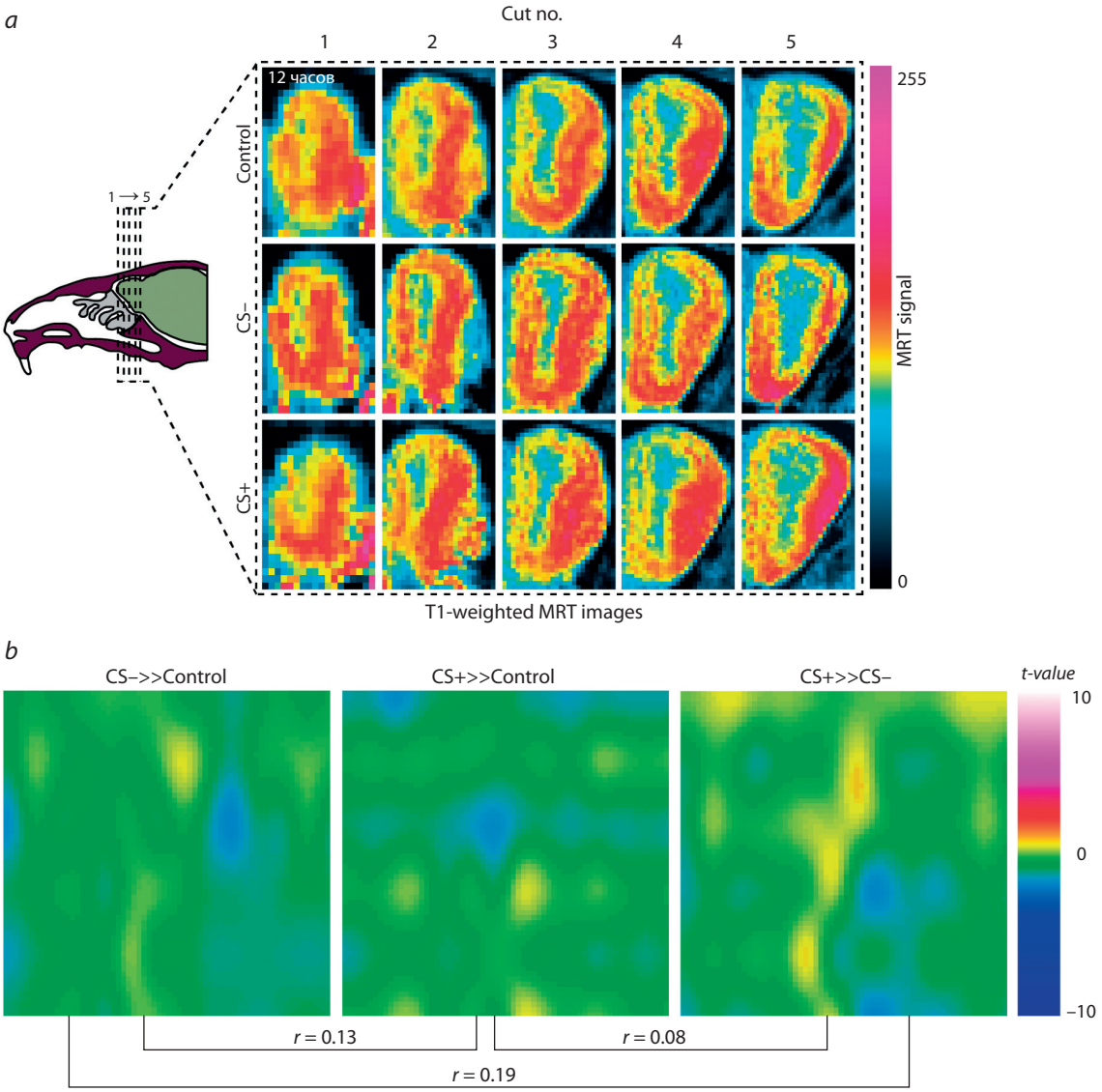


Fig. 4. Comparison of distribution patterns of manganese ions in a mouse OB 12 hours after exposure to the smell of orange oil.

(*a*) Examples of T1-weighted MRI sections of olfactory bulbs of mice from different experimental groups made 12 hours after the intranasal injection of manganese chloride and orange oil presentation. (*b*) Pseudo-coloring reflects the reliability of the increase ($t > 0$) or decrease ($t < 0$) of the intensity of contrast agent accumulation in various OB compartments in response to the olfactory stimulus. The figure shows the correlation coefficients (r) of manganese distribution patterns in OBs. >> - *t*-test > 0 if the accumulation of manganese in the given OB area in the group animals on the left of the sign was higher than that in the group on the right and t-test < 0 if otherwise.

(Jones et al., 2008). Если бы за счет нейрогенеза увеличилось количество обонятельных нейронов, реагирующих на условный стимул, возросло бы и максимальное накопление МРТ-сигнала (через 12 ч после введения (Aoki et al., 2004)) в специфических зонах ОЛ. В нашей работе мы показали, что достоверные различия в интенсивности накопления марганца в различных зонах ОЛ между обученными и контрольными животными наблюдаются через 2 ч (но не через 12 ч) после экспозиции стимула и введения контраста. Кроме того, отсутствие различий в активности ОЭ животных группы СК+ и контрольных особей, которым предъявляли запах апельсинового масла в большей относительно использованной при кондиционировании концентрации, свидетельствует об увеличении чувствительности нейронов ОЭ к индифферентному стимулу в процессе обучения.

Некоторые авторы сообщают, что кондиционирование с подкреплением увеличивает интенсивность электрической активности в ответ на индифферентный стимул по сравнению с контролем, что соотносится с полученными нами результатами (Kass et al., 2013; Abraham et al., 2014). Поскольку марганец является агонистом кальциевых каналов и проникает во внутриклеточное пространство при их активации, можно заключить, что их активность в ответ на предъявление условного стимула в процессе обучения не меняется. Изменяется при этом скорость транспорта контраста из носовой полости в ОЛ. Учитывая значимый вклад аксонального транспорта в процесс внутриклеточной логистики Mn^{2+} (Pautler, 2004; Smith et al., 2007), можно заключить, что ассоциативное обучение, в частности, приводит к интенсификации метаболизма в ответ на условный стимул. Это может быть обусловлено

выделением большего количества нейротрансмиттера, что подтверждается рядом исследований (Kass et al., 2013).

Итак, в данной работе нам удалось *in situ* продемонстрировать, что, во-первых, ассоциативное обучение стимул-специфично влияет на уровень нейрональной активности рецепторных клеток ОЭ, из чего следует, что формирование ольфакторной памяти начинается не с подкорковых структур ЦНС, а на этапе рецепции запахового стимула; а во-вторых, в процессе положительного пищевого кондиционирования возрастает чувствительность ОЭ в ответ на предоставление условного ольфакторного стимула, что говорит об увеличении адаптивной значимости данного запаха. Оба эти феномена являются частью приспособительной стратегии животного к изменяющимся условиям среды.

Acknowledgements

The work was supported by Government procurement IV.35.2.6 for the Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics, Novosibirsk, and the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-01440. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (ICG SB RAS) was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Abraham N.M., Vincis R., Lagier S., Rodriguez I., Carleton A. Long term functional plasticity of sensory inputs mediated by olfactory learning. Elife. 2014;(3):e02109. DOI 10.7554/eLife.02109.

Aoki I., Wu Y.J.L., Silva A.C., Lynch R.M., Koretsky A.P. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. Neuroimage. 2004;22(3):1046-1059. DOI 10.1016/j.neuroimage.2004.03.031.

Bieszczad K.M., Weinberger N.M. Extinction reveals that primary sensory cortex predicts reinforcement outcome. Eur. J. Neurosci. 2012; 35(4):598-613. DOI 10.1111/j.1460-9568.2011.07974.x.

Carey R.M., Verhagen J.V., Wesson D.W., Pírez N., Wachowiak M. Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. J. Neurophysiol. 2009;101(2):1073-1088. DOI 10.1152/jn.90902.2008.

Gao E., Suga N. Experience-dependent plasticity in the auditory cortex and the inferior colliculus of bats: role of the corticofugal system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000;97(14):8081-8086. DOI 10.1073/pnas.97.14.8081.

Getchell T.V. Functional properties of vertebrate olfactory receptor neurons. Physiol. Rev. 1986;66(3):772-818. DOI 10.1152/physrev.1986.66.3.772.

Headley D.B., Weinberger N.M. Relational associative learning induces cross-modal plasticity in early visual cortex. Cerebral Cortex. 2013;25(5):1306-1318. DOI 10.1093/cercor/bht325.

Jones S.V., Choi D.C., Davis M., Ressler K.J. Learning-dependent structural plasticity in the adult olfactory pathway. J. Neurosci. 2008; 28(49):13106-13111. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4465-08.2008.

Kass M.D., Rosenthal M.C., Pottackal J., McGann J.P. Fear learning enhances neural responses to threat-predictive sensory stimuli. Science. 2013;342(6164):1389-1392. DOI 10.1126/science.1244916.

McGann J.P. Associative learning and sensory neuroplasticity: how does it happen and what is it good for? Learn. Mem. 2015;22(11):567-576. DOI 10.1101/lm.039636.115.

Moulton D.G., Beidler L.M. Structure and function in the peripheral olfactory system. Physiol. Rev. 1967;47(1):1-52. DOI 10.1152/physrev.1967.47.1.1.

Pautler R.G. *In vivo*, trans-synaptic tract-tracing utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). NMR Biomed. 2004;17(8):595-601. DOI 10.1002/nbm.942.

Pautler R.G., Koretsky A.P. Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. Neuroimage. 2002;16(2):441-448.

Polley D.B., Heiser M.A., Blake D.T., Schreine C.E., Merzenich M.M. Associative learning shapes the neural code for stimulus magnitude in primary auditory cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004; 101(46):16351-16356. DOI 10.1073/pnas.0407586101.

Schwob J.E., Youngentob S.L., Mezza R.C. Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. J. Comp. Neurol. 1995;359(1):15-37. DOI 10.1002/cne.903590103.

Smith K.D.B., Kallhoff V., Zheng H., Pautler R.G. *In vivo* axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuroimage. 2007;35(4):1401-1408. DOI 10.1016/j.neuroimage.2007.01.046.

Weinberger N.M. Reconceptualizing the Primary Auditory Cortex: Learning, Memory and Specific Plasticity. In: Winer J.A., Schreiner C.E. (Eds.). The Auditory Cortex. N. Y.: Springer, 2011;465-491. DOI 10.1007/978-1-4419-0074-6_22.

Zhang X., Firestein S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. Nat. Neurosci. 2002;5(2):124-133. DOI 10.1038/nn800.

Zhang Y., Zhao Y., Zhu X., Sun X., Zhou X. Refining cortical representation of sound azimuths by auditory discrimination training. J. Neurosci. 2013;33(23):9693-9698. DOI 10.1523/JNEUROSCI.0158-13.2013.

ORCID ID

A.V. Romashchenko orcid.org/0000-0002-0674-0574

T.A. Zapara orcid.org/0000-0002-8144-9090

A.S. Ratushnyak orcid.org/0000-0001-5198-8926

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1078-1083
DOI 10.18699/VJ18.453

Роль гена *Kaiso* в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2

Е.А. Литвинова[1] ✉, К.М. Ачасова[1], М.А. Борисова[1], С.В. Женило[2], Е.Б. Прохорчук[2], Е.Н. Кожевникова[1]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт биоинженерии, Москва, Россия

Количество людей с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) в мире постоянно увеличивается. Важными в этиологии заболевания являются генетические, средовые и иммунологические факторы. Однако механизм развития заболевания и эффективные способы борьбы с ним до сих пор не найдены. Для решения этих проблем используют различные модели на животных. Самыми перспективными считаются трансгенные модели, у которых нарушена работа отдельных генов. Для изучения ВЗК в качестве одной из таких моделей используют мышей с нуль-мутацией гена *Muc2*, кодирующего белок Муцин-2, который участвует в формировании защитного муцинового слоя в тонкой и толстой кишке. В процессе развития ВЗК и связанных с ними онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта принимает участие ряд транскрипционных факторов, которые меняют профиль экспрессии генов кишки. Один из них – транскрипционный фактор Kaiso, содержащий домен «цинковые пальцы» и способный связываться с метилированной ДНК. В настоящей работе мы оценили роль белка Kaiso в развитии воспаления кишечника на примере экспериментальной модели мышей C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$. Нами было показано, что у мышей с нарушенной барьерной функцией кишечника при развитии процессов, схожих с ВЗК у людей, развиваются воспалительные реакции, такие как повышение уровня экспрессии генов *Il1*, *Tnf* и *Il17a*. Отсутствие транскрипционного фактора Kaiso у мышей с дефицитом Муцина-2 вызывает снижение уровня экспрессии только генов *Cox2* и *Tff3*. Возможно, снижение экспрессии гена, кодирующего циклооксигеназу-2, может приводить к уменьшению экспрессии антибактериального фактора Trefoil factor 3. Белок Kaiso на экспериментальной модели ВЗК не оказывал значимой роли в регуляции провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли и интерлейкинов 1 и 17.

Ключевые слова: мыши; кишечное воспаление; Муцин-2; ген *Kaiso*.

Role of the *Kaiso* gene in the development of inflammation in Mucin-2 deficient mice

E.A. Litvinova[1] ✉, K.M. Achasova[1], M.A. Borisova[1], S.V. Zhenilo[2], E.B. Prokhortchouk[2], E.N. Kozhevnikova[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", RAS, Institute of Bioengineering, Moscow, Russia

The number of people with inflammatory bowel disease (IBD) is constantly increasing worldwide. The main factors that have effects on the etiology of the disease are genetic, environmental and immunological. However, the mechanism of disease development and effective treatment of IBD have not yet been found. Animal models help address these problems. The most popular model is considered to be transgenic models in which individual genes are knocked out. One of such models for the study of IBD are mice with a null mutation of the *Muc2* gene encoding the Mucin-2 protein, which is involved in the formation of a protective mucin layer in the small and large intestine. Some of transcription factors that change the expression of intestinal genes are involved in the development of IBD and colorectal cancer. One of such transcription factors is "zinc finger" domain-containing protein Kaiso which is able to bind to methylated DNA. In this study, we assessed the role of Kaiso in the development of intestinal inflammation using the experimental model of C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$. We have shown that mice with impaired intestinal barrier function that develop processes similar to human IBD also develop inflammatory responses, such as increased expression of *Il1*, *Tnf* and *Il17a* genes. The deficiency of the Kaiso transcription factor in Mucin-2 knockout mice causes a decrease in the expression level of only the *Cox2* and *Tff3* genes. Perhaps a decline in the expression of the gene encoding cyclooxygenase-2 can lead to a decrease in the expression of the antibacterial factor Trefoil factor 3. However, in the experimental model of IBD, Kaiso protein did not play a significant role in the regulation of pro-inflammatory cytokines of tumor necrosis factor and interleukins 1 and 17.

Key words: mice, intestine inflammation, Mucin-2, *Kaiso* gene.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Литвинова Е.А., Ачасова К.М., Борисова М.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б., Кожевникова Е.Н. Роль гена *Kaiso* в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8): 1078-1083. DOI 10.18699/VJ18.453

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Litvinova E.A., Achasova K.M., Borisova M.A., Zhenilo S.V., Prokhortchouk E.B., Kozhevnikova E.N. Role of the *Kaiso* gene in the development of inflammation in Mucin-2 deficient mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1078-1083. DOI 10.18699/VJ18.453 (in Russian)

Received October 12, 2018
Revised October 26, 2018
Accepted October 28, 2018

✉ e-mail: litvinova@bionet.nsc.ru

Количество людей с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) в мире на протяжении многих лет постепенно увеличивается (Benchimol et al., 2011), это становится одной из наиболее серьезных проблем в современной медицине. На развитие ВЗК сопряженно оказывают эффект генетические, средовые и иммунологические факторы, но этиология и механизм развития этих заболеваний до конца не ясны. Это затрудняет эффективную профилактику и лечение ВЗК (Holleran et al., 2017). Молекулярно-генетические подходы дали возможность создавать трансгенных животных, у которых нарушена работа отдельных генов; для изучения механизма развития ВЗК используют такие модели. Одной из них являются мыши с нуль-мутацией гена *Muc2*, кодирующего белок Муцин-2, который участвует в формировании муцинового барьерного слоя в тонкой и толстой кишке ($Muc2^{-/-}$). Муцин-2 – основной протеогликан кишечника, дефицит которого вызывает развитие хронического кишечного воспаления, как правило, в сочетании с бактериальной инфекцией (Martens et al., 2009; Bergstrom et al., 2010; Morgan et al., 2012). В связи с этим мыши, у которых нарушена барьерная функция кишечника вследствие мутации $Muc2^{-/-}$, – хорошая экспериментальная модель для изучения воспаления и канцерогенеза толстой и прямой кишки. Так как *Helicobacter* spp. инициирует развитие воспаления у трансгенных животных (Foltz et al., 1998), то мы использовали животных с этой инфекцией.

Экспериментальные данные говорят о том, что у мышей и у людей при развитии злокачественных опухолей повышается экспрессия белка Kaiso в ядрах раковых клеток (Vermeulen et al., 2012; Wang et al., 2016). На модели мышей, полученных путем скрещивания трансгенных животных с мутацией в гене *Apc* ($Apc^{Min/+}$), склонных к спонтанному опухолеобразованию, с мышами, у которых увеличена экспрессия гена *Kaiso* в кишечнике ($Kaiso^{Tg/+}$), было показано большее количество полипов в стенке толстой кишки и сокращение продолжительности жизни животных (Parisi et al., 2015). Белок Kaiso содержит домен «цинковые пальцы», способен связываться с метилированной ДНК и репрессировать транскрипцию генов (Prokhortchouk at al., 2001; Lopes et al., 2008). Поскольку экспрессия *Kaiso* усиливает развитие опухоли и воспаления, мы предположили, что отсутствие этого белка может повлиять на развитие провоспалительных иммунных реакций в кишечнике мышей с дефицитом Муцина-2. Мы оценили экспрессию провоспалительных цитокинов и транскрипционных факторов, регулирующих их экспрессию, у мышей трех генотипов: C57BL/6 (контроль), C57BL/6$^{Muc2-/-}$ (модель ВЗК) и C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$ (тестовая группа для изучения роли Kaiso при моделировании ВЗК). Настоящее исследование позволит понять, как дефицит белка Kaiso может участвовать в развитии ВЗК на примере экспериментальной модели мышей C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$.

Материалы и методы

Исследование выполнено в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН на самках линий C57BL/6$^{Muc2-/-}$ и C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$ на генетическом фоне C57BL/6 в возрасте 12–14 нед. В качестве контроля использовали мышей линии C57BL/6. Животные с мутациями C57BL/6$^{Muc2-/-}$ и C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$ были получены в Университете Эдинбурга и переданы лабораторией геномики и эпигеномики позвоночных Центра биоинженерии РАН в Центр генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН. Животных содержали однополыми группами по четыре-пять особей в индивидуально вентилируемых клетках (Optimice, США) при искусственном световом режиме 14С:10Т, температуре 20–22 °С, влажности 40–50 % и давлении 38 Па. В качестве подстила использовали обеспыленную березовую стружку. Животным предоставляли стерильную деионизированную воду с добавлением минералов K^+ и Mg^{2+} («Северянка», г. Санкт-Петербург) и автоклавируемый корм Ssniff® R/M-H V1534-3 (Ssniff, Германия) *ad libitum*. Работу с животными выполняли согласно биоэтическим нормам Директивы Евросоюза (ECC Directive 86/609/EEC).

Мониторинг патогенов у мышей проводили по годовому списку, рекомендованному FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) в 2014 г., согласно международным требованиям к содержанию животных SPF-статуса (Mähler et al., 2014). У мышей C57BL/6 не было детектировано видоспецифических патогенов, указанных в годовом списке FELASA. Кроме *Helicobacter* spp., у C57BL/6$^{Muc2-/-}$ и C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$ других патогенов не обнаружено. Животные поступили в Центр генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН с *Helicobacter* spp. В связи с тем, что в этой работе не было предусмотрено специального заражения животных инфекцией *Helicobacter* spp., оценку базового уровня экспрессии интересующих нас генов выполнили на мышах линии C57BL/6 без инфекции.

Образцы восходящей толстой кишки мышей фиксировали в 10 % нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в парафин. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью ШИК-реакции (реакция Шифф-йодная кислота) (БиоВитрум, Россия) для изучения общей морфологии и выявления секрета бокаловидных клеток. Фотографии препаратов получали с использованием микроскопа DM 2500 (Leica) при увеличении в 400 раз.

Небольшой фрагмент ткани восходящего участка толстой кишки вырезали и замораживали в жидком азоте, хранили не более двух месяцев при –70 °С до момента анализа проб. Выделение РНК из ткани выполняли с помощью реагента TRI Reagent® (Molecular Research Center, США). Количество РНК определяли с помощью УФ-спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Далее РНК обрабатывали ДНКазой RNase-free DNase I (Thermo Scientific, США), согласно прилагаемой инструкции. РНК очищали с помощью гликогена (Thermo scientific, США) и выполняли синтез кДНК ферментом обратной транскриптазой M-MuLV (SibEnzyme, Россия).

Уровень экспрессии генов, вовлеченных в провоспалительный ответ (*Il1b*, *Tnf* и *Il17a*), запуск воспалительной реакции (*Cox2* и *Nos2*), ответ на бактериальные сигналы (*Tff3*), активацию клеток Т-хелпер 17-го типа (*Il6* и *Tgfb1*), а также транскрипционных факторов (*Rorc* и *Tbx21*) определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Реакцию выполняли с по-

Sequences of oligonucleotide primers for real-time PCR

Gene	Primer	Nucleotide sequence, 5′-3′
Tubb	βtub-F	TGAAGCCACAGGTGGCAAGTAT
	βtub-R	CCAGACTGACCGAAAACGAAGT
Tff3	TFF3-F	TAATGCTGTTGGTGGTCCTG
	TFF3-R	CAGCCACGGTTGTTACACTG
Rorc	RORγt-F	TGGGCTCCAAGAGAAGAGGA
	RORγt-R	CAGGCTCCGGAGTTTTCCTT
Tbx21	Tbet-F	CCAGGGAACCGCTTATATG
	Tbet-R	CGATCATCTGGGTCACATTGT
Tnf	TNFα-F	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	TNFα-R	GGCACCACTAGTTGGTTGTCTTT
Il1b	IL1β-F	TGAAGTTGACGGACCCCAAA
	IL1β-R	TGATGTGCTGCTGCGAGATT
Il6	IL6-F	GCTACCAAACTGGATATAATCAGGA
	IL6-R	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
Il17a	IL17α-F	TCAAAGCTCAGCGTGTCCAA
	IL17α-R	GGGTCTTCATTGCGGTGGA
Tgfb1	TGFβ-F	TGACGTCACTGGAGTTGTAC
	TGFβ-R	AAGAGCAGTGAGCGCTGAAT
Nos2	NOS2-F	CAGGGTCACAACTTTACAGGGA
	NOS2-R	CACTTCTGCTCCAAATCCAACG
Cox2	COX2-F	CCAGCACTTCACCCATCAGT
	COX2-R	ACCCAGGTCCTCGCTTATGA

Notes: F, forward primer; R, reverse primer.

мощью премикса BioMaster HS-qPCR SYBR Blue, кДНК и 250 nM специфических праймеров (таблица). Все последовательности праймеров подбирали при помощи базы данных BLAST и программы Unipro UGENE. Детекцию осуществляли в амплификаторе CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США). ДНК денатурировали 5 мин при 95 °C, затем проводили 45 циклов: денатурация – 95 °C 15 с, отжиг праймерных олигонуклеотидов – 62 °C 25 с, синтез – 62 °C 25 с. Анализ в каждом образце для каждого гена делали в трех технических повторах. Экспрессию генов определяли по уровню кДНК, синтезированной с матрицы мРНК целевого гена, нормализованного на кДНК гена *Tubb* (β-tubulin) по формуле: ΔCt = 2^(Ct мРНК *Tubb* – – Ct мРНК интересующего гена), где (Ct) – номер цикла, соответствующий экспоненциальной фазе ПЦР-реакций.

Статистическую обработку данных производили при помощи пакета программного обеспечения STATISTICA6.1. Для выборок ΔCt экспрессии генов, не описывающихся нормальным распределением, использовали ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, а для межгруппового сравнения – критерий Манна–Уитни или при наличии значений ниже уровня детекции – тест χ^2. Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

На гистологических срезах толстого кишечника у мышей C57BL/6$^{Muc2-/-}$ и C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$ в бокаловидных клетках не наблюдается ШИК-позитивного содержимого (гликопротеинов) (рис. 1). Однако бокаловидные клетки производят не только муцины, но и другие защитные антибактериальные факторы (Kopp et al., 2015). Одним из таких белков, который вместе с Муцином-2 коэкспрессируют бокаловидные клетки в ответ на бактериальные сигналы, является Trefoil factor 3 (Tff3) (Podolsky et al., 1993; Taupin et al., 2003). Нами показано, что различия количества мРНК гена *Tff3* между тремя протестированными генотипами были статистически значимыми $H(2.21) = 13.72$, $p = 0.001$. Уровень мРНК *Tff3* был достоверно выше у мышей при отсутствии Муцина-2. Дефицит транскрипционного фактора Kaiso у мышей линии C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$ приводил к снижению уровня мРНК гена *Tff3*, но не восстанавливал его до уровня, наблюдаемого у животных дикого типа (рис. 2). Можно предположить, что у мышей C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$ снижается уровень сигнала, вызывающий наработку Trefoil factor 3 бокаловидными клетками, а это может быть связано с развитием противовоспалительного ответа (Shi et al., 2014).

Ранее было показано, что у мышей C57BL/6$^{Muc2-/-}$ без инфекции уже в возрасте 14 дней начинается острая воспалительная реакция кишечника, которая к четырехнедельному возрасту переходит в хроническую форму с характерными признаками ВЗК: удлинение крипт нисходящей кишки и снижение массы тела. Количество воспалительных цитокинов у таких мышей снижается, но остается на более высоком уровне, чем у мышей дикого типа (Burger-van Paassen et al., 2011). Эти исследования были выполнены на мышах без инфекции *Helicobacter* spp. В нашей работе мы использовали мышей, рожденных с инфекцией *Helicobacter* spp., так как известно, что бактериальная инфекция инициирует развитие воспаления у трансгенных животных (Foltz et al., 1998). По нашим данным, различия количества мРНК генов провоспалительных цитокинов *Il1b* и *Tnf* между тремя генотипами были статистически достоверными: $H(2.20) = 6.32$, $p = 0.04$ и $H(2.20) = 10.39$, $p = 0.006$ соответственно. Экспрессия *Il1b* и *Tnf* в кишке была выше у мышей C57BL/6$^{Muc2-/-}$ по сравнению с диким типом. Однако нуль-мутация гена *Kaiso* не приводила к изменению уровня экспрессии этих генов у мышей с дефицитом Муцина-2 (см. рис. 2). Экспрессия гена провоспалительного цитокина *Il17a*, который нарабатывают клетки Т-хелпер 17-го типа, у мышей дикого типа не детектировалась. У мышей C57BL/6$^{Muc2-/-}$ и C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$ экспрессия гена *Il17a* в кишке была значительно выше (6 из 10 и 5 из 7 соответственно), чем у мышей дикого типа (0 из 5) (см. рис. 2). Таким образом, нокаут гена *Kaiso* не оказывал значимого эффекта на уровень мРНК провоспалительных цитокинов.

Провоспалительные цитокины в местах воспаления запускают экспрессию сопряженных генов, таких как *Cox2* и *Nos2* (циклооксигеназа-2 и индуцируемая синтаза оксида азота), в дендритных клетках и макрофагах

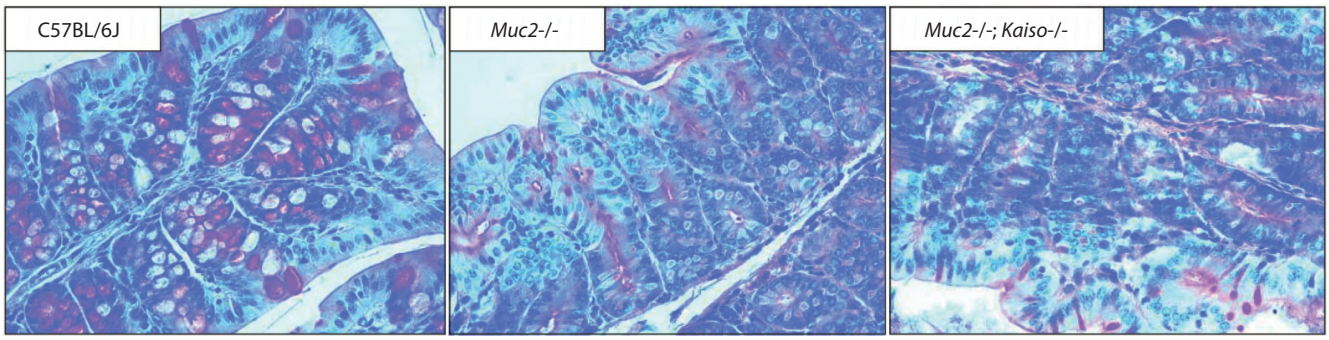


Fig. 1. The ascending colon of mouse strains C57BL/6, C57BL/6$^{Muc2-/-}$ и C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$.
Periodic acid–Schiff stain, magnification ×400.

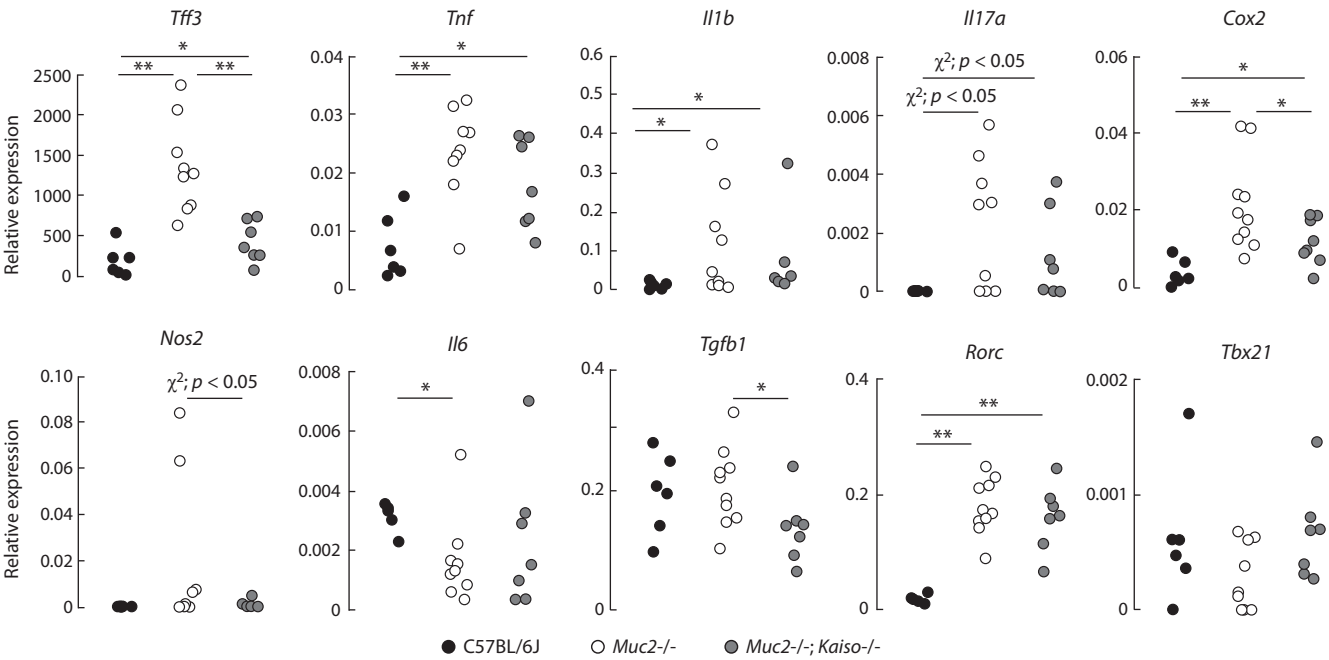


Fig. 2. mRNA levels of the genes *Tff3* (Trefoli factor 3), *Tnf* (TNFα), *Il1b* (IL-1β), *Il17a* (IL-17α), *Cox2* (COX2), *Nos2* (NOS2), *Il6* (IL-6), *Tgfb* (TGFβ), *Rorc* (RORγt), and *Tbx21* (T-bet) in the colon tissues of mice of three genotypes: C57BL/6J (black dots), C57BL/6$^{Muc2-/-}$ (Muc2-/-, white dots), and C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$ (Muc2-/-/Kaiso-/-, gray dots) normalized to the *Tubb* gene (β-tubulin).
* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$, Mann–Whitney test.

(Guihot et al., 2000; Wang, Dubois, 2010). Было показано, что повышение уровня циклооксигеназы-2 и индуцируемой синтазы оксида азота наблюдается у больных ВЗК и в экспериментальных моделях ВЗК (Singer et al., 1998; Shattuck-Brandt et al., 2000; Cross, Wilson, 2003). Наши данные показали, что разница уровня мРНК гена *Cox2* между тремя генотипами имела статистически значимый эффект $H(2,20) = 12.45$, $p = 0.002$. Животные с дефицитом Муцина-2 имеют более высокий уровень мРНК генов *Cox2* по сравнению с диким типом. У мышей с двойным нокаутом C57BL/6$^{Muc2-/-Kaiso-/-}$ экспрессия циклооксигеназы-2 была достоверно ниже, чем у C57BL/6$^{Muc2-/-}$ (см. рис. 2). Таким образом, можно предположить, что отсутствие экспрессии гена *Kaiso* может оказывать эффект на уровень циклооксигеназы-2. Экспрессия *Nos2* не детектировалась у мышей дикого типа. Дефицит Муцина-2 приводил к активации гена *Nos2* у 6 из 10 животных, что было достоверным изменением по сравнению с диким типом ($\chi^2 = 4.2$, $p = 0.04$). Нуль-мутация гена *Kaiso* отменяла этот эффект на экспрессию мРНК *Nos2* гена (2 из 8) по сравнению с мышами C57BL/6$^{Muc2-/-}$ (6 из 10), но эти изменения не были достоверными. Таким образом, ген *Kaiso* влиял только на экспрессию *Cox2*.

Развитие хронического воспаления у мышей с нарушенной барьерной функцией кишечника запускается вслед за острой воспалительной реакцией и начинается с формирования толерантности иммунной системы к постоянному давлению со стороны бактериальных антигенов. У людей, страдающих ВЗК, активируются клетки Т-хелпер 17-го типа, которые ингибируют воспалительные реакции клеток Т-хелпер 1-го типа (Strober et al., 2010). Дифференцировка клеток Т-хелпер 0 в Т-хелпер

17-го типа происходит под действием иммунных факторов IL-6 и TGFβ, которые нарабатывают дендритные клетки в ответ на бактериальные антигены (O'Connor et al., 2009). Ранее было показано, что мыши с нокаутом гена *Il17a* развивают более сильное воспаление при экспериментальном моделировании ВЗК (Yang et al., 2008). Нами было отмечено, что уровень экспрессии гена *Il17a* был выше у мышей с дефицитом Муцина-2, а дефицит Kaiso вызывал снижение экспрессии этого гена, но не достоверно. Мы предположили, что Kaiso может влиять на экспрессию генов *Il6* и *Tgfb1*, которые вовлечены в дифференцировку клеток Т-хелпер 17-го типа. Разница экспрессии мРНК гена *Tgfb1* между тремя генотипами была достоверной $H(2.20) = 7.17$, $p = 0.03$. Уровень мРНК гена *Tgfb1* был ниже у C57BL/6$^{Muc2\text{-}/\text{-}Kaiso\text{-}/\text{-}}$ по сравнению с C57BL/6$^{Muc2\text{-}/\text{-}}$. Животные дикого типа и C57BL/6$^{Muc2\text{-}/\text{-}}$ не отличались друг от друга по уровню экспрессии этого гена (см. рис. 2). Несмотря на отсутствие эффекта генотипа на экспрессию *Il6* гена, уровень мРНК этого гена был ниже у C57BL/6$^{Muc2\text{-}/\text{-}}$ по сравнению с диким типом, а дефицит Kaiso нивелировал эти различия. Таким образом, белок Kaiso принимает участие в регуляции экспрессии генов *Il6* и *Tgfb1*. Мы предполагаем, что поскольку экспрессия этих генов в дендритных клетках начинается в ответ на бактериальный антиген, а этот процесс запускается на более ранних сроках у мышей с хронической моделью ВЗК, то наблюдаются несколько ослабленные эффекты дефицита белка Kaiso на уровень мРНК генов *Il6* и *Tgfb1*.

Далее мы измерили экспрессию транскрипционных факторов RORγt и T-bet, участвующих в дифференцировке клеток Т-хелпер по 17-му и 1-му типам. Известно, что активация одного типа Т-хелпер клеток ингибирует дифференцировку другого типа, это регулируют различные транскрипционные факторы (Caprioli et al., 2008). Мы обнаружили, что только уровень экспрессии гена *Rorc* (RORγt) был выше у мышей с нарушением синтеза Муцина-2. Белок Kaiso не влиял на экспрессию этого гена (см. рис. 2). мРНК гена *Tbx21* (T-bet) не отличалась у мышей всех трех генотипов.

Таким образом, у мышей с нарушенной барьерной функцией кишечника в патологический процесс вовлекаются провоспалительные цитокины, вызывающие активацию клеток Т-хелпер 17-го типа, которая регулируется транскрипционным фактором RORγt. Дефицит белка Kaiso у животных-моделей ВЗК не оказывает значимого эффекта на экспрессию генов провоспалительных цитокинов и транскрипционных факторов, участвующих в их регулировании. Недостаток белка Kaiso снизил экспрессию генов циклооксигеназы-2 и антибактериального фактора Trefoil factor 3, которая повышалась у животных при дефиците Муцина-2.

Acknowledgments

The raise of knockout animals was supported by State Budgeted Project of the Institute of Bioengineering 01201371085. Experiments were supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016. The acquisition of reagents was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 18-015-00329. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (ICG SB RAS) was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Benchimol E.I., Fortinsky K.J., Gozdyra P., Van den Heuvel M., Van Limbergen J., Griffiths A.M. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: A systematic review of international trends. Inflamm. Bowel Dis. 2011;17(1):423-439. DOI 10.1002/ibd.21349.

Bergstrom K.S.B., Kissoon-Singh V., Gibson D.L., Ma C., Montero M., Sham H.P., Vallance B.A. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. PLoS Pathog. 2010;6(5):e1000902. DOI 10.1371/journal.ppat.1000902.

Burger-van Paassen N., van der Sluis M., Bouma J., Korteland-van Male A.M., Lu P., Van Seuningen I., Boehm G., van Goudoever J.B., Renes I.B. Colitis development during the suckling-weaning transition in mucin Muc2-deficient mice. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2011;301(4):G667-G678. DOI 10.1152/ajpgi.00199.2010.

Caprioli F., Marafini I., Facciotti F., Pallone F., Monteleone G. Th17 immune response in IBD: A new pathogenic mechanism. J. Crohns Colitis. 2008;2(4):291-295. DOI 10.1016/j.crohns.2008.05.004.

Cross R.K., Wilson K.T. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. Inflamm. Bowel Dis. 2003;9(3):179-189. DOI 10.1097/00054725-200305000-00006.

Foltz C.J., Fox J.G., Cahill R., Murphy J.C., Yan L., Shames B., Schauer D.B. Spontaneous inflammatory bowel disease in multiple mutant mouse lines: association with colonization by *Helicobacter hepaticus*. Helicobacter. 1998;3(2):69-78.

Guihot G., Guimbaud R., Bertrand V., Narcy-Lambare B., Couturier D., Duée P.H., Chaussade S., Blachier F. Inducible nitric oxide synthase activity in colon biopsies from inflammatory areas: correlation with inflammation intensity in patients with ulcerative colitis but not with Crohn's disease. Amino Acids. 2000;18(3):229-237.

Holleran G., Lopetuso L., Petito V., Graziani C., Ianiro G., McNamara D., Gasbarrini A., Scaldaferri F. The innate and adaptive immune system as targets for biologic therapies in inflammatory bowel disease. Int. J. Mol. Sci. 2017;18(10):E2020. DOI 10.3390/ijms 18102020.

Kopp Z.A., Jain U., Limbergen J.V., Stadnyk A.W. Do antimicrobial peptides and complement collaborate in the intestinal mucosa? Front. Immunol. 2015;6:17. DOI 10.3389/fimmu.2015.00017.

Lopes E.C., Valls E., Figueroa M.E., Mazur A., Meng F.G., Chiosis G., Laird P.W., Schreiber-Agus N., Greally J.M., Prokhortchouk E., Melnick A. Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. Cancer Res. 2008;68(18):7258-7263. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-0344.

Mähler (Convenor) M., Berard M., Feinstein R., Gallagher A., Illgen-Wilcke B., Pritchett-Corning K., Raspa M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit colonies in breeding and experimental units. Lab. Anim. 2014;48:178-192. DOI 10.1177/0023677213516312.

Martens E.C., Koropatkin N.M., Smith T.J., Gordon J.I. Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: The bacteroidetes Sus-like paradigm. J. Biol. Chem. 2009;284(37):24673-24677. DOI 10.1074/jbc.R109.022848.

Morgan X.C., Tickle T.L., Sokol H., Gevers D., Devaney K.L., Ward D.V., Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. Genome Biol. 2012;13(9):R79. DOI 10.1186/gb-2012-13-9-r79.

O'Connor W., Kamanaka M., Booth C.J., Town T., Nakae S., Iwakura Y., Kolls J.K., Flavell R.A. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. Nat. Immunol. 2009;10:603-610. DOI 10.1038/ni.1736.

Parisi A., Lacour F., Giordani L., Colnot S., Maire P., Le Grand F. APC is required for muscle stem cell proliferation and skeletal muscle tissue repair. J. Cell Biol. 2015;210(5):717-726. DOI 10.1083/jcb.201501053.

Podolsky D.K., Lynch-Devaney K., Stow J.L., Oates P., Murgue B., DeBeaumont M., Sands B.E., Mahida Y.R. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. J. Biol. Chem. 1993;268(9):6694-6702.

Prokhortchouk A., Hendrich B., Jørgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhortchouk E. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. Genes Dev. 2001;15(13):1613-1618. DOI 10.1101/gad.198501.

Shattuck-Brandt R.L., Varilek G.W., Radhika A., Yang F., Washington M.K., Dubois R.N. Cyclooxygenase-2 expression is increased in the subepithelial myofibroblasts of colon and cecal carcinomas from IL-10 (−/−) mice. Gastroenterology. 2000;118:337-345.

Shi L., Zhou P.-H., Xi J.-L., Yu H.-G., Zhang B-H. Recombinant human Trefoil factor 3 ameliorates bowel injury: its anti-inflammatory effect on experimental necrotizing enterocolitis. Int. J. Pept. 2014; 2014:634135. DOI 10.1155/2014/634135.

Singer I.I., Kawka D.W., Schloemann S., Tessner T., Riehl T., Stenson W.F. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 1998;115:297-306.

Strober W., Zhang F., Kitani A., Fuss I., Fichtner-Feigl S. Proinflammatory cytokines underlying the inflammation of Crohn's disease. Curr. Opin. Gastroenterol. 2010;26(4):310-317. DOI 10.1097/MOG.0b013e328339d099.

Taupin D., Podolsky D.K. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003;4(9):721-732. DOI 10.1038/nrm1203.

Vermeulen J.F., van de Ven R.A., Ercan C., van der Groep P., van der Wall E., Bult P., Christgen M., Lehmann U., Daniel J., van Diest P.J., Derksen P.W.B. Nuclear Kaiso expression is associated with high grade and triple-negative invasive breast cancer. PLoS One. 2012;7:e37864. DOI 10.1371/journal.pone.0037864.

Wang D., Dubois R.N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. Oncogene. 2010;29(6):781-788. DOI 10.1038/onc.2009.421.

Wang H., Liu W., Black S., Turner O., Daniel J.M., Dean-Colomb W., He Q.P., Davis M., Yates C. Kaiso, a transcriptional repressor, promotes cell migration and invasion of prostate cancer cells through regulation of miR-31 expression. Oncotarget. 2016;7(5):5677-5689. DOI 10.18632/oncotarget.6801.

Yang X.O., Chang S.H., Park H., Nurieva R., Shah B., Acero L., Wang Y.H., Schluns K.S., Broaddus R.R., Zhu Zh., Dong Ch. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. J. Exp. Med. 2008; 205(5):1063-1075. DOI 10.1084/jem.20071978.

ORCID ID

E.A. Litvinova orcid.org/0000-0001-6398-7154

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1084-1089
DOI 10.18699/VJ18.454

Влияние физической активности на структурную асимметрию гиппокампа мыши

Т.А. Запара[1] ✉, А.В. Ромащенко[1, 2], А.Л. Проскура[1], А.С. Ратушняк[1]

[1] Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Актуальность исследований взрослого нейрогенеза очевидна в связи с потенциальной возможностью использования новых нейронов для замещения нейронов, утраченных в процессе жизни. Несмотря на значительные усилия, мало что известно о конечной судьбе этих клеток, функциональной значимости их связей и регуляции их развития. Физическая активность значительно повышает в зубчатой извилине гиппокампа количество делящихся прогениторов, которые далее преобразуются в новые нейроны. Существующие иммуногистохимические методы маркировки новых нейронов не позволяют проследить временную динамику изменений объемов структур мозга у одного и того же животного, индуцированных внешними воздействиями, такими как добровольные физические нагрузки. Это делает актуальной задачу разработки и совершенствования методов долговременного контроля изменений, которые происходят во взрослом гиппокампе вследствие индукции нейрогенеза. Основной целью настоящей работы было с помощью магнитно-резонансной томографии на сверхвысокопольном томографе неинвазивно проследить временную динамику изменений объемов гиппокампа у одних и тех же животных, имевших добровольные физические нагрузки, которые, как известно, инициируют нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа. Обнаружено, что добровольные физические нагрузки не изменяли общий объем гиппокампа мыши. Однако разница в соотношении объемов между правой и левой частями гиппокампа была достоверно ниже по сравнению с контрольной группой. Проведены реконструкция и анализ белок-белковых взаимодействий, которые обеспечивают выживание большего количества новых нейронов и их интеграцию в существующие нейрональные сети в гиппокампе. Предложенный подход позволяет неинвазивно регистрировать изменения, в том числе лево-правую асимметрию по соотношению объемов этих парных структур мозга.

Ключевые слова: магнитно-резонансная томография; взрослый нейрогенез; структурная асимметрия мозга.

Effect of physical activity on structural asymmetry of mouse hippocampus

T.A. Zapara[1] ✉, A.V. Romashchenko[1, 2], A.L. Proskura[1], A.S. Ratushnyak[1]

[1] The Institute of Computational Technologies, SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

The relevance of studies of adult neurogenesis is evident in connection with the potential use of these new neurons to replace neurons lost in the process of life. Despite considerable efforts, little is known about the final fate of these cells, the functional significance of their connections and the regulation of their development. It is known that physical activity significantly increases the number of fissile progenitors, the precursors of new neurons in the dentate gyrus of the hippocampus. The existing immunohistochemical methods for labeling new neurons do not allow tracing the temporal dynamics of changes in the volume of brain structures in the same animal, induced by external impacts, such as voluntary exercise. This makes it an urgent task to develop and improve methods for long-term control of changes that occur in the adult hippocampus due to the induction of neurogenesis. The main purpose of this work was to non-invasively track, by using magnetic resonance imaging (MRI), the temporal dynamics of changes in the volume of the hippocampus in the same animals that had voluntary physical activity. It was found that voluntary exercise did not change the total volume of the mouse hippocampus. However, the difference in the volume ratio between the right and left parts of the hippocampus was significantly lower compared with the control group. The reconstruction and analysis of protein-protein interactions that ensure the survival of a large number of new neurons and their integration into existing neural networks in the hippocampus have been carried out. The proposed approach allows the non-invasive registration of changes in the ratio of the volumes of these paired brain structures.

Key words: magnetic resonance imaging; adult neurogenesis; structural asymmetry of the brain.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Запара Т.А., Ромащенко А.В., Проскура А.Л., Ратушняк А.С. Влияние физической активности на структурную асимметрию гиппокампа мыши. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1084-1089. DOI 10.18699/VJ18.454

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Zapara T.A., Romashchenko A.V., Proskura A.L., Ratushnyak A.S. Effect of physical activity on structural asymmetry of mouse hippocampus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1084-1089. DOI 10.18699/VJ18.454 (in Russian)

Received August 31, 2018
Revised October 24, 2018
Accepted November 6, 2018

✉ e-mail: Zapara_t@mail.ru

Возрастающее количество патологий мозга, вызванных травмами, ишемическими повреждениями клеток при инсультах, возрастными нейродегенеративными нарушениями мозгового кровообращения, повышенными нагрузками и экологическими факторами, делает чрезвычайно актуальной проблему поиска методов и средств прогностики, нейропротекции, коррекции возникающих структурно-функциональных нарушений.

Одним из многообещающих способов коррекции представляется индукция нейрогенеза во взрослом мозге. Гиппокамп вовлечен в процессы хранения информации и реализацию когнитивных функций мозга, и новые нейроны во взрослом мозге играют существенную роль в этих процессах (Deng et al., 2009; Akers et al., 2014). Более того, с возрастом, как и при ряде нейродегенеративных патологий, наблюдается уменьшение объемов данной структуры, а физическая активность способна замедлить этот процесс.

Физическая активность приводит к выбросу целого ряда активных веществ, которые регулируют и модулируют различные физиологические процессы, в том числе в мозге (Schnyder, Handschin, 2015). Именно поэтому основное внимание мы сосредоточили на исследовании процесса нейрогенеза в гиппокампе у животных после добровольных физических нагрузок (бег в колесе, к которому имелся свободный доступ).

Тонкая пластинка между гиппокампальным хилусом и слоем гранулярных клеток или субгранулярной зоной – область активной пролиферации во взрослом гиппокампе, которая генерирует новые нейроны в течение всей взрослой жизни (Muramatsu et al., 2007). Нейрогенез протекает в ангиогенной нише и тесно связан с процессом активного сосудистого рекрутинга и последующим ремоделированием локальной сосудистой сети. Эта среда может обеспечить новый интерфейс, в котором клетки, полученные из мезенхимы, и циркулирующие факторы влияют на пластичность во взрослой центральной нервной системе (Palmer et al., 2000; Seri et al., 2004).

Физическая активность значительно повышает в субгранулярной зоне количество прогениторов с высокой пролиферативной активностью, которые далее активно преобразуются в новые нейроны (Kronenberg et al., 2003). При этом установлено, что значительная часть вновь сформированных во взрослом гиппокампе нейронов гибнет (Dayer et al., 2003). Вследствие этого исследование регулирования процессов выживания новых нейронов и их встраивание в функциональные сети во взрослом мозге – высоко актуальная задача.

Существующие иммуногистохимические методы маркировки прогениторов (Fukuda et al., 2003; Kronenberg et al., 2003) не позволяют проследить динамику их встраивания в существующие нейронные ансамбли. Поэтому, несмотря на значительные усилия, мало известно о конечной судьбе этих клеток, функциональной значимости их связей и регулировании их развития. Это делает важной задачу разработки и совершенствования методов долговременного контроля состояния вновь формируемых структурно-функциональных нейронных ансамблей.

Одним из феноменов, возникающим при формировании структур мозга, является известная межполушарная левоправая асимметрия гиппокампа. Такая латеризация обнаруживается в асимметричном распределении различных типов синапсов CA3-CA1 в гиппокампе млекопитающих. Афференты из пирамидных нейронов поля CA3 в левом полушарии иннервируют небольшие высокопластичные синапсы на апикальных дендритах пирамидных нейронов поля CA1, тогда как в правом полушарии присутствуют более крупные и стабильные синапсы грибовидной формы (El-Gaby et al., 2015).

Известно, что новые клетки, возникающие в зубчатой извилине, распространяют свои аксоны в течение 11 дней до поля CA3 и через две недели устанавливают рабочие синапсы (Faulkner et al., 2008). Таким образом, в течение двух недель после индукции пролиферации прогениторов происходит перестройка клеточно-молекулярных ансамблей в гиппокампе взрослого животного. Этим определялось время контроля перестроек клеточно-молекулярных ансамблей в гиппокампе продолжительностью в две недели.

Целью нашей работы было неинвазивно, с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) на сверхвысокопольном томографе у одних и тех же животных, не травмируя их, последовательно, в течение двух недель определить изменения в гиппокампальной структуре мозга. В качестве индуктора нейрогенеза была выбрана известная методика добровольных физических нагрузок животных (Brown et al., 2003). С использованием биоинформационного подхода проведен анализ регуляторных белок-белковых взаимодействий, обеспечивающих выживание вновь образованных нейронов в гиппокампе.

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015). Эксперименты поставлены на самцах мышей SPF-статуса широко используемой инбредной линии BALB/C в возрасте 8–10 нед (25–28 г). После отсадки в трехнедельном возрасте и до исследований мышей содержали по четыре особи одного пола в стандартных клетках (35 × 25 × 12 см) при температуре 22–24 °C и искусственном световом режиме 14C : 10T. Брикетированный корм («Чара», Павловский Посад) и воду мыши получали *ad libitum*. В качестве подстилочного материала использовали обеспыленные древесные опилки. Перед началом эксперимента животных рассаживали по две особи в клетку с колесом активности для физических упражнений (всего в экспериментальной и контрольной группах участвовало по восемь животных). Колеса активности были снабжены счетчиками оборотов. В клетке с колесом животные содержались в течение двух недель.

Регистрация изменения объемов гиппокампа животных была проведена с помощью МРТ на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тесла. МРТ-сканирование мозга каждой мыши проводили три раза: перед началом эксперимента, через 1 и 2 нед после проживания в клетке с колесом активности. За 3 мин до МРТ-сканирования мышей обездвиживали газовой смесью (4 %) изофлюрана (Isofluran, Baxter Health-

care Corp., США) и воздуха при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Мальта). Информация об объемах структур мозга мыши была получена с помощью Т2-взвешенных изображений с использованием метода TurboRARE (turbo rapid acquisition with relaxation enhancement). Параметры импульсной последовательности метода: TE = 22 мс, TR = 1500 мс, параметры изображения: размер 1.93 × 1.93 см; матрица 256 × 256 точек; толщина среза 0.5 мм; размеры вокселя 75 μм × 75 μм × 0.5 мм; расстояние между срезами 0.5 мм; количество срезов 9; ориентация срезов – коронарная; общее время сканирования составляло 7 мин. Измерение объемов гиппокампа проводили в программе ImageJ, учитывая площадь гиппокампа на срезе, толщину среза и расстояние между срезами. Расчет коэффициента асимметрии (КА) гиппокампа:

$$|V_{ЛГ} - V_{ПГ}|/(V_{ЛГ} + V_{ПГ}),$$

где V – объем структуры, измеренный на Т2-взвешенных изображениях; ЛГ, ПГ – левая и правая части гиппокампа. Статистическая достоверность отличий определялась по критерию Манна–Уитни ($p < 0.05$).

Реконструкция путей регуляции нейрогенеза в гиппокампе осуществлялась с использованием технологии GeneNet (Роспатент № 990006 от 15.02.1999).

Результаты

С помощью Т2-взвешенной МРТ были получены данные о влиянии физической нагрузки на индукцию нейрогенеза в гиппокампе взрослого животного. В экспериментальной группе, в отличие от контрольной, животные имели возможность бегать в колесе активности. Количество оборотов колес, регистрируемое счетчиками, варьировало в пределах 164–250 тыс., что свидетельствовало о ежесуточном их использовании животными. Таким образом, суммарно за время эксперимента мыши пробегали в колесе активности до 95 км.

Как в опытной, так и в контрольной группе животных достоверных отличий в отношении объема гиппокампа к общему объему мозга не обнаружено (рис. 1, *б*). В группе животных с увеличенной физической активностью, в отличие от контрольной группы, уже после первой недели эксперимента достоверно снижался коэффициент асимметрии гиппокампа (см. рис. 1, *а* и *в*). При этом во всех случаях увеличивался объем правого гиппокампа по сравнению с левым. Разница этого показателя между первой и второй неделями эксперимента была недостоверной.

Обсуждение

Данные, полученные с помощью Т2-взвешенной МРТ по изменению объемов гиппокампа при наличии физической нагрузки, демонстрируют влияние этого фактора на соотношение объемов его правой и левой частей. Такие изменения могут быть обусловлены усилением интенсивности нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа, что было показано на различных экспериментальных моделях (Christie, Cameron, 2006), увеличением плотности синаптических контактов (Knott et al., 2006), активацией роста глии (Haber et al., 2006).

Физическая активность значительно повышает в субгранулярной зоне долю прогениторов с высокой пролиферативной активностью, которые далее активно преобразуются в новые нейроны (Kronenberg et al., 2003). Значительная часть вновь сформированных в зубчатой фасции взрослого гиппокампа нейронов гибнет в течение двух недель. При этом те из них, которые выжили и встроились в существующие сети, демонстрируют высокую стабильность (Dayer et al., 2003).

Основными регуляторами индукции пролиферации прогениторов, а также выживания и миграции новых нейронов выступают трофические и ростовые факторы, выделяемые микроокружением нейрогенной ниши. Ключевыми считаются нейротрофический фактор BDNF (brain-derived neurotrophic factor), продукция которого значительно интенсифицируется после физической нагрузки (Schnyder, Handschin, 2015), а также сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF (vascular endothelial growth factor), действующие через свои тирозинкиназные рецепторы, хорошо представленные на прогениторах (Fournier, Duman, 2012; Ortiz-López et al., 2017).

На основании литературных источников базы данных PubMed с использованием технологии GeneNet (Роспатент № 990006 от 15.02.1999) проведен анализ регуляторных молекулярных процессов, которые могут опосредовать выживание прогениторов в нейрогенной нише после интенсификации физической нагрузки и их встраивание в функциональные сети.

Передача сигнала BDNF и VEGF поддерживает выживание вновь сформированных во взрослом гиппокампе нейронов через фосфоинозитол-3-киназный/Akt/mTOR сигнальный каскад (рис. 2, *а*).

Фосфоинозитид-3-киназа (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) обеспечивает формирование пула фосфоинозитол-3,4,5-трифосфатов (PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) из фосфоинозитол-4,5-бифосфатов (PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate)) (Volinia et al., 1995) на плазматической мембране нейронов. PIP3 являются местами закрепления на плазматической мембране протеинкиназы B (Akt, RAC-gamma serine/threonine-protein kinase), функциональная роль которой в клеточных процессах хорошо и подробно освещена в литературе (Vanhaesebroeck, Alessi, 2000; Sarbassov et al., 2005; Huang, Manning, 2009).

Имеются данные, что белок Girdin (Akt phosphorylation enhancer) формирует сигнальный путь Girdin/Akt в эндотелиальных клетках при ангиогенезе (Kitamura et al., 2008). Формирование новых сосудов в процессе нейрогенеза выступает существенным фактором.

В карбоксильном участке молекулы белка Girdin присутствует сайт, обеспечивающий формирование комплекса непосредственно с протеинкиназой B. Считается, что это объединение каким-то образом пролонгирует киназную активность протеинкиназы в PI3K/Akt/mTOR сигнальном каскаде (Anai et al., 2005). При этом Girdin – субстрат Akt (Kitamura et al., 2008). Связываясь с нитями актина, Girdin вовлекается в процессы ремоделирования актинового цитоскелета и подвижность клетки (Enomoto et al., 2005). Кроме того, в работе (Nakai et al., 2014) показана вовлеченность данного белка в синаптические процессы (фосфорилирование NR2B субъединицы НМДА рецепторов) в гиппокампе через Bdnf/Akt сигнальный путь. Глутаматные рецепторы этого типа присут-

ствуют на синаптических контактах вновь сформированных нейронов во взрослом гиппокампе (Drew et al., 2013).

Мы реконструировали белок-белковые взаимодействия в нейрогенной нише, которые, предположительно, могут обеспечивать выживание новых нейронов (белок-белковая сеть готовится к представлению на сайте http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/genenet/).

Нами выдвинуто предположение, что Girdin может выступать в качестве посредника, который, с одной стороны, пролонгирует киназную активность протеинкиназы B, образуя с ней комплекс (см. рис. 2, *а* – стрелка средней толщины). При этом, будучи сам мишенью протеинкиназы B (см. рис. 2, *б* – стрелка средней толщины), через взаимодействие с нитями актина Girdin вовлекается в процессы их ремоделирования, обеспечивая клеточную подвижность, что, на наш взгляд, может играть важную роль при миграции нейронов и их встраивании (Akt-зависимая клеточная миграция). С учетом того, что новые нейроны формируют синапсы, на которых преимущественно расположены NR2B-НМДА рецепторы, Girdin, участвуя в их фосфорилировании (см. рис. 2, *б* – пунктирная линия), вовлекается в процессы синаптической пластичности новых нейронов.

Girdin прямо взаимодействует с белком DISC1 (disrupted in schizophrenia 1 protein). Этот комплекс препятствует поддержанию фосфорилированного состояния протеинкиназы B (Kim et al., 2009). Имеются данные о том, что подавление активности DISC1 ускоряло нейрональную интеграцию, но в итоге это приводило к морфологическим нарушениям и неправильному позиционированию новых клеток (Duan et al., 2007). Новообразованные нейроны формируют контакты со своим ближайшим окружением, а затем уже с более удаленными клетками и получают сначала гораздо больше тормозных входов, что, вероятно, защищает существующую сеть нейронов от их излишней возбудимости (Deshpande et al., 2013). Можно сделать вывод, что новые нейроны должны встраиваться в существующие сети с некоторой

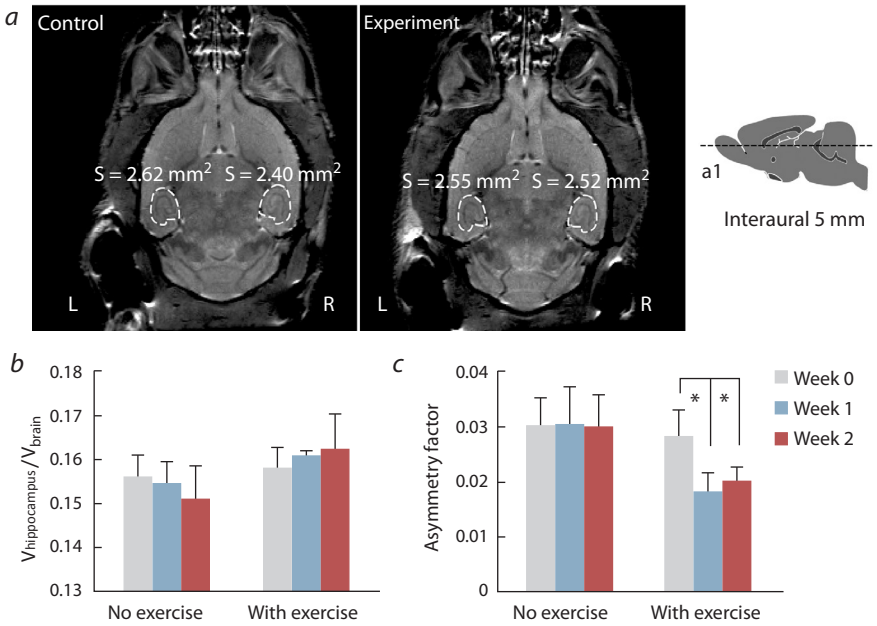


Fig. 1. The effect of physical activity on the ratio of the volumes of the right and left parts of the mouse hippocampus.

(*a*) Examples of coronary T2-weighted MRI images of the brain of control and experimental mice. The dashed line marks the right (R) and left (L) parts of the hippocampus. (a1) The position of the coronary slice on the standard stereotactic orientation (from the ear apertures). (*b*) Dynamics of the relative volumes of the hippocampus during the experiment in animals subjected to physical exercise and kept under standard conditions. (*c*) Dynamics of the ratio of volumes of the left and right parts of the hippocampus (coefficient of asymmetry, Ka) in animals subjected to physical exercise and kept under standard conditions. Week 0: Ka values before providing free access to a running wheel; weeks 1 and 2: Ka values one and two weeks after the provision of free access to a running wheel.

* Differences statistically significant at $p < 0.05$ according to the Mann–Whitney test.

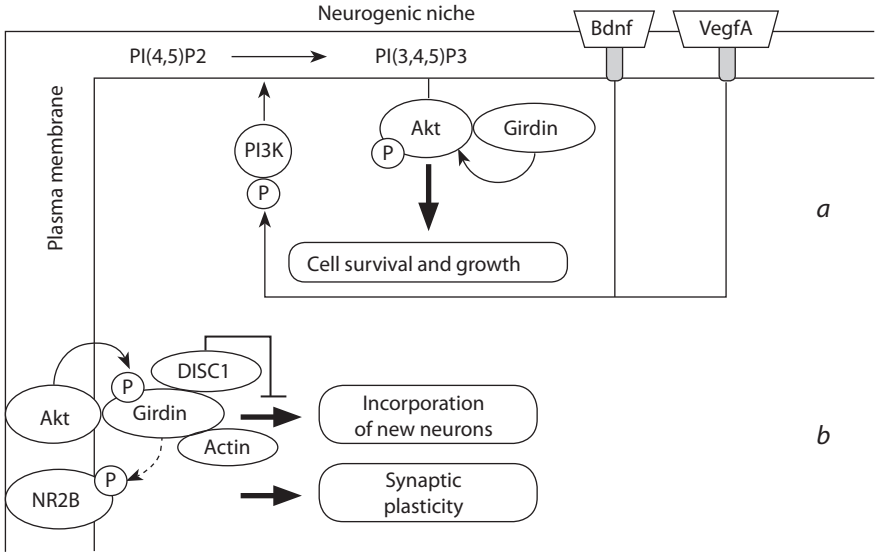


Fig. 2. Schematic presentation of protein–protein interaction supporting the survival and migration of new neurons in the hippocampal neurogenic niche. See text for details.

PIP2, PI(4,5)P2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP3, PI(3,4,5)P3, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate; Akt, RAC-gamma serine/threonine-protein kinase; Bdnf, brain-derived neurotrophic factor; VegfA, vascular endothelial growth factor; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; Girdin, Akt phosphorylation enhancer; NR2B, subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor; DISC1, disrupted in schizophrenia 1 protein.

—| Girdin inhibition by DISC1; P – phosphorylated state of the protein;
▯ VegfA and Bdnf tyrosine kinase receptors.

задержкой, что, вероятно, контролируется парой DISC1/Girdin (см. рис. 2, *б*).

Таким образом, белок-белковые взаимодействия на плазматической мембране новых нейронов обеспечивают выживание прогениторов, их рост, а также миграцию и постепенное встраивание в функциональные синаптические сети (см. рис. 2).

Обнаруженное в наших экспериментах достоверное изменение структурной асимметрии гиппокампа у животных, получающих добровольную повышенную физическую активность, представляет исключительный интерес. Гранулярные клетки зубчатой фасции формируют аксоны, проецирующиеся на пирамидальные нейроны поля CA3, аксоны которых в свою очередь образуют синапсы с нейронами поля CA1. Вследствие лево-правой межполушарной асимметрии в правом гиппокампе в поле CA1 в среднем 67 % дендритных шипиков, представляющих постсинаптическую часть синаптических контактов, относится к крупным, более стабильным грибовидным шипикам (El-Gaby et al., 2015). Считается, что этот тип шипиков – субстрат памяти, обеспечивает долговременное хранение информации (Bhatt et al., 2009; Yang et al., 2009). Наблюдаемый в наших экспериментах феномен нуждается в более пристальном изучении, и мы не стремимся к поспешным поверхностным выводам.

Наши результаты свидетельствуют о возможности в рамках выбранной модели охарактеризовать изменение объемов структур, индуцированных внешними воздействиями, такими как добровольные физические нагрузки. Показана возможность неинвазивно (последовательно, на разных стадиях нейрогенеза у одного и того же животного) регистрировать изменения, в том числе лево-правой асимметрии по такому параметру, как соотношение объемов этих структур. При этом, как показывают данные литературы, изменение объемов структур мозга может быть стимул-специфичным (Lerch et al., 2011), что открывает широкие возможности по исследованию латеризации и механизмов нейрональной пластичности.

Полученные результаты, естественно, требуют дальнейших исследований с применением сформированных методических подходов. Представляется необходимым с помощью электрофизиологических методов провести экспериментальный анализ функциональной роли нейрогенеза на моделях нейрональной пластичности в срезах гиппокампа, в частности, осуществляя тетанизацию перфорантного пути гиппокампа на срезах, полученных от группы мышей, у которых нейрогенез индуцирован длительной физической нагрузкой (в течение двух, четырех, восьми недель) (Patten et al., 2013) или другими факторами, которые будут выявлены в результате биоинформационного анализа.

Заключение

Таким образом, в результате работы показано, что добровольное увеличение физической активности, индуцирующее нейрогенез, приводит к снижению структурной асимметрии гиппокампа через одну-две недели. Выявлено отсутствие достоверных отличий в объемах гиппокампа и коэффициента асимметрии при отсутствии индукции нейрогенеза. Проведен анализ белок-белковых взаимодействий, обеспечивающих выживание и встраивание новых нейронов в гиппокампе.

Acknowledgments

The work was supported by Government procurement IV.35.2.6 for the Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics, Novosibirsk, and the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-01440. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (ICG SB RAS) was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Akers K.G., Martinez-Canabal A., Restivo L., Yiu A.P., De Cristofaro A., Hsiang H.L., Wheeler A.L., Guskjolen A., Niibori Y., Shoji H., Ohira K., Richards B.A., Miyakawa T., Josselyn S.A., Frankland P.W. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. Science. 2014;344(6184):598-602. DOI 10.1126/science.1248903.

Anai M., Shojima N., Katagiri H., Ogihara T., Sakoda H., Onishi Y., Ono H., Fujishiro M., Fukushima Y., Horike N., Viana A., Kikuchi M., Noguchi N., Takahashi S., Takata K., Oka Y., Uchijima Y., Kurihara H., Asano T. A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. J. Biol. Chem. 2005;280(18):18525-18535. DOI 10.1074/jbc.M500586200.

Bhatt D.H., Zhang S., Gan W.B. Dendritic spine dynamics. Annu. Rev. Physiol. 2009;71:261-282. DOI 10.1146/annurev.physiol.010908.163140.

Brown J., Cooper-Kuhn C.M., Kempermann G., Van Praag H., Winkler J., Gage F.H., Kuhn H.G. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. Eur. J. Neurosci. 2003;17(10):2042-2046.

Christie B.R., Cameron H.A. Neurogenesis in the adult hippocampus. Hippocampus. 2006;16(3):199-207. DOI 10.1002/hipo.20151.

Dayer A.G., Ford A.A., Cleaver K.M., Yassaee M., Cameron H.A. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. J. Comp. Neurol. 2003;460(4):563-572. DOI 10.1002/cne.10675.

Deng W., Saxe M.D., Gallina I.S., Gage F.H. Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. J. Neurosci. 2009;29(43):13532-13542. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3362-09.2009.

Deshpande A., Bergami M., Ghanem A., Conzelmann K.K., Lepier A., Götz M., Beninger B. Retrograde monosynaptic tracing reveals the temporal evolution of inputs onto new neurons in the adult dentate gyrus and olfactory bulb. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013;110(12):E1152-E1161. DOI 10.1073/pnas.1218991110.

Drew L.J., Fusi S., Hen R. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? Learn. Mem. 2013;20(12):710-729. DOI 10.1101/lm.026542.112.

Duan X., Chang J.H., Ge S., Faulkner R.L., Kim J.Y., Kitabatake Y., Liu X.B., Yang C.H., Jordan J.D., Ma D.K., Liu C.Y., Ganesan S., Cheng H.J., Ming G.L., Lu B., Song H. Disrupted-in-schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. Cell. 2007;130(6):1146-1158. DOI 10.1016/j.cell.2007.07.010.

El-Gaby M., Shipton O.A., Paulsen O. Synaptic plasticity and memory: new insights from hippocampal left-right asymmetries. Neuroscientist. 2015;21(5):490-502. DOI 10.1177/1073858414550658.

Enomoto A., Murakami H., Asai N., Morone N., Watanabe T., Kawai K., Murakumo Y., Usukura J., Kaibuchi K., Takahashi M. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. Dev. Cell. 2005;9(3):389-402. DOI 10.1016/j.devcel.2005.08.001.

Faulkner R.L., Jang M.H., Liu X.B., Duan X., Sailor K.A., Kim J.Y., Ge S., Jones E.G., Ming G.L., Song H., Cheng H.J. Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008;105(37):14157-14162. DOI 10.1073/pnas.0806658105.

Fournier N.M., Duman R.S. Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression. Behav. Brain Res. 2012;227(2): 440-449. DOI 10.1016/J.BBR.2011.04.022.

Fukuda S., Kato F., Tozuka Y., Yamaguchi M., Miyamoto Y., Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. J. Neurosci. 2003;23(28):9357-9366.

Haber M., Zhou L., Murai K.K. Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. J. Neurosci. 2006;26(35):8881-8891. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1302-06.2006.

Huang J., Manning B.D. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. Biochem. Soc. Trans. 2009;37(Pt. 1): 217-222. DOI 10.1042/BST0370217.

Kim J.Y., Duan X., Liu C.Y., Jang M.H., Guo J.U., Pow-anpongkul N., Kang E., Song H., Ming G.L. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. Neuron. 2009;63(6):761-773. DOI 10.1016/j.neuron.2009.08.008.

Kitamura T., Asai N., Enomoto A., Maeda K., Kato T., Ishida M., Jiang P., Watanabe T., Usukura J., Kondo T., Costantini F., Murohara T., Takahashi M. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. Nat. Cell. Biol. 2008;10(3):329-337. DOI 10.1038/ncb1695.

Knott G.W., Holtmaat A., Wilbrecht L., Welker E., Svoboda K. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex *in vivo*. Nat. Neurosci. 2006;9(9):1117-1124. DOI 10.1038/nn1747.

Kronenberg G., Reuter K., Steiner B., Brandt M.D., Jessberger S., Yamaguchi M., Kempermann G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. J. Comp. Neurol. 2003;467(4):455-463. DOI 10.1002/cne.10945.

Lerch J.P., Yiu A.P., Martinez-Canabal A., Pekar T., Bohbot V.D., Frankland P.W., Henkelman R.M., Josselyn S.A., Sled J.G. Maze training in mice induces MRI-detectable brain shape changes specific to the type of learning. Neuroimage. 2011;54(3):2086-2095. DOI 10.1016/j.neuroimage.2010.09.086.

Muramatsu R., Ikegaya Y., Matsuki N., Koyama R. Neonatally born granule cells numerically dominate adult mice dentate gyrus. Neuroscience. 2007;148(3):593-598. DOI 10.1016/j.neuroscience.2007.06.040.

Nakai T., Nagai T., Tanaka M., Itoh N., Asai N., Enomoto A., Asai M., Yamada S., Saifullah A.B., Sokabe M., Takahashi M., Yamada K. Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. J. Neurosci. 2014;34(45):14995-5008. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2228-14.2014.

Ortiz-López L., Vega-Rivera N.M., Babu H., Ramírez-Rodríguez G.B. Brain-derived neurotrophic factor induces cell survival and the migration of murine adult hippocampal precursor cells during differentiation *in vitro*. Neurotox. Res. 2017;31(1):122-135. DOI 10.1007/S12640-016-9673-X.

Palmer T.D., Willhoite A.R., Gage F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. J. Comp. Neurol. 2000;425(4):479-494.

Patten A.R., Sickmann H., Hryciw B.N., Kucharsky T., Parton R., Kernick A., Christie B.R. Long-term exercise is needed to enhance synaptic plasticity in the hippocampus. Learn. Mem. 2013;20(11): 642-647. DOI 10.1101/Lm.030635.113.

Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science. 2005;307(5712):1098-1101. DOI 10.1126/science.1106148.

Schnyder S., Handschin C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1α, myokines and exercise. Bone. 2015;80:115-125. DOI 10.1016/j.bone.2015.02.008.

Seri B., García-Verdugo J.M., Collado-Morente L., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. J. Comp. Neurol. 2004;478(4):359-378. DOI 10.1002/cne.20288.

Vanhaesebroeck B., Alessi D.R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. Biochem. J. 2000;346(Pt. 3):561-576.

Volinia S., Dhand R., Vanhaesebroeck B., MacDougall L.K., Stein R., Zvelebil M.J., Domin J., Panaretou C., Waterfield M.D. A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. EMBO J. 1995;14(14):3339-3348.

Yang G., Pan F., Gan W.B. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. Nature. 2009;462(7275):920-924. DOI 10.1038/nature08577.

ORCID ID

T.A. Zapara orcid.org/0000-0002-8144-9090

A.V. Romashchenko orcid.org/0000-0002-0674-0574

A.L. Proskura orcid.org/0000-0003-4284-8635

A.S. Ratushnyak orcid.org/0000-0001-5198-8926

Вавиловский журнал генетики и селекции
2018. Онлайн. DOI 10.18699/VJ18.34-o

Сравнительный анализ приспособленности линий *Drosophila virilis*, контрастных по реакции на стрессирующее воздействие

Е.К. Карпова ✉, И.Ю. Раушенбах, Н.Е. Грунтенко

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

Одним из важнейших элементов, способствующих адаптации организмов к неблагоприятным условиям среды, является стресс-реакция. Особый интерес представляет изучение генетического контроля стресс-реакции насекомых и ее роли в адаптации к неблагоприятным условиям. Ювенильный гормон (ЮГ) выполняет функцию гонадотропного гормона у имаго насекомых, *Drosophila* в том числе, контролируя развитие яичников, вителлогенез и откладку яиц, и играет ключевую роль в стресс-реакции и регуляции размножения насекомых в условиях стресса. Показано, что снижение деградации ЮГ у особей, реагирующих на неблагоприятные воздействия стресс-реакцией (R-особей), вызывает задержку в откладке яиц и, по-видимому, позволяет популяции «переждать» неблагоприятные условия, способствуя тем самым адаптации на популяционном уровне. Однако при проведении мониторинга природных популяций *D. melanogaster* по способности развивать стресс-реакцию было обнаружено, что в них с высокой частотой встречаются особи, не способные к ее развитию (NR-особи). Изучение репродуктивных характеристик R- и NR-особей показало, что в нормальных условиях преимущество в оставлении потомства имеют первые. В неблагоприятных условиях, если стрессор достаточно интенсивен, NR-особи погибают, но если его интенсивность невелика, то они, в отличие от R-особей, продолжают оставлять потомство. На основании этих данных была выдвинута гипотеза о том, что сбалансированность популяций по R- и NR-аллелям обеспечивает их адаптацию при существовании популяции в условиях частых стрессирующих воздействий невысокой интенсивности. Целью данной работы являлась проверка этой гипотезы экспериментальным путем. Для этого проводились исследования характеристик приспособленности (продолжительности жизни, плодовитости) R- и NR-линий *D. virilis* в нормальных условиях и при регулярном тепловом стрессировании различной периодичности.

Ключевые слова: *Drosophila virilis*; нейроэндокринная стресс-реакция; ювенильный гормон; приспособленность; плодовитость; продолжительность жизни.

Comparative analysis of the fitness of *Drosophila virilis* lines contrasting in response to stress

E.K. Karpova ✉, I.Yu. Rauschenbach, N.E. Gruntenko

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

One of the crucial elements contributing to the adaptation of organisms to unfavorable environmental conditions is the reaction of stress. The study of its genetic control and role in adaptation to unfavorable conditions are of special interest. The juvenile hormone (JH) acts as a gonadotropic hormone in adult insects controlling the development of the ovaries, inducing vitellogenesis and oviposition. It was shown that a decrease in JH degradation in individuals reacting to adverse conditions by stress reaction (R-individuals) causes delay in egg laying and seems to allow the population to "wait out" the unfavorable conditions, thereby contributing to the adaptation at the population level. However, monitoring natural populations of *D. melanogaster* for the capability of stress reaction demonstrated that they have a high percentage of individuals incapable of it (NR-individuals). The study of reproductive characteristics of R- and NR-individuals showed that under normal conditions R-individuals have the advantage of procreating offspring. Under unfavorable conditions, if the stressor is intense enough, NR-individuals die, but if its intensity is low, then they, unlike R-individuals, continue to produce offspring. Based on these data, it was hypothesized that the balance of R- and NR-alleles in the population ensures its adaptation under frequent stresses of low intensity. To verify the hypothesis by an experiment, the fitness characteristics (lifespan, fecundity) of the R and NR lines of *D. virilis* were studied under normal conditions and under regular heat stress of various frequency.

Key words: Drosophila; neuroendocrine stress reaction; juvenile hormone; fitness; fertility; lifespan.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Карпова Е.К., Раушенбах И.Ю., Грунтенко Н.Е. Сравнительный анализ приспособленности линий *Drosophila virilis*, контрастных по реакции на стрессирующее воздействие. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. DOI 10.18699/VJ18.34-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Karpova E.K., Rauschenbach I.Yu., Gruntenko N.E. Comparative analysis of the fitness of *Drosophila virilis* lines contrasting in response to stress. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018. DOI 10.18699/VJ18.34-o

Received August 20, 2018
Revised October 9, 2018
Accepted October 11, 2018
Published online November 6, 2018

✉ e-mail: karpova@bionet.nsc.ru

Реакция стресса – это универсальный и высококонсервативный ответ живых организмов на любые неблагоприятные воздействия. О ее эволюционной древности свидетельствует идентичность ряда элементов стресс-реакции у млекопитающих и насекомых, разошедшихся в эволюции более 600 млн лет назад (Chernysh, 1991). А некоторые из этих элементов задействованы в стресс-реакции даже у растений: так, уровни катехоламинов меняются у растений картофеля под действием разных стрессирующих внешних факторов (Święidrych et al., 2004). Показано, что у имаго *Drosophila* центральными звеньями стресс-реакции являются биогенные амины (октопамин и дофамин), уровень которых резко возрастает при неблагоприятных воздействиях любой природы, а также гонадотропины (20-гидроксиэкдизон (20Э) и ювенильный гормон (ЮГ)), титр которых при стрессе ведет себя аналогичным образом (Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

В неблагоприятных условиях различной природы, таких как высокие и низкие температуры, механические и химические стимулы, непрерывный свет и иммобилизация, уровни дофамина (ДА) и октопамина резко возрастают в гемолимфе и нервной ткани дрозофилы, влияя на выживаемость (Hirashima et al., 2000; Gruntenko et al., 2012; Hanna et al., 2015).

Изменение уровней обоих гонадотропинов в неблагоприятных условиях также способствует адаптации. Повышение титра 20Э приводит к апоптозу части ранних вителлогенических ооцитов и снижению плодовитости, что способствует адаптации на популяционном уровне в условиях перенаселения или нехватки пищевых ресурсов; а повышение уровня ЮГ вызывает задержку откладки яиц, позволяющую переждать неблагоприятные условия (Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Исследования последних лет позволили установить связь между стресс-устойчивостью и продолжительностью жизни. Однако данные достаточно противоречивы: в одних исследованиях существование такой связи отвергается (Harshman, 1999), а в других говорится, что стресс продлевает жизнь насекомым (Sarup et al., 2014) или, напротив, укорачивает (Moskalev et al., 2015). Селекционные эксперименты, как полагают некоторые авторы (Tower, 1996; Harshman et al., 1999), могут давать противоречивые результаты по разным причинам: из-за различий в базовых популяциях, погрешностей селекции, различий в параметрах селекционного эксперимента, а возможно, что в разных работах в ответ на селекцию вовлекаются различные механизмы. Мы же полагаем, что эффект стресса на приспособленность в значительной мере зависит от частоты и интенсивности воздействия стрессорного фактора, и планируем выявить «положительные» и «отрицательные» дозировки теплового воздействия на плодовитость и продолжительность жизни имаго *Drosophila virilis*.

По результатам многолетних исследований в нашей лаборатории разработана перспективная модель для изучения стресс-реакции на насекомых. Эта модель представлена двумя линиями *D. virilis*, контрастными по реакции на действие стрессора. Личинки одной из этих линий (линия 101 дикого типа) при развитии при 32 °C после суточной задержки окукливаются и нормально проходят метаморфоз. Личинки другой (линия 147) не способны к метаморфозу при 32 °C и погибают. Как личинки, так и имаго линии 101 отвечают на стрессирование возникновением стресс-реакции, позволяющей им адаптироваться к неблагоприятным условиям среды. У особей линии 147 подобная реакция отсутствует (Раушенбах, 1997). Данные, полученные ранее, демонстрируют наличие положительной корреляции между реактивностью системы ДА и выживаемостью в условиях стресса особей двух линий *D. virilis*. У мух линии 101 при кратковременном стрессе (60 мин, 38 °C) резко возрастает содержание ДА, и при увеличении длительности стрессирующего воздействия до 6 ч все особи этой линии выживают. У мух линии 147 повышение содержания ДА весьма незначительно, и при увеличенной длительности стрессорного воздействия погибают 88 % самок и 57 % самцов (Раушенбах, Шумная, 1993). Подобная связь может свидетельствовать о роли ДА в адаптации *D. virilis* к тепловому стрессу, причем основное значение здесь, по-видимому, имеет не уровень биогенного амина как таковой (в нормальных условиях содержание ДА выше у особей линии 147), а степень его повышения, т. е. реактивность в условиях теплового стресса. Такая роль ДА может быть связана с тем, что он контролирует энергетический метаболизм насекомых (стимулирует окисление глюкозы и трегалозы, вызывая тем самым интенсификацию мышечной функции), повышая при стрессе его уровень (Раушенбах, Шумная, 1993).

Проводилось также исследование на этой модели уровня деградации ЮГ, одного из центральных звеньев стресс-реакции. Установлено, что имаго дикого типа *D. virilis* (линия 101) отвечают на действие стрессоров снижением уровня деградации ЮГ (повышением содержания гормона). У особей же мутантной линии 147 подобная реакция отсутствует.

Сигнальный путь ЮГ контролирует размножение через регуляцию вителлогенеза, созревания и откладки яиц у самок насекомых и через контроль раннего эмбрионального развития и тем самым может обеспечивать адаптацию на популяционном уровне (Goodman, Granger, 2005; Gruntenko, Rauschenbach, 2008). Действительно, эксперименты показали, что действие стрессора (высокой температуры) вызывает, вследствие снижения деградации ЮГ (повышения уровня гормона), у самок *D. virilis* дикого типа задержку откладки яиц и снижение плодовитости в течение нескольких дней, а затем ее повышение (откладываются «задержанные яйца») (Раушенбах, 1997). У самок же мутантной линии 147, которые не реагируют на стрессор снижением деградации гормона, изменений в репродуктивных характеристиках при стрессе не происходит (Раушенбах, 1997). Причем в нормальных условиях плодовитость самок этой линии существенно ниже, чем у мух линии 101. Необходимо заметить, что подобные эксперименты были проведены и на *D. melanogaster* с аналогичным результатом: выживаемость линии *D. melanogaster* с низким уровнем ЮГ снижена (Раушенбах, 1997; Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Таким образом, особи, реагирующие на стресс (R-особи), имеют явные преимущества перед не реагирующими (NR-особи), будучи способными адаптироваться к небла-

гоприятным условиям среды (за счет изменений в энергетическом метаболизме) и обладая более высокой жизнеспособностью в условиях стресса, а также на порядок более высокой плодовитостью в нормальных условиях, и, по всей видимости, должны бы были вытеснить в природе последних. Но исследование двух природных популяций *D. melanogaster* показало, что это не так. NR-особи встречаются в природной популяции с частотой примерно 50 % (Раушенбах, 1997). Чем же это обусловлено?

Возможно, NR-особи имеют преимущество в оставлении потомства в условиях частого стрессирования. R-особи будут реагировать на экстремальные условия задержкой в откладке яиц и таким образом «пережидать» неблагоприятный период, а особи, не способные к этой реакции, будут продолжать размножаться, что приведет в условиях частых стрессирующих воздействий невысокой интенсивности (т. е. не приводящих к гибели не способных к стресс-реакции особей) к возрастанию числа таких особей в популяции, несмотря на их более низкую плодовитость. Этим может объясняться соотношение частот особей, реагирующих и не реагирующих на стресс (50:50), обнаруженное в исследованных природных популяциях *D. melanogaster*, так как они были получены из районов с высокой степенью антропогенного влияния (Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

На основании этих данных была выдвинута гипотеза о том, что сбалансированность популяций по R- и NR-аллелям обеспечивает их адаптацию при существовании популяции в условиях частых стрессирующих воздействий невысокой интенсивности (Rauschenbach et al., 1996; Gruntenko, Rauschenbach, 2008). Целью настоящей работы была проверка этой гипотезы экспериментальным путем. Для этого исследовали характеристики приспособленности (продолжительность жизни, плодовитость) R- и NR-линий *D. virilis* в нормальных условиях и при регулярном тепловом стрессировании различной периодичности и длительности.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Исследование проведено на двух линиях *D. virilis*: линии 101 (R) дикого типа и линии 147 (NR), несущей мутации *brick* (розовые глаза), *broken* (прервана задняя поперечная жилка крыла) и *detached* (недоразвитие продольных жилок крыла) в хромосоме II и температуро-чувствительную личиночную леталь в хромосоме VI, препятствующую развитию стресс-реакции как у личинок, так и у имаго этой линии. Культуры обеих линий выращивали на стандартной питательной среде при 25 °C.

Анализ плодовитости. Плодовитость оценивали следующим образом: по пять только что вылетевших самок и самцов помещали в стаканы с кормом (10 стаканов в каждой исследуемой группе) и переносили на свежий корм ежедневно до момента прекращения периода репродукции. Число вылетевших из каждого стакана мух было посчитано, и плодовитость определялась как число потомков на родительскую самку в сутки.

Анализ продолжительности жизни. Для определения продолжительности жизни брали по пять только что вылетевших самок и самцов, помещали в стаканы с кормом (10 стаканов в каждой исследуемой группе) и переносили на свежий корм ежедневно до момента смерти всех подопытных мух. Каждый день проводили регистрацию и определение пола умерших мух во всех стаканах. Затем подсчитывалась средняя продолжительность жизни особей разных полов в каждой исследуемой группе.

Статистическая обработка. Для оценки достоверности результатов использовали *t*-тест Стьюдента.

Результаты

Оценка продолжительности жизни R- и NR-особей *D. virilis*

Для оценки продолжительности жизни была проведена серия экспериментов на линиях 101 и 147 *D. virilis*. Представлялось интересным выяснить, как различается продолжительность жизни у мух, способных и не способных к стресс-реакции в нормальных условиях, и есть ли разница по этой характеристике между полами. Также мы выясняли, как изменяется продолжительность жизни мух обеих линий при регулярном стрессорном воздействии различной периодичности и силы: при ежедневном кратковременном стрессе (38 °C, 1 ч), при еженедельном кратковременном стрессе (38 °C, 1 ч) и еженедельном более длительном стрессе (38 °C, 4 ч).

Данные по средней продолжительности жизни особей обоих полов линий 101 и 147 приведены на рис. 1. Видно, что продолжительность жизни в контроле достоверно не различается как у самок, так и у самцов изученных линий. Как и следовало ожидать, при сильном стрессе (4 ч раз в неделю) продолжительность жизни обеих линий падает ($p < 0.01$ для самок линии 147 и $p < 0.001$ для

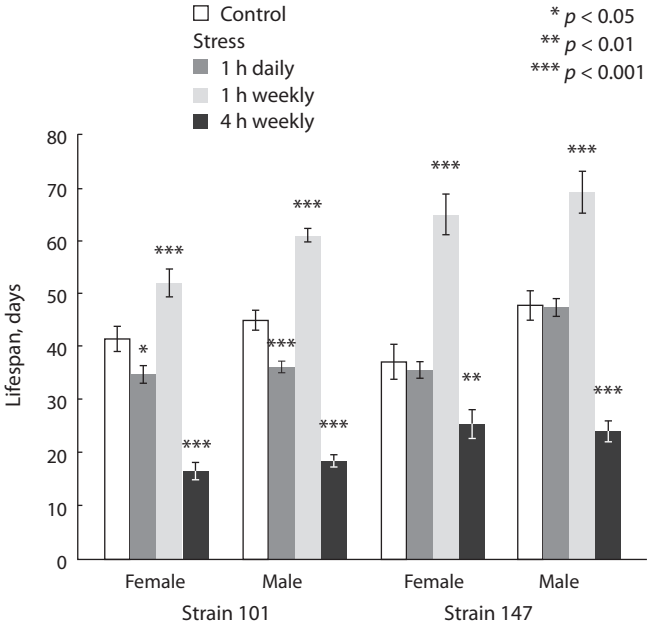


Fig. 1. Effects of stress of various intensity and frequency on lifespan in *D. virilis* strain 101, capable of stress response, and not capable strain 147. Each figure is a mean of 10 tests ± SE. Asterisks indicate the significance of differences from the control group.

остальных трех групп). Неожиданным оказался тот факт, что более сильное сокращение продолжительности жизни при стрессировании наблюдается у способной к стресс-реакции линии 101. Более слабый стресс (1 ч раз в сутки) оказывает негативное влияние на продолжительность жизни особей линии 101 ($p < 0.05$ для самок и $p < 0.001$ для самцов) и практически не оказывает влияния на мух линии 147. Интересным оказалось то, что при самом слабом стрессе (1 ч раз в неделю) продолжительность жизни обеих линий резко увеличивается ($p < 0.001$ для всех групп), причем у линии 147 этот эффект более выражен. Таким образом, в условиях стресса линия, не способная к стресс-реакции, имеет преимущество по продолжительности жизни.

Анализ плодовитости R- и NR-особей *D. virilis*

Однако более важным в создании баланса аллелей R и NR в популяции должен быть вклад R- и NR-особей в следующее поколение. Чтобы оценить этот вклад, мы изучили плодовитость линий 101 и 147, определив как ее интенсивность, так и сроки размножения, характерные для обеих линий в нормальных условиях, а также влияние на них стрессорных воздействий.

Результаты по изучению сроков начала откладки яиц у линий 101 и 147 представлены в табл. 1. Видно, что в нормальных условиях особи линии 147 начинают откладывать яйца достоверно позднее, чем особи линии 101 ($p < 0.001$). Данные табл. 1 свидетельствуют также о том, что регулярное стрессирование (38 °C, 1 ч раз в сутки) вызывает у самок линии 101 достоверную задержку в начале откладки яиц ($p < 0.001$), что хорошо согласуется с данными, полученными в лаборатории ранее. У мух линии 147 достоверных изменений этого параметра не наблюдается. Исследования по изучению сроков начала откладки яиц у линии 101 при стрессировании один раз в неделю не проводились, поскольку стрессорное воздействие осуществлялось уже после начала откладки яиц и не могло на него повлиять.

В табл. 2 представлены данные по времени окончания откладки яиц в норме и в условиях частого (1 раз в сутки) и редкого (1 раз в неделю) краткого теплового стрессирования (38 °C, 1 ч). Более длительное стрессирование в этих экспериментах невозможно, так как приводит к стерилизации самцов *Drosophila* (Rauschenbach et al., 1996). В нормальных условиях у особей исследуемых линий репродуктивный период одинаков (см. табл. 2). Вместе с тем ежедневный стресс вызывает у особей линии 147 чрезвычайно сильное уменьшение репродукции ($p < 0.001$), но не влияет на период репродукции линии 101. То есть в условиях постоянного стрессирования особи линии 101 имеют явные преимущества в оставлении потомства. Редкое стрессирование, напротив, заметно увеличивает период репродукции у особей линии 147 ($p < 0.001$), не сказываясь на периоде репродукции линии 101. Таким образом, в условиях стресса невысокой интенсивности линия 147 определенно имеет репродуктивное преимущество.

Этот вывод подтверждается данными рис. 2. На нем представлены результаты оценки плодовитости линий 101 и 147 в нормальных условиях и в условиях слабого редкого стресса (38 °C, 1 ч раз в неделю, начиная с 10-го дня после вылета). Хорошо видно, что в нормальных условиях преимущество в оставлении потомства имеют особи, способные к стресс-реакции (101), – их плодовитость заметно выше (рис. 2, *а*), чем плодовитость мух линии 147 (рис. 2, *б*), не способных к стресс-реакции. В условиях слабого редкого теплового стресса плодовитость линии 101 существенно снижается, в отличие от линии 147. Обращает на себя внимание тот факт, что у особей линии 147 при стрессе плодовитость в конце репродуктивного периода (начиная с 31-го дня после вылета) превышает не только уровень плодовитости этой линии в нормальных условиях (см. рис. 2, *б*), но и уровень линии 101 (см. рис. 2, *а*).

Table 1. Start of oviposition by females of *D. virilis* strain 101, capable of stress response, and not capable strain 147 kept under standard conditions and exposed to frequent short-term heat shock (38 °C, 1 h daily)

Group	Age, days after eclosion	
	Strain 101	Strain 147
Control	2.78 ± 0.16***	4.93 ± 0.33
Heat shock 1 h daily	4.20 ± 0.14	5.33 ± 0.30

*** $p < 0.001$.

Table 2. End of oviposition by females of *D. virilis* strain 101, capable of stress response, and not capable strain 147 kept under standard conditions, exposed to frequent short-term heat shock (38 °C, 1 h daily), and exposed to rare short-term heat shock (38 °C, 1 h weekly)

Group	Age, days after eclosion	
	Strain 101	Strain 147
Control	32.93 ± 0.40	34.50 ± 1.78
Heat shock 1 h daily	28.60 ± 2.69	11.57 ± 0.62***
Heat shock 1 h weekly	33.67 ± 0.41	42.17 ± 0.44

*** $p < 0.001$.

Обсуждение

Многочисленные исследования позволили найти связь между стресс-устойчивостью и продолжительностью жизни (Tower, 1996; Harshman et al., 1999; Sarup et al., 2014; Moskalev et al., 2015). Эта закономерность установлена на основании экспериментов по селекции, мутационного анализа и изучения генной экспрессии. В селекционных экспериментах чаще всего используются линии *D. melanogaster*. М. Роуз (Rose, 1984) вывел линии с продолжительным периодом размножения, у которых при этом как корреляционный ответ на селекцию увеличивалась продолжительность жизни. Обнаружено, что мухи из этих линий устойчивы к различного вида стрессам (Service et al., 1985). Самцы и самки из выведенных линий особенно устойчивы к голоду, сухости и к парам 15 % этанола

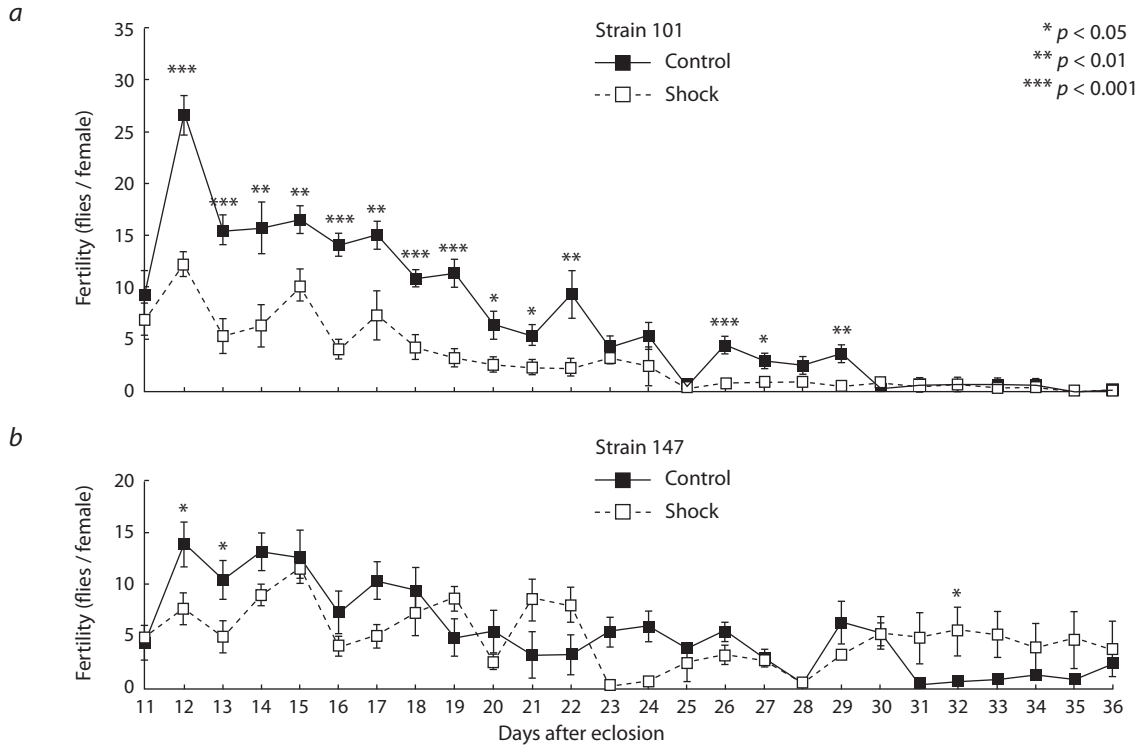


Fig. 2. Fertility of (*a*) *D. virilis* strain 101, capable of stress response and (*b*) not capable strain 147 under standard conditions and exposed to short-term heat shock (38 °C, 1 h weekly).

Each figure is a mean of 10 tests ± SE. Asterisks indicate the significance of differences from the control group.

(Service et al., 1985). Многие долгоживущие мухи устойчивы к окислительному стрессу (Kenyon, 2005; Partridge et al., 2005), вместе с тем отмечалось, что увеличение плодовитости у мух повышает восприимчивость к окислительному стрессу (Salmon et al., 2001). В экспериментах также показано, что долгоживущие линии *Drosophila* более устойчивы к различным стрессирующим факторам, чем короткоживущие (Luckinbill, 1998). Однако есть исследования, вообще отвергающие существование такой связи для обоих полов *Drosophila* (Force et al., 1995; Zwaan et al., 1995; Harshman et al., 1999). Полученные нами данные тоже не подтверждают наличия корреляции стресс-устойчивости и продолжительности жизни: в нормальных условиях особи R- и NR-линий не различаются по средней продолжительности жизни (см. рис. 1).

В биологии существует понятие «гормезис», характеризующее ситуацию, когда слабый стресс приводит к последующим положительным эффектам. Были найдены свидетельства в пользу того, что этот феномен имеет место и в случае с продолжительностью жизни. Так, краткий тепловой шок может увеличить продолжительность жизни мух и червей (Lithgow et al., 1995; Hercus et al., 2003; Apfeld et al., 2004). Показано, что сверхэкспрессия фактора теплового шока HSF-1 сопряжена с увеличением продолжительности жизни у *Caenorhabditis elegans* (Hsu et al., 2003; Morley, Morimoto, 2004). Возможно, это интересное явление объясняется тем, что стресс активирует HSF-1, тем самым активируя гены малых белков теплового шока на протяжении всей жизни и увеличивая ее продолжительность (Hsu et al., 2003). Следует также упомянуть работу (Krebs, Loeshke, 1999), авторы которой, проанализировав 100 изосамочьих линий *Drosophila buzzatii*, обнаружили, что большая часть корреляций между устойчивостью к кратковременному тепловому стрессу и приспособленностью (выживаемостью, временем личиночного развития, плодовитостью и продолжительностью жизни) носит положительный характер. Это хорошо согласуется с нашими данными (см. табл. 1, 2 и рис. 1, 2) о более высокой приспособленности устойчивой к стрессу линии 101 (R) *D. virilis* (выживаемость, время личиночного развития, плодовитость) по сравнению с не способной к стресс-реакции линией 147 (NR).

Все вышеизложенное позволяет предположить, что приспособленность позитивно коррелирует со способностью к неспецифической нейрогормональной стресс-реакции, обеспечивающий стресс-устойчивость ко всем видам раздражителей. Тогда как специфическая устойчивость к различным факторам (голоданию, высыханию, нагреву и т. д.) может обеспечиваться оптимизацией конкретных метаболических путей, ответственных за адаптацию к определенному раздражителю, и не коррелировать с общим уровнем приспособленности. Сходную точку зрения высказывают М. Джавадан с соавторами (Djawadan et al., 1998): они полагают, что устойчивость к различным формам стресса обусловлена разными физиологическими механизмами и что ответ мух на стресс-селекцию является специфичным. В связи с этим особенно перспективным в изучении роли стресс-реакции в адаптации видится подход, примененный в настоящей работе, – не селективный отбор неустойчивых к стрессорному воз-

действию линий *Drosophila*, а использование линии, не способной к стресс-реакции в результате мутации, нарушающей все ее звенья.

Наиболее интересны с этой точки зрения наши результаты по влиянию на приспособленность R- и NR-особей стрессирующих воздействий различной интенсивности. Если в нормальных условиях, как уже было сказано выше, R-мухи имеют явное адаптивное преимущество за счет более высокой плодовитости, то в условиях стресса картина резко меняется. Слабый периодический стресс заметно увеличивает период репродукции NR-особей, притом что репродуктивный период R-особей остается на том же уровне (см. табл. 1 и 2). Также при слабом стрессировании падает интенсивность плодовитости R-особей, тогда как плодовитость NR-мух остается на прежнем уровне (см. рис. 2). Это свидетельствует о том, что в таких условиях NR-особи, несмотря на свою более низкую плодовитость, получают репродуктивное преимущество перед R-особями: увеличение продолжительности жизни и более длительный период репродукции при редком стрессировании, а также отсутствие сокращения продолжительности жизни (в отличие от R-мух) при более частом стрессировании (см. рис. 1 и 2).

В условиях жесткого стресса явное репродуктивное преимущество имеют R-особи, поскольку при более низкой плодовитости NR-мух сильное стрессорное воздействие значительно редуцирует их репродуктивный период (см. табл. 1 и 2), что, по-видимому, адаптивно более значимо, чем меньшая продолжительность жизни в условиях сильного стресса, наблюдавшаяся у R-мух по сравнению с NR (см. рис. 1).

Таким образом, можно заключить, что в нормальных условиях и в условиях сильного стресса адаптивное преимущество имеют R-особи, а в условиях слабого стресса – NR-особи. Это свидетельствует в пользу гипотезы, что для популяции в целом адаптивным является баланс аллелей R и NR, поскольку позволяет ей приспосабливаться к любым условиям.

Acknowledgements
The work was supported by State Budgeted Projects 0324-2018-0016.

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References
Раушенбах И.Ю. Стресс-реакция насекомых: механизм, генетический контроль, роль в адаптации. Генетика. 1997;33(8):1110-1118. [Rauschenbach I.Yu. Stress-response in insects: mechanism, genetic control, and role in adaptation. Genetika = Genetics (Moscow). 1997;33:1110-1118. (in Russian)]

Раушенбах И.Ю., Шумная Л.В. Биогенные амины в реакции стресса у насекомых. Успехи соврем. биологии. 1993;113:327-335. [Rauschenbach I.Yu., Schumnaja L.V. Biogenic amines in the stress reaction in insects. Uspekhi Sovremennoy Biologii = Advances in Current Biology. 1993;113:327-335. (in Russian)]

Apfeld J., O'Connor G., McDonagh T., DiStefano P.S., Curtis R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. Genes Dev. 2004;18(24):3004-3009. DOI 10.1101/gad.1255404.

Chernysh S.I. Neuroendocrine system in insect stress. In: Ivanovic J., Jankovic-Hladni M. (Eds.). Hormones and Metabolism in Insect Stress. Boca Raton: CRC Press, 1991;69-98.

Djawadan M., Chippindale A.K., Rose M.R., Bradley T.J. Metabolic reserves and evolved stress resistance in *Drosophila melanogaster*. Physiol. Zool. 1998;71(5):584-594.

Force A.G., Staples T., Soliman S., Arking R.A. Comparative and evolved stress analysis of genetically selected *Drosophila* strains with different longevities. Dev. Genet. 1995:17(4):340-351.

Goodman W.G., Granger N.A. The Juvenile Hormones. In: Comprehensive Molecular Insect Science. Vol. 3. Oxford: Elsevier, 2005; 319-408.

Gruntenko N.E., Bogomolova E.V., Adonyeva N.V., Karpova E.K., Menshanov P.N., Alekseev A.A., Romanova I.V., Li S., Rauschenbach I.Y. Decrease in juvenile hormone level as a result of genetic ablation of the *corpus allatum* cells affects the synthesis and metabolism of stress related hormones in *Drosophila*. J. Insect Physiol. 2012;58:49-55. DOI 10.1016/j.jinsphys.2011.09.015.

Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. J. Insect Physiol. 2008;54:902-908.

Hanna M.E., Bednárová A., Rakshit K., Chaudhuri A., O'Donnell J.M., Krishnan N. Perturbations in dopamine synthesis lead to discrete physiological effects and impact oxidative stress response in *Drosophila*. J. Insect Physiol. 2015;73:11-19. DOI 10.1016/j.jinsphys.2015.01.001.

Harshman L.G., Moore K.M., Sty M.A., Magwire M.M. Stress resistance and longevity in selected lines of *Drosophila melanogaster*. Neurobiol. Aging. 1999;20:521-529.

Hercus M.J., Loeschcke V., Rattan S.I.S. Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. Biogerontology. 2003;4:149-156.

Hirashima A., Sukhanova M.Jh., Rauschenbach I.Yu. Biogenic amines in *Drosophila virilis* under stress conditions. Biosci. Biotech. Biochem. 2000;64:2625-2630.

Hsu A.L., Murphy C.T., Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. Science. 2003;300:1142-1145.

Kenyon C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. Cell. 2005;120(4):449-460.

Krebs R.A., Loeschcke V. A genetic analysis of the relationship between life-history variation and heat-shock tolerance in *Drosophila buzzatii*. Heredity (Edinb). 1999;83:46-53.

Lithgow G.J., White T.M., Melov S., Johnson T.E. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995;92:7540-7544.

Luckinbill L.S. Selection for longevity confers resistence to low-temperature stress in *Drosophila melanogaster*. J. Gerontol. 1998;53: 147-153.

Morley J.F., Morimoto R.I. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. Mol. Biol. Cell. 2004;15(2):657-664.

Moskalev A., Zhikrivetskaya S., Krasnov G., Shaposhnikov M., Proshkina E., Borisoglebsky D., Danilov A., Peregudova D., Sharapova I., Dobrovolskaya E., Solovev I., Zemskaya N., Shilova L., Snezhkina A., Kudryavtseva A. A comparison of the transcriptome of *Drosophila melanogaster* in response to entomopathogenic fungus, ionizing, starvation and cold shock. BMC Genomics. 2015; 16(Suppl.13):S8. DOI 10.1186/1471-2164-16-S13-S8.

Partridge L., Gems D., Withers D.J. Sex and death: what is the connection? Cell. 2005;120:461-472.

Rauschenbach I.Yu., Gruntenko N.E., Khlebodarova T.M., Mazurov M.M., Grenback L.G., Sukhanova M.Jh., Shumnaja L.V., Zakharov I.K., Hammock B.D. The role of the degradation system of the juvenile hormone in the reproduction of *Drosophila* under stress. J. Insect Physiol. 1996;42:735-742.

Rose M.R. Laboratory evolution of postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. Evolution. 1984;38:1004-1010.

Salmon A.B., Marx D.B., Harshman L.G. A cost of reproduction in *Drosophila melanogaster*: stress susceptibility. Evolution. 2001;55(8): 1600-1608.

Sarup P., Sørensen P., Loeschcke V. The long-term effects of a life-prolonging heat treatment on the *Drosophila melanogaster* transcriptome suggest that heat shock proteins extend lifespan. Exp. Gerontol. 2014;50:34-39. DOI 10.1016/j.exger.2013.11.017.

Service P.M., Hutchinson E.W., Mackinley M.D., Rose M.R. Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postpone senescence. Physiol. Zool. 1985;58:380-389.

Śwęidrych A., Lorene-Kukuła K., Skirycz A., Szopa J. The catecholamine biosynthesis route in potato is affected by stress. Plant Physiol. Biochem. 2004;42:593-600.

Tower J. Aging mechanisms in fruit flies. Bioessay.1996;18(10):799-807.

Zwaan B., Bijsma R., Hoekstra R.A. Direct selection on life span in *Drosophila melanogaster*. Evolution. 1995;49:649-659.

ORCID ID

N.E. Gruntenko orcid.org/0000-0003-3272-1518

Алфавитный указатель авторов статей, опубликованных в журнале в 2018 г.

Прием статей через электронную редакцию на сайте http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/"Vavilov Journal of Genetics and Breeding"
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
"The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists".

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНИТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.
Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.
Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.
Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.
Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.
Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 19.12.2018. Выход в свет 29.12.2018. Формат 60 × 84 $^1/_8$. Усл. печ. л. 23.02.
Уч.-изд. л. 26.5. Тираж 150 экз. Заказ № 320. Цена свободная.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.