Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.
Периодичность 8 выпусков в год

Учредители

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)
Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)
Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

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

Редакционная коллегия

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

2017 • 21 • 6

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii

Founded in 1997
Published 8 times annually

Founders

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

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

Deputy Editor-in-Chief
N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia
N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

Editorial council

V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
L.A. Bespalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia
A. Börner, Dr. Sci., Germany
M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan
G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
V.M. Govorun, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
J. Le Gouis, Dr. Sci., France
I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany
S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil
L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands
V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia
V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States
A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia
A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States
S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
K.G. Skryabin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States
I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia
L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
T.G. Amstislavskaya, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia
Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.V. Berezikov, Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia, Netherlands
S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.A. Dolgikh, Cand. Sci. (Biology), Russia
N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
T.A. Gavrilenko, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.L. Kiselev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.A. Kozlov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany
I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany
L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia
M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
N.A. Provorov, Dr. Sci. (Biology), Russia
D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States
E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.A. Stepanov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

СОДЕРЖАНИЕ • 2017 • 21 • 6

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

СОДЕРЖАНИЕ • 2017 • 21 • 6

© ИЦиГ СО РАН, 2017
© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2017
© Сибирское отделение Российской академии наук, 2017

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

CONTENTS • 2017 • 21 • 6

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

CONTENTS • 2017 • 21 • 6

© Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 2017
© Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2017
© Siberian Branch RAS, 2017

Уважаемые коллеги, дорогие читатели!

Текущий выпуск Вавиловского журнала генетики и селекции открывает серия работ, посвященных сохранению и оценке генетических ресурсов. Обобщены сведения по одной из старейших и крупнейших мировых коллекций винограда – ампелографической коллекции института «Магарач», и обсуждаются аспекты ее сохранения. Неотъемлемым способом оценки биоресурсных коллекций в настоящее время являются методы анализа полиморфизма ДНК, применение которых позволяет получать генетические паспорта для идентификации образцов, а также исследовать их генетическое сходство. Представлены результаты работ в этом направлении, полученные в рамках изучения коллекции дагестанских аборигенных сортов винограда и коллекции облепихи НИИ садоводства Сибири.

В одной из статьей номера рассматривается коллекция микроорганизмов ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Сделан акцент на использовании данной коллекции как генетического ресурса для биотехнологии и биоинженерии. Авторы подчеркивают, что эта возможность обусловлена не только высоким видовым разнообразием входящих в коллекцию штаммов и широким ареалом их выделения, но и глубиной их характеризации с применением широкого арсенала современных методов.

Эффективным способом сохранения генетических ресурсов млекопитающих являются методы криоконсервирования семени. Представлено сравнение двух методов криоконсервации семени домашнего кота, который служит модельным объектом для разработки эффективных методов криоконсервирования семени исчезающих видов кошачьих.

Традиционно большой интерес вызывает описание новых методов исследований и протоколов экспериментальных работ. В выпуске опубликованы протокол получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки и протокол оценки морфологии гранул картофельного крахмала методом микроскопирования.

В статьях из раздела по генетике и селекции растений особое внимание уделено механизмам и источникам устойчивости сельскохозяйственных видов растений к фитопатогенам. Представлены также работы по оценке комбинационной способности линий зернового сорго и анализу взаимодействия генотипа и среды на основе изучения линий ярового ячменя. Отдельного упоминания заслуживает обобщение новейших сведений по внутривидовой классификации гороха – «On three cultivated subspecies of pea (*Pisum sativum* L.)».

Завершает выпуск обзорная статья, посвященная роли мобильных элементов в эпигенетических преобразованиях геномов в онтогенезе.

Редколлегия обращает внимание читателей на возможность знакомиться не только с обзорными и оригинальными статьями, протоколами и методами, публикуемыми в рамках регулярных выпусков, но и с материалами по истории генетики, гипотезами и комментариями, представленными в нашем электронном информационном ресурсе «Письма в Вавиловский журнал» (http://www.bionet.nsc.ru/vogis/people/).

Академик В.К. Шумный

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):608-616
DOI 10.18699/VJ17.276

Генетические ресурсы винограда института «Магарач». Проблемы и перспективы сохранения

А.А. Полулях, В.А. Волынкин, В.В. Лиховской ✉

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» Российской академии наук, Ялта, Республика Крым, Россия

Проблема сбора, сохранения и стабильного использования генетических ресурсов винограда важна для современной науки, успешного развития промышленного виноградарства, современных людей и будущих поколений. Генетические ресурсы винограда института «Магарач» сосредоточены в ампелографической коллекции, одной из старейших и крупнейших мировых коллекций винограда, которая содержит 4120 образцов, в том числе 763 образца специальной селекционной коллекции и 3357 образцов базовой коллекции винограда. Ботаническое разнообразие базовой коллекции представлено тремя видами рода *Ampelopsis* Michaux, двумя видами рода *Parthenocissus* Planch., 22 видами рода *Vitis* Linn., 612 сортами межвидового происхождения, 2162 сортами *Vitis vinifera sativa* D.C. и т. д. Специфика сохранения полевой коллекции винограда – культуры, которая размножается вегетативно, зависит от следующих обстоятельств: привитой культуры, многолетнего характера насаждений, генетического разнообразия образцов, которые обладают различной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды, и условий возделывания. Для успешной закладки и сохранения коллекции в будущем, необходимо привлечение принципиально новой технологии возделывания коллекции и применение методик выращивания оздоровленного посадочного материала. Кроме традиционного способа сохранения генетических ресурсов винограда в полевой коллекции, разработан метод хранения коллекционного генофонда винограда *in vitro* в условиях минимального роста. В институте «Магарач» в культуре *in vitro* сформирована вегетирующая коллекция 40 сортов, гибридов и клонов винограда. Эффективным путем решения проблемы сохранения генофонда мог бы служить метод криоконсервации, который является основным способом сохранения генетического материала некоторых плодовых и ягодных культур. Однако в настоящее время метод криоконсервации виноградной лозы, учитывая трудности преодоления криоповреждений биологического материала винограда в условиях сверхнизких температур, остается наиболее сложным, и риск потери коллекции довольно высокий. На сегодняшний день основной метод сохранения генетических ресурсов винограда – это полевая коллекция. Формирование коллекций винограда в культуре *in vitro* рассматривается как дополнение к основному методу. В дальнейшем остается целесообразным развитие методов хранения растительного материала винограда в условия сверхнизких температур – как технологии будущего.

Ключевые слова: генетические ресурсы винограда; ампелографическая коллекция; коллекция винограда *in vitro*; криосохранение винограда.

Problems and prospects of grapevine genetic resources preservation at “Magarach” Institute

A.A. Polulyakh, V.A. Volynkin, V.V. Likhovskoi ✉

All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking “Magarach” RAS, Yalta, Republic of the Crimea, Russia

Collection, preservation and effective use of grapevine genetic resources is vital for the development of ampelography as a subdiscipline of botany, for the successful development of industrial viticulture for contemporaries and future generations. The grapevine genetic resources of the Institute “Magarach” constitute one of the world’s oldest and richest ampelographic collections containing 4120 samples, of which 763 make a special selected collection and 3357 are in the base collection. The botanical diversity of the base collection is represented by three species of the genus *Ampelopsis* Michaux, two species of the genus *Parthenocissus* Planch., 22 species of the genus *Vitis* Linn., 612 varieties of interspecific origin, 2162 varieties of *Vitis vinifera sativa* D.C. and others. The specificity of preserving the field collection of grapevines – a culture that reproduces vegetatively – depends on the following factors: graft culture, perennial nature of the plants, genetic diversity of samples, which vary as to their resistance to biotic and abiotic environmental factors, and cultivation conditions. The successful establishment and conservation of future collections require fundamentally new cultivation techniques and application of cultivation methods involving revitalized grape planting stock. To supplement the traditional method of grapevine genetic resources conservation in the field collection, we have developed a method of preserving the gene pool collection *in vitro* under the minimal growth conditions. At the institute “Magarach” we have formed a vegetative collection of 40 grapevine varieties, hybrids and clones *in vitro*, and this work is under way. An effective way to solve the problem of gene pool preservation is cryopreservation, which is the main way of preserving genetic material of some crops. At present, the method of cryopreservation of the vine, considering the difficulties of overcoming the cryogenic damages of the biological material of grapes at ultra-low temperatures, remains the most difficult and chances of losing the collection are quite high. Thus, at present field collection is the main method of grape genetic resources conservation. Formation of *in vitro* grapevine collections method is considered a subsidiary one. In

Received 28.12.2016
Accepted for publication 01.05.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: selectmagarach@mail.ru

the future, it is expedient to develop methods for storing the plant material of grapes at ultra-low temperatures as a future technology.

Key words: grapevine genetic resources; ampelographic collection; *in vitro* grapevine collection; cryopreservation of grapes.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Полулях А.А., Волынкин В.А., Лиховской В.В. Генетические ресурсы винограда института «Магарач». Проблемы и перспективы сохранения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):608-616. DOI 10.18699/VJ17.276

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

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

Мобилизация и сохранение генетических ресурсов растений для их дальнейшего использования имеют большое значение как для народного хозяйства нашей страны, так и для всего человечества (FAO, 2017). Генетические ресурсы культурных растений с ценными хозяйственными признаками, использующихся для производства продуктов питания и создания сырья для промышленности, обеспечивают стабильное развитие и функционирование экологически безопасной сельскохозяйственной отрасли народного хозяйства в условиях постоянных изменений природно-климатических условий и социальных обстоятельств. Рост населения и экономическое развитие стран вносят весомые изменения в условия жизни всех организмов и экологических систем нашей планеты. Внедрение новых интенсивных технологий возделывания культур с использованием интродуцентов, реконструкция старых насаждений, уменьшение количества сортов в промышленных насаждениях (внедрение монокультур), исчезновение во многих местах диких родичей культурных растений под влиянием антропогенных факторов – все это приводит к реальной угрозе потери значительного числа растительного разнообразия (Рябчун, Богуславський, 2002; FAO, 2017).

Мобилизация сортовых ресурсов винограда в ампелографической коллекции, как показано учеными многих стран (Eiras-Dias, 2008; Lacombe, 2008; Maghradze et al., 2015a), играет важную роль в сохранении и использовании генофонда винограда. Это объясняется тем, что существует реальная угроза потери значительного числа сортов в связи с исчезновением во многих регионах мира дикорастущего винограда, уменьшением количества сортов в промышленных насаждениях, реконструкцией старых насаждений и т. д. Большинство аборигенных и малораспространенных сортов винограда в настоящее время сохранилось только благодаря коллекциям (Dettweiler, 1990; Волынкин, Полулях, 2004). Известно, что местный сортимент винограда формировался в течение длительного времени в определенных условиях конкретного региона и имеет ряд ценных признаков (Volynkin et al., 2012). Древние, так называемые местные сорта и формы, созданные «народной селекцией», характеризуются высокой приспособленностью к условиям возделывания, стойкостью или толерантностью к болезням и вредителям, несут разнообразные и непревзойденные показатели качества продукции. Это свойственно и для сортов винограда, созданных мировой научной селекцией с использованием источников из различных центров происхождения винограда для разных регионов мира. Дикие виды и дикорастущие формы, родственники культурного винограда, тоже несут множество ценных генов и признаков, наследственная основа которых служит неисчерпаемым источником исходного материала для создания новых поколений сортов винограда. На сегодняшний день, благодаря применению новых технологий, развитию биотехнологии и генной инженерии, значительно возросла ценность и роль зародышевой плазмы как исходного материала для селекции. Многогранность этой проблемы состоит также в том, что ни одна страна мира не может самостоятельно обеспечить себя растительным разнообразием (Рябчун, Богуславський, 2002; Cooper, 2002; FAO, 2014, 2017). Поэтому сохранение генетических ресурсов винограда имеет огромное значение как для современной науки и современных людей, так и для будущих поколений. В настоящее время проблема сбора, сохранения и стабильного использования генетических ресурсов винограда института «Магарач» чрезвычайно важна для успешного развития виноградарства Республики Крым.

Генетические ресурсы винограда

Генетические ресурсы винограда института «Магарач» собраны в ампелографической коллекции, одной из крупнейших и старейших коллекций винограда в мире, что отмечалось на международных научных форумах и специализированных интернет-сайтах (Dettweiler et al., 2004; Maul, This, 2008). Формирование коллекции тесно связано с основанием Никитского ботанического сада (1814 г.) и института «Магарач» (1928 г.) (Авидзба и др., 2015) и совпадает с периодом начала коллекционирования сортов винограда в Европе. Первая ампелографическая коллекция была заложена аббатом Розье в Академии г. Марселя в 1780 г. (Наумова, Ганич, 2015). В XVIII веке в большинстве европейских стран (Германия, Франция и др.) существовали крупные частные коллекции винограда, содержащие несколько сотен сортов (Maul et al., 2015). Уникальность коллекции института «Магарач» состоит в том, что на протяжении двух столетий она пополнялась сортообразцами из различных виноградарских регионов мира: Европы, Азии, Африки и Северной Америки, и большинство из них сохранилось до наших дней. Всего коллекция винограда института «Магарач» содержит 4120 образцов и включает базовую коллекцию винограда, которая насчитывает 3357 образцов (http://magarach-institut.ru; http://www.ckp-rf.ru), и специальную селекционную коллекцию, в которую входят селекционные сорта и формы института

Table 1. World's largest collections of grapevine*

Country	Institute	Number of accessions
France	UFR de Viticulture, Centre ENSA.M/INRA, Montpellier	7179
USA	Agrarian University of Florida	5952
India	Agrarian Institute, Bangalore	3900
Germany	Total number in *ex situ* field collections	5500
	Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof	2582
Spain	Junta de Andalucia, Consejeria de Agricultura y Pesca	1452
	Departamento de Biologia Vegetal Universidad Politecnica de Madrid	2573
Greece	Research Center of Makedonia and Thraki Greek Gene Bank	259
	NAGREF Vine Institute	791
Italy	Istituto Sperimentale per la Viticoltura	2223
	Centro Miglioramento Genetico e Biologia della Vite	404
	Istituto Agrario di San Michele all'Adige	1564
	Universita degli Studi di Udine	349
Bulgaria	Institute of Viticulture and Oenology, Pleven	1676
Moldova	Institut National de la Vigne et du Vin	2574
Russia	Anapa Ampelographic Collection of the North Caucasian Regional Research Institute of	4901
	Horticulture and Viticulture	4120

* Sources: Maul, This (2008); Avidzba et al. (2015); Naumova, Ganich (2015).

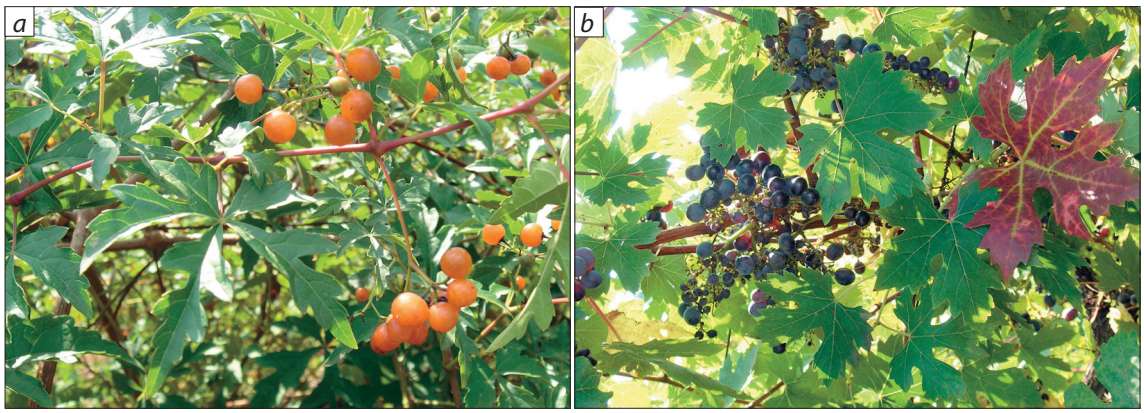


Fig. 1. Wild relatives of *V. v.* ssp. *sativa* DC.: *a*, genus *Ampelopsis* Michaux; *b*, wild forest grapevine *V. v.* ssp. *sylvestris* (C. C. Gmel.) Hegi

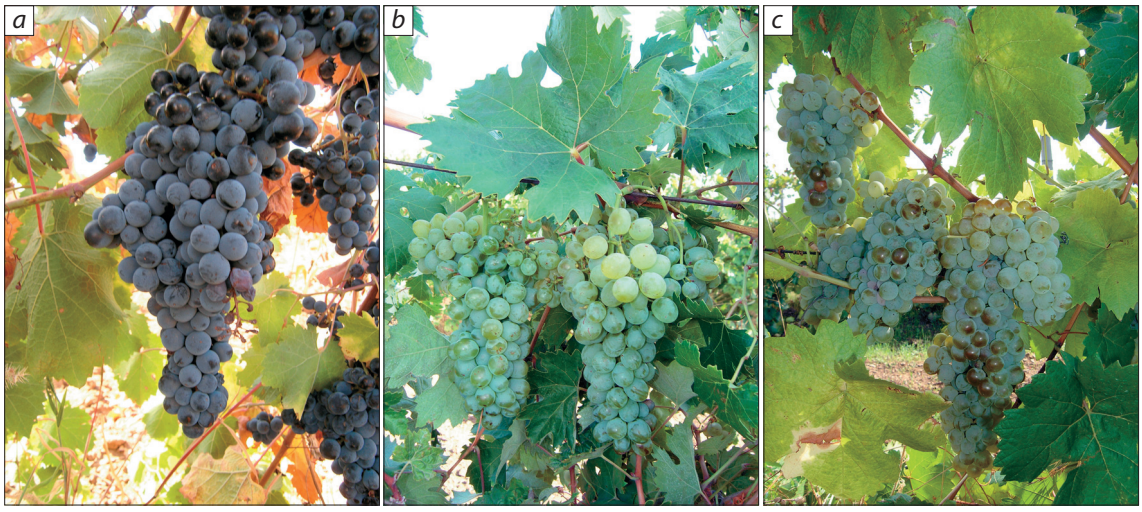


Fig. 2. Grapevine varieties of the Magarach ampelographic collection: *a*, Merlot; *b*, – Kokur white; *c*, Bulanyy white.

«Магарач» – 763 образца. Благодаря большому количеству образцов винограда и их генетическому разнообразию коллекция института «Магарач» получила мировое признание и официально зарегистрирована в FAO (Полулях, Волынкин, 2008, 2014). По числу образцов коллекция занимает пятое место в ряду самых крупных мировых коллекций винограда (табл. 1), первенство принадлежит французской коллекции в г. Монпелье – 7179 образцов. Во многих странах создано несколько коллекций винограда при научных учреждениях. Например, в Германии в настоящее время шесть государственных учреждений поддерживают около 5500 образцов в коллекциях *ex situ* (Maul, This, 2008).

В коллекции института «Магарач» собраны образцы из виноградарских регионов Европы, Азии, Африки и Северной Америки. Установлено, что сортообразцы происходят из 29 стран дальнего и 12 стран ближнего зарубежья (Авидзба и др., 2004, 2015; Полулях, Волынкин, 2008, 2014). Семейство Vitaceae Lindley. в коллекции представлено тремя видами рода *Ampelopsis* Michaux (рис. 1, *а*), двумя видами рода *Parthenocissus* Planch. и 22 видами рода *Vitis* Linn. (табл. 2). Европейско-азиатский вид *Vitis vinifera* L. в коллекции представлен подвидами *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (C.C. Gmel.) Hegi. – дикий лесной виноград (см. рис. 1, *б*) и *Vitis vinifera sativa* D.C. – культурный виноград. Подвид *Vitis vinifera sativa* D.C. в коллекции представлен 730 селекционными сортами внутривидового скрещивания и 1432 местными и аборигенными сортами разных стран. Одна из важных задач сбора и сохранения генофонда рода *Vitis* во многих странах мира – сохранение местных сортов винограда, которые являются исключительно частью природного наследия и не произрастают в других винных регионах (Pelengic, Koruza, 2012; Li et al., 2015; Maul et al., 2015). 75 местных сортов винограда Крыма наиболее полно сохранились только в ампелографической коллекции «Магарач».

Местные сорта винограда разных стран представлены в коллекции тремя эколого-географическими группами: бассейна Черного моря – *Vitis vinifera sativa* convar. *pontica* Negr., западноевропейской – *Vitis vinifera sativa* convar. *occidentalis* Negr. и восточной – *Vitis vinifera sativa* convar. *orientalis* Negr. (Негруль, 1946). К местному сортименту Западной Европы convar. *occidentalis* Negr. относятся в основном сорта технического направления использования (101 сорт), которые обладают относительной морозостойкостью и хорошей экологической пластичностью: Алиготе, Рислинг рейнский, Каберне-Совиньон, Шардоне, Мерло (рис. 2, *а*) и т. д. Сортимент эколого-географической группы Черного моря convar. *pontica* Negr. представлен 249 местными сортами Грузии, России, Молдовы, стран Балканского полуострова, в том числе высокоурожайными винными и столовыми сортами Саперави, Ркацители розовый, Плавай, Кокур белый (см. рис. 2, *б*), Чауш, Буланый белый (см. рис. 2, *в*) и др. Группа восточных сортов convar. *orientalis* Negr. в коллекции самая многочисленная – 407 сортов. Это сорта в основном столового направления использования: Шабаш (рис. 3, *а*), Хусайне келим бармак (см. рис. 3, *б*), Тайфи белый (см. рис. 3, *в*), Нимранг, Хусайне люда и др., а также группа бессемянных сортов: Кишмиш белый овальный, Кишмиш розовый, Кишмиш мраморный (рис. 4) и др. В коллекции также собраны 123 клона (21 сорта) винограда (Полулях, Волынкин, 2015).

Table 2. Grapevine genetic resources at Magarach *

Index	Number accessions
Total number of accessions in the base collection	3357
Including:	
V. v. sativa D.C. (local and autochthonous varieties)	1432
V. v. sativa D.C. (bred varieties)	730
V. v. ssp. *sylvestris* (C.C. Gmel.) Hegi.	106
Interspecific hybrids:	612
varieties – interspecific hybrids	495
hybrids *Vitis vinifera* L. × *Vitis amurensis* Rupr.	82
hybrids *Vitis vinifera* L. × *Vitis labrusca* L.	28
hybrids *Vitis riparia* Michx.	6
hybrids *Vitis rupestris* Scheele.	1
Clones	123 clones (21 varieties)
Wild grapevine species:	27
genus *Ampelopsis* Michaux	3
genus *Parthenocissus* Planch.	2
genus *Vitis* Linn.	22
Samples with unclear status	327
Varieties and forms bred at Magarach (special breeding collection)	763
Total:	4120

* Source: Polulyakh, Volynkin (2015).

Сортов межвидового происхождения (см. табл. 2) в коллекции насчитывается 612 (Полулях, Волынкин, 2015), в том числе: 495 межвидовых гибридов, которые являются гибридами трех и более видов винограда (это 14 сортов селекции Сейв Виллара и других французских оригинаторов (Виллар нуар, Мускат де Сен Валье, Перль нуар и др.), 7 сортов-подвоев (Берландиери × Рипариа Кобер 5ББ, Берландиери × Рипариа СО4 и др.) и сорта современной селекции с групповой устойчивостью: Подарок Магарача (рис. 5, *а*), Красень (см. рис. 5, *б*), Ялтинский бессемянный (см. рис. 5, *в*), Цитронный Магарача, Молдова, Кодрянка, Регент, Сириус и др.); гибриды *Vitis vinifera* L. × *Vitis amurensis* Rupr. (82 сорта): Буйтур, Фиолетовый ранний, Агат донской, Выносливый, Голубок и др.; гибриды американских видов, которые обладают устойчивостью к грибным болезням, филлоксере и повышенной морозостойкостью: *Vitis vinifera* L. × *Vitis labrusca* L. (28 сортов), *Vitis riparia* Michx. (6 сортов) и *Vitis rupestris* Scheele. (1 сорт).

Базовая полевая коллекция винограда

Базовая коллекция винограда института «Магарач» находится в Западном предгорно-приморском природном виноградарском регионе Крыма (с. Вилино, Бахчисарайский район, Автономная Республика Крым). Климатические условия этого региона позволяют выращивать виноград всех периодов созревания без укрытия кустов на зиму. Коллек-

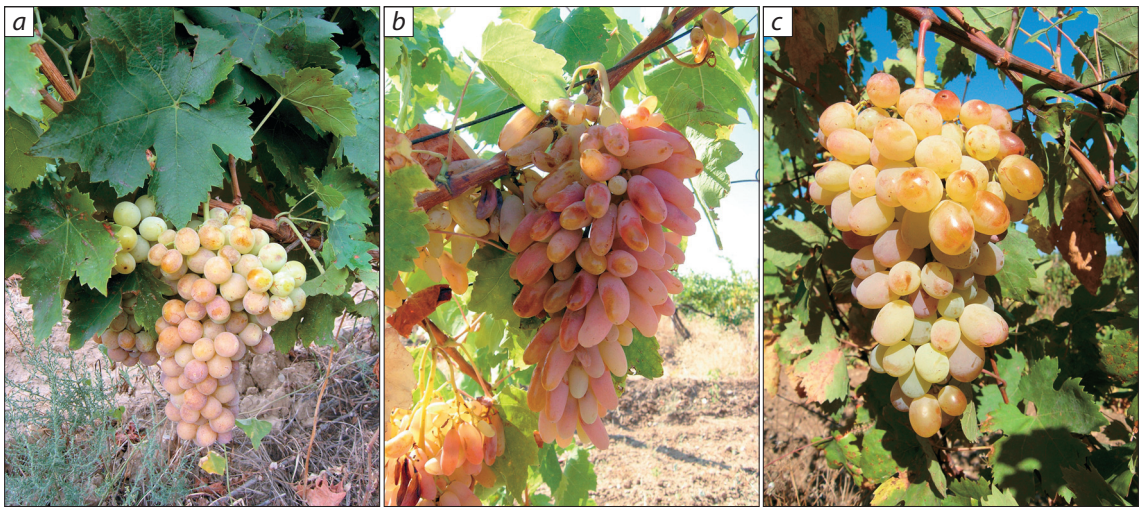


Fig. 3. Table grapes of the Institute "Magarach" ampelographic collection: *a*, Shabash; *b*, Husaine Kelim barmak; *c*, Tayfi white.

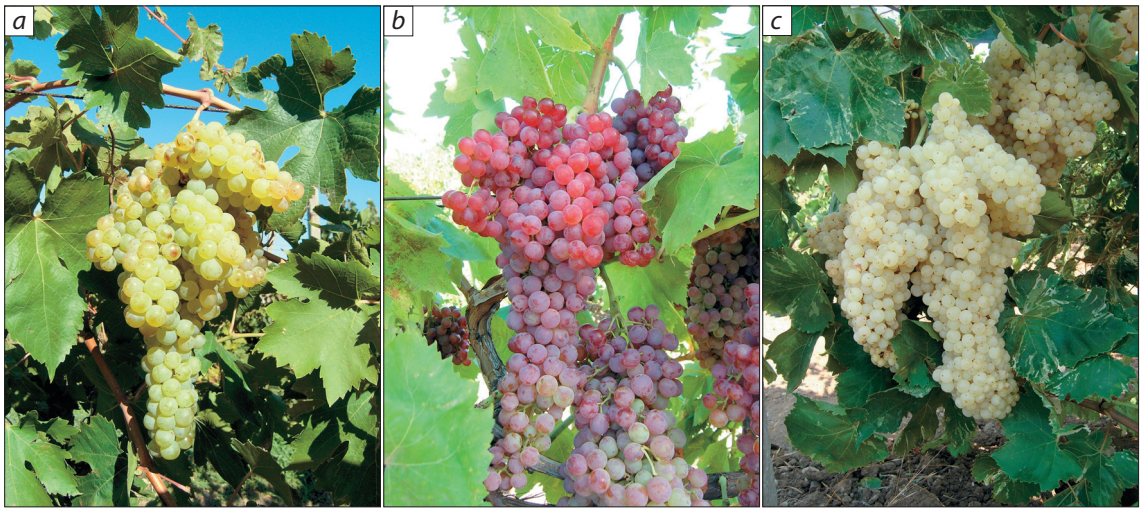


Fig. 4. Seedless grapevines of the Institute "Magarach" ampelographic collection: *a*, Sultana white oval; *b*, Sultana pink; *c*, Marble Sultana.

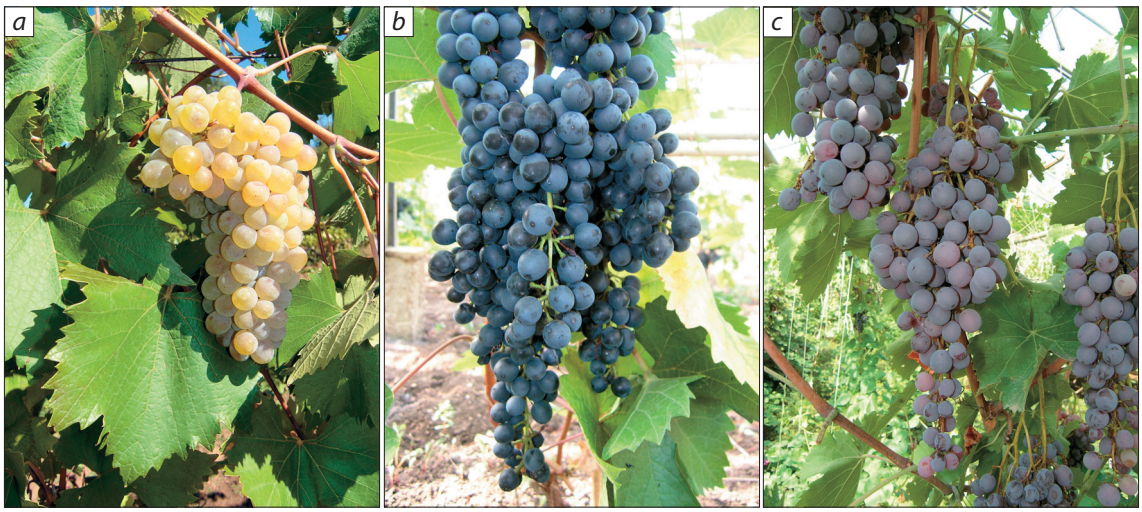


Fig. 5. Grapevine varieties bred at the Institute "Magarach": *a*, Podarok Magaracha; *b*, Krasen; *c*, Yalta seedless.

ция заложена в 1978–1988 гг., привита на филлоксероустойчивом подвое Кобер 5ББ. Площадь участка, который занимает коллекция, составляет 16 га. Агротехнический уход осуществляется по правилам, общепринятым для данного региона виноградарства. В основу размещения сортов положен эколого-географический принцип: сорта сгруппированы в кварталы по месту их происхождения или наибольшего распространения. Каждый образец в коллекции представлен 10 кустами. Это удобно для проведения ампелографических исследований с целью установления истинности сортов, выявления синонимов, выделения сортогрупп и сортотипов, выяснения вопросов происхождения и систематики винограда. Сравнительное изучение по хозяйственным признакам образцов, которые находятся в одинаковых климатических и агротехнических условиях, позволяет выделять источники ценных хозяйственных признаков для производства и селекции, проводить селекционные и научные исследования (Авидзба и др., 2004; Полулях, Волынкин, 2008, 2014).

Полевая коллекция винограда *ex situ* включает 3 357 генетически гетерогенных образцов винограда. Специфика сохранения коллекции винограда как культуры, которая размножается вегетативно, во многом зависит от следующих факторов.

1. Зона распространения филлоксеры на Крымском полуострове требует возделывания привитой культуры винограда. Генетически разнообразные образцы коллекции обладают различным аффинитетом, что приводит к слабому росту и плодоношению, недолговечности привитых растений. Также в процессе прививки создается большая раневая поверхность и возникает риск заражения бактериальными и вирусными болезнями.
2. Генетически разнообразные образцы коллекции, собранные из разных виноградарских регионов мира, обладают различной устойчивостью к болезням, вредителям винограда, критическим зимним температурам, экстремальной засухе и др. Поэтому на сохранность образцов коллекции влияют также экстремальные природные факторы, эпифитотии болезней. Например, в результате экстремальных зимних морозов 2006 г. в коллекции погибли 150 образцов винограда (Волынкин, Полулях, 2007).
3. Условия возделывания. Неправильный уход, недостаточная агротехника, недостаточное обеспечение влагой на фоне продолжительной засухи, недостаточная защита от болезней и вредителей винограда снижают жизнеспособность растений. Поэтому коллекционные насаждения требуют соблюдения агротехники на самом высоком уровне.
4. Многолетний характер насаждений. В процессе многолетнего возделывания, в результате воздействия антропогенных (неправильный уход, недостаточная агротехника), техногенных и природных факторов (критические зимние температуры, заморозки, засуха и др.), некоторая часть образцов и отдельных растений погибает, что в свою очередь приводит к изреженности коллекционных насаждений. Установлено, что проводить ремонт выпавших кустов эффективно до 5-летнего возраста виноградных насаждений. В дальнейшем приживаемость саженцев резко снижается из-за уплотненной в результате механизированных обработок структуры почвы и способности взрослых растений подавлять рост молодых. Как правило, после 20–25 лет эксплуатации виноградная коллекция требует перезакладки. Возраст кустов ныне существующей коллекции составляет 35–38 лет, и в настоящее время необходима немедленная перезакладка ампелографической коллекций института «Магарач».

Учитывая существующие трудности и проблемы сохранения коллекции винограда, в будущем для успешной закладки и сохранения новой коллекции, соответствующей международным стандартам создания генбанка винограда (Maghradze et al., 2015a), необходимо выполнение следующих условий.

1. Нынешняя технология возделывания винограда разработана для климатических условий середины прошлого века. Учитывая современные изменения климатических условий региона, необходимо применять принципиально новую технологию возделывания коллекции.
2. С учетом вирусных и бактериальных болезней, выявленных на ампелографической коллекции, для выращивания привитого посадочного материала необходимо привлечение методик получения оздоровленного посадочного материала.
3. Процесс перезакладки коллекции винограда – сложный и трудоемкий процесс, который требует обеспечения трудовыми ресурсами, специально обученными рабочими.

Сохранение и поддержание полевой коллекции винограда связано с большими затратами. Привлечение новой технологии возделывания коллекции, получение оздоровленного посадочного материала, обеспечение необходимого количества трудовых ресурсов значительно повышают стоимость перезакладки новой коллекции по сравнению со стоимостью закладки промышленного виноградника.

Кроме традиционного способа сохранения генетических ресурсов винограда в полевой коллекции *ex situ*, существуют другие подходы к сохранению генофонда: создание коллекций растений в культуре *in vitro* и длительное хранение образцов в контролируемых условиях низких и сверхнизких температур.

Сохранение генетических ресурсов винограда в культуре *in vitro*

В последнее время наряду с традиционными способами размножения и сохранения растений большое значение приобретают методы культуры изолированных тканей и органов *in vitro*, которые находят широкое применение для решения многих научно-теоретических и практических задач. Методы *in vitro* с использованием побегов, меристем и эмбрионов идеально подходят для сохранения зародышевой плазмы вегетативно размножаемых растений, в том числе винограда. Поддержание генплазмы винограда в виде каллусной ткани или суспензионной культуры нецелесообразно из-за сомаклональной изменчивости (Бутенко, 1964; Голодрига и др., 1986). Созданы коллекции в культуре тканей *in vitro* более 1000 видов растений (Ashmore, 1997). Существуют три основных направления хранения растительного материала в культуре *in vitro*, суть

которых заключается в соблюдении условий, способствующих: нормальной скорости роста, минимальному росту или прекращению роста. В настоящее время разработан метод хранения коллекционного генофонда винограда *in vitro* в условиях минимального роста без пересадок в течение 10–12 месяцев (Дорошенко, Хохлова, 1993; Tehrim, Sajid, 2011; Bosco et al., 2015; Дорошенко, Жукова, 2016). В отделе селекции, генетики и ампелографии института «Магарач» в культуре *in vitro* сформирована вегетирующая коллекция 40 сортов, гибридов и клонов винограда (Павлова, Клименко, 2008, 2009).

Ряд зарубежных исследователей рассматривают сохранение зародышевой плазмы виноградной лозы *in vitro* как альтернативу полевой коллекции и считают, что разработка эффективных и осуществимых способов ее хранения *in vitro* может обеспечить сбережение ценного биоразнообразия (Reed et al., 2004; Tehrim, Sajid, 2011; FAO, 2014; Bosco et al., 2015; Maghradze et al., 2015b). Культура *in vitro* дает возможность в малом пространстве поддерживать большое количество материала в среде, свободной от патогенов и влияния неблагоприятных природных факторов, а также в кратчайшие сроки получить большое количество растений при недостатке исходного материала и получить потомство, генетически идентичное исходному виду или форме (Бутенко, 1964; Голодрига и др., 1986; Волынкин и др., 2009; FAO, 2014). Данный метод может успешно применяться также для недолгосрочного хранения образцов винограда и транспортировки на дальние расстояния. Применение методов термотерапии и культуры меристем в культуре винограда *in vitro* позволяет получать оздоровленный посадочный материал (Бутенко, 1964; Голодрига и др., 1986; Дорошенко, Жукова, 2016).

Использование всех этих методов необходимо для получения оздоровленного посадочного материала при закладке новой полевой коллекции винограда, которую планируется провести в институте «Магарач», учитывая возраст существующей коллекции и ее фитосанитарное состояние. Для соответствия ампелографической коллекции института «Магарач» международному уровню целесообразно также формирование дуплетной коллекции в культуре *in vitro*.

Среди недостатков метода следует отметить, что поддержание коллекции в культуре *in vitro* предполагает сохранность только вегетирующего побега с листьями, что затрудняет идентификацию образцов и делает невозможным изучение хозяйственных характеристик сорта. Организация коллекции в культуре *in vitro* требует создания специальной лаборатории по клональному микроразмножению винограда, наличия фитотрона, присутствия дополнительных специалистов, владеющих навыками культивирования растений, наличия тепличного комплекса для адаптации растений, спецоборудования, которое будет гарантировать поддержание определенных условий содержания коллекции, что требует дополнительного финансирования.

Криосохранение генплазмы винограда

Эффективным путем решения проблемы сохранения генетических ресурсов растений, который исключает риск их потерь из-за биотических или абиотических стрессоров, может служить криоконсервация – метод долговременного хранения живых клеток и тканей при температуре жидкого азота (Markovic et al., 2013; Faltus et al., 2015; и др). На сегодняшний день криоконсервирование стало основным способом сохранения генетического материала таких культур, как рис, пшеница, арахис, маниока, сахарный тростник, кокос, некоторых плодовых и ягодных культур. Криобанки растений успешно функционируют в США, Японии, Южной Корее и др. (Kozaki et al., 1988; Вержук и др., 2009; Marković et al., 2015; FAO, 2017). Это высокотехнологический метод, который дает возможность хранить большое количество образцов и небольшое количество материала каждого образца в небольшом пространстве.

Разработка методов криоконсервации виноградной лозы началась в 1990-х гг. Основной механизм сохранения биологических объектов в условия сверхнизких температур (до –196 °C) – это витрификация, перевод воды в твердое состояние без кристаллизации. Проблемы, возникающие с криоконсервацией гермоплазмы винограда, обусловлены особенностями строения ее клеток, отличающихся большими размерами, сильной вакуолизацией и, следовательно, большим содержанием воды, а также уровнем критической дегидратации (30–40 %), снижение которого ведет к необратимой потере жизнеспособности. Развитие криогенного способа хранения растительного материала винограда связано с разработкой методов, позволяющих избежать различных криоповреждений, обусловленных дегидратацией, осмотическим шоком и деструкцией мембран, органелл и протопластов в результате внутриклеточной кристаллизации, приводящих к нарушениям меж- и внутриклеточной компартментализации. К другим основным проявлениям криоповреждений у винограда следует отнести накопление промежуточных продуктов ферментативных реакций и других растворимых соединений, в том числе изменения внутриклеточного pH и т. д. (Мануильский, 1992).

В связи с этим для криоконсервации винограда было разработано небольшое количество методов, и их использование все еще ограниченно. Путем применения метода инкапсуляции–обезвоживания успешно замораживали эмбриогенные клеточные суспензии двух элитных испанских сортов винограда Albarico и Tempranillo. Криоконсервированные инкапсулированные клетки использовались для инициации новых клеточных суспензий, изучалась их эмбриогенная емкость. Этот метод криоконсервации стал шагом вперед в вопросе хранения готовых к использованию компетентных эмбриогенных тканей для проектов генетической трансформации виноградной лозы (Gonzales-Benito et al., 2009). Использование метода термического анализа позволило обнаружить фазовые переходы в растительных тканях и оценить отдельные этапы криопротокола перед криоконсервацией эксплантатов виноградной лозы, которые улучшают их толерантность к обезвоживанию и постепенно обезвоживают их так, что оставшееся содержание воды позволяет поддерживать жизнеспособность эксплантов. При этом доля замораживаемой воды минимальна (Faltus et al., 2015). Применение методов инкапсуляции–обезвоживания (encapsulation–dehydration) и капелька-витрификация (droplet-vitrification) для криоконсервации верхушечных побегов винограда

сорта Портан в условиях жидкого азота дало возможность получить до 50 % жизнеспособных образцов апикальных меристем, восстановленных после криозамораживания (Marković et al., 2013, 2015).

В совместных исследованиях института «Магарач» с Институтом животноводства НААН Украины (Харьков) в 2007–2009 гг., а также исследованиях института «Магарач» с Институтом проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков) в 2012–2014 гг. были предприняты попытки разработать методику, позволяющую избежать различных криоповреждений гермоплазмы винограда для ее хранения в низкотемпературном банке. Однако проведенные исследования, учитывая трудности преодоления криоповреждений биологического материала винограда в условиях сверхнизких температур, пока не принесли ожидаемого результата (Горбунов и др., 2009; Присталов и др., 2014).

В настоящее время метод криоконсервации виноградной лозы остается наиболее сложным. До сих пор не удалось полностью восстановить растительный материал винограда после криоохлаждения, и риск потери коллекции довольно высокий (Faltus et al., 2015; Marković et al., 2015).

Ни один из существующих методов хранения генплазмы растений не гарантирует 100 % сохранности жизнеспособных образцов. Для исключения потерь коллекционного генофонда в разработанном International Plant Genetic Resources Institute (Bioversity International) руководстве для управления коллекциями зародышевой плазмы различных культур рекомендуют дублировать коллекции: например, три полевые коллекции в разных местах, или полевая коллекция и коллекция *in vitro*, или полевая коллекция или коллекция *in vitro* и один набор криоконсервированных образцов (Reed et al., 2004; FAO, 2014).

Анализируя положительные и отрицательные стороны существующих методов хранения генплазмы, можно сделать вывод, что для оптимального сохранения генетических ресурсов винограда необходимо существование полевой коллекции винограда как основной метод. Формирование коллекций образцов винограда в культуре *in vitro* на сегодня следует рассматривать как дополнение к основному методу. В дальнейшем остается целесообразным развитие методов консервации растительного материала винограда в условия сверхнизких температур.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Ampelograficheskaya kollektsiya “Magarach” [Ampelographic collection “Magarach”]. URL: http://www.ckp-rf.ru (accessed May 3, 2017). (in Russian)

Ashmore S. Status Report on the Development and Application of *in vitro* Technique for the Conservation of Plant Genetic Resources. Rome, Italy: IPGRI, 1997.

Avidzba A.M., Volynkin V.A., Likhovskoi V.V., Polulyakh A.A., Troshin L.P. World ampelographical collection All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking “Magarach” and North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture. Nauchnyy zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU. 2015;110(06):1-27. http://ej.kubagro.ru/2015/06/pdf/96.pdf. (in Russian)

Avidzba A.M., Volynkin V.A., Melkonjan M.V., Polulyakh A.A. Potential grapevine genetic resources in Ukraine. “Magarach”. Vinogradarstvo i vinodelie = “Magarach”. Viticulture and Winemaking. 2004;3:2-3. (in Russian)

Bosco D., Sinski I., Comachio V., Maia J.D.G., Ritschel P.S., Quecini V. *In vitro* techniques for grapevine germplasm conservation. Acta Hortic. 2015;1082:201-205.

Butenko R.G. Kultura izolirovannykh tkaney i fiziologiya rasteniy [Culture of isolated tissues and plant physiology]. Moscow: Nauka Publ., 1964. (in Russian)

Cooper H.D. The International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. RECIEL. 2002;11(1):1-16.

Dettweiler E. Genetic resources – Gene banks. Vitis. 1990;29:57-59.

Dettweiler E., This P., Eibach R. The European network for grapevine genetic resources conservation and characterization. Materials of XXV Congress mondial de la vigne et du Vin. France, Paris, 2004;1-10.

Doroshenko N.P., Khokhlova M.A. The method of creating of gene pool collection *in vitro*. Vinograd i vino Rossii = Grapevine and Wine in Russia. 1993;6:18-21. (in Russian)

Doroshenko N.P., Zhukova T.V. Creation and storage of a grapevine collection *in vitro*. Russkiy vinograd = Russian Grape. 2016;3:8-14. (in Russian)

Eiras-Dias J.E.J. Status of the *Vitis* national collection in Portugal. Report of a Working Group on *Vitis*. Rome, Italy: Bioversity International, 2008;93-94.

Faltus M., Bilavcik A., Zamecnik J. Thermal analysis of grapevine shoot tips during dehydration and vitrification. Vitis. 2015;54:243-245.

FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Food Agric. Org. United Nations (FAO). Rome, 2014. URL: http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-siemap/theme/seeds-pgr/gbs/en/.

FAO. The future of food and agriculture – trends and challenges. Food Agric. Org. United Nations (FAO). Rome, 2017.

Golodryga P.Ja., Zlenko V.A., Chekmarev L.A. Metodicheskie rekomendatsii po klonalnomu mikrorazmnozheniyu vinograda [Methodical recommendations for clonal micropropagation of grapevines]. Yalta: Institute “Magarach” Publ., 1986. (in Russian)

Gonzalez-Benito M.E., Martin M.C., Vidal J.R. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of the Spanish grapevine cultivars ‘Albarico’ and ‘Tempranillo’. Vitis. 2009;48(3):131-136.

Gorbunov L.V., Salina A.S., Shiyanova T.P., Volynkin V.O., Polulyakh A.A. Critical zones responsible for the decrease in grapevine rootstock viability when cooled. “Magarach”. Vinogradarstvo i vinodelie = “Magarach”. Viticulture and Winemaking. 2009;1:19-22. (in Ukranian)

Katalog ampelograficheskoy kollektsii “Magarach” [Catalog of the ampelographic collection “Magarach”]. URL: http://magarach-institut.ru (accessed Nov. 11, 2016).

Kozaki I., Omura M., Matsuta N., Moriguchi T. Germplasm Preservation of Fruit Trees. Preservation of Plant Genetic Resources. Jap. Int. Coop. Agency. 1988;65-74.

Lacombe T. Status of the French *Vitis* National Collection. Report of a Working Group on *Vitis*. Rome, Italy: Bioversity International. 2008;73-74.

Li S.H., Archbold D., London J. Collection, conservation, evaluation and utilization of *Vitis amurensis* germplasm resources in China. Acta Hortic. 2015;1082:79-86.

Maghradze D., Maletic E., Maul E., Faltus M., Failla O. Field genebank standards for rapevines. Vitis. 2015a;54:273-279.

Maghradze D., Ocete R., Garcia J.L., Cantos M. Micropropagation and *in vitro* germplasm conservation of Georgian wild grapevines. Vitis. 2015b;54:246-248.

Manuil’skiy V.D. Formirovanie kriorezistentnosti i ustoychivosti rasteniy k nizkim temperaturam [The formation of cold and frost resistance in plants]. Kiev: Nauk. Dumka Publ., 1992. (in Ukrainian)

Marković Z., Chatelet P., Sylvestre I., Kontić J.K., Engelmann F. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. Cent. Eur. J. Biol. 2013;8:993-1000.

Marković Z., Preiner D., Stupić D., Andabaka Ž., Šimon S., Vončina D., Maletić E., Karoglan Kontić J., Chatelet P., Engelmann F. Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Vitis. 2015;54:247-251.

Maul E., This P. GENRES 081 – a basis for the preservation and utilization of *Vitis* genetic resources. Maul E., Eiras Dias J.E., Kaserer H., Lacombe T., Ortiz J.M., Schneider A., Maggoni L., Lipman E. (Compilers): Report of a Working Group on Vitis. First Meeting, 12–14 June 2003, Palić, Serbia and Montenegro. Rome, Italy: Bioversity International, 2008;13-22.

Maul E., Töpfer R., Carka F., Cornea V., Crespan M., Dallakyan M., de Andrés Domínguez T., de Lorenzis G., Dejeu L., Goryslavets S., Grando S., Hovannisyan N., Hudcovicova M., Hvarleva T., Ibáñez J., Kiss E., Kocsis L., Lacombe T., Laucou V., Maghradze D., Maletić E., Melyan G., Mihaljević M.Z., Muñoz-Organero G., Musayev M., Nebish A., Popescu C.F., Regner F., Risovanna V., Ruisa S., Salimov V., Savin G., Schneider A., Stajner N., Ujmajuridze L., Failla O. Identification and characterization of grapevine genetic resources maintained in Eastern European Collections. Vitis. 2015;54:5-12.

Naumova L.G., Ganich V.A. Past and present of ampelographical collections of ARRIV&W. "Magarach". Vinogradarstvo i vinodelie = "Magarach". Viticulture and Winemaking. 2015;3:20-23. (in Russian)

Negrul A.M. Proiskhozhdenie kulturnogo vinograda i ego klassifikatsiya [Origin of cultivated grapevines and their classification]. Ampelografiya SSSR [Ampelography in the USSR]. Moscow: Pishchepromizdat Publ., 1946;1:159-216. (in Russian)

Pavlova I.A., Klimenko V.P. Collection of grapevine varieties, hybrids and clones under *in vitro* conditions. Tezisy dokladov i soobshcheniy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 180-letiyu NIViV "Magarach". "Perspektivy razvitija vinogradarstva i vinodelija v stranah SNG". Yalta, 28–30 oktyabrya 2008 g. [Abstracts from the International Scientific and Applied Conference Dedicated to the Centenary of the Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" "Prospects for the Development of Viticulture and Winemaking in CIS Countries". Yalta, 28–30 Oct. 2008]. Yalta, 2008;1:80-81. (in Russian)

Pavlova I.A., Klimenko V.P. Creation and prospects of use of an *in vitro* collection of grapevine varieties and hybrids. Tezisy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 200-letiyu Ch. Darvina i 200-letiyu Nikitskogo botanicheskogo sada "Aktualnye problemy prikladnoy genetiki, selektsii i biotekhnologii rasteniy". 3–6 noyabrya 2009 g., Yalta [Abstracts of Intern. Conf. in commemoration of the 200th anniversary of Charles Darwin and the 200th anniversary of Nikitsky Botanical Gardens "Actual Problems of Applied Genetics, Breeding and Biotechnology of Plants". Yalta, 3–6 Nov. 2009]. Yalta, 2009;149. (in Russian)

Pelengic R., Koruza B. Slovenia grapevine germplasm. Acta Agriculturae Slovenica. 2012;99(3):429-432.

Polulyakh A.A., Volynkin V.O. Genetychni resursy vynogradu Ukrai'ny: zberezhennja, vyvchennja i vykorystannja [Grapevine genetic resources in Ukraine: conservation, study, and use]. Genetychni resursy roslyn [Plant Genetic Resources]. Harkiv: NCGRRU Publ., 2008;5:23-34. (in Ukrainian)

Polulyakh A.A., Volynkin V.A. World ampelographic collection of the National Institute of Vine and Wine "Magarach". Sbornik nauchnykh trudov NIViV "Magarach" "Vinogradarstvo i vinodelie" [Proceedings of the National Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach"]. Yalta, 2014;5-10. (in Russian)

Polulyakh A.A., Volynkin V.A. Grapvine genetic resources of institute "Magarach" and the modern approach to the classification of wild and cultivated grapevines of Crimea by ampelographic characters. "Magarach". Vinogradarstvo i vinodelie = "Magarach". Viticulture and Winemaking. 2015;4:6-8. (in Russian)

Pristalov A.I., Bondar' I.N., Polulyakh A.A., Likhovskoy V.V. Vinogradarstvo Slobozhanshhiny: istoriya, problemy, perspektivy sozdaniya i sohraneniya kollektsiy [Viticulture of Sloboda Ukraine: history, problems and prospects for the creation and preservation of collections]. Visnyk Harkivs'kogo nacional'nogo universytetu im. V.N. Karazina. Seriya Biologiya. Vypusk 20. [Bulletin of the Karazin Kharkov National University. Biology series. Issue 20]. Har'kov, 2014;1100:53-60. (in Ukrainian).

Reed B.M., Engelmann F., Dulloo M.E., Engels J.M.M. Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7. Int. Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 2004.

Ryabchun V.K., Boguslavs'kiy R.L. Problemy ta perspektyvy zberezhennja genofondu roslyn v Ukrai'ni [Problems and Prospects of Preserving the Gene Pool of Plants in Ukraine]. Harkiv, 2002. (in Ukrainian)

Tehrim S., Sajid G.M. *In vitro* establishment, conservation and its implications for grape germplasm biodiversity. Romanian Biotechnol. Lett. 2011;16(6):6785-6789.

Verzhuk V.G., Filipenko G.I., Tikhonova N.G., Zhestkov A.S., Lupysheva Ju.V., Pupkova N.A., Mikhaylova E.V., Savel'ev N.I., Dorokhov D.S. Razrabotka metodov kriosokhraneniya geneticheskikh resursov rasteniy plodovykh i yagodnykh kul'tur [Development of methods for cryopreservation of plant genetic resources of fruit and berry crops]. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2009;166:353-357. (in Russian)

Volynkin V.A., Polulyakh A.A. Katalog ampelograficheskoy kollektsii Instituta vinograda i vina "Magarach" [Catalog of the ampelographic collection of the Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach"]. Chast I. Aborigennye i mestnye sorta Kryma [Part 1. Autochthonous and local varieties of the Crimea]. Yalta: Institute "Magarach" Publ., 2004. (in Russian)

Volynkin V.A., Polulyakh A.A. Evolyutsionnoe formirovanie mirovogo genofonda morozoustoychivogo vinograda [Evolutionary formation of global gene pool of frost grapes]. Mizhvidomchyj tematychnyj naukovyj zbirnyk "Vinogradarstvo i vinorobstvo" [Interdepartmental thematic scientific collection "Viticulture and winemaking"]. Odessa, 2007;45(2):25-29. (in Ukrainian)

Volynkin V., Polulyakh A., Chizhova A., Roshka N. Ukraine: native varieties of grapevine. Caucasus and Northern Black Sea Region Ampelography. COST. Vitis. 2012;405-473.

Volynkin V.A., Zlenko V.A., Likhovskoy V.V., Polulyakh A.A. Breeding of grapevine intergeneric hybrids of the Vitaceae family on the basis of methods of experimental allopolyploidy and *in vitro* culture of embryos. "Magarach". Vinogradarstvo i vinodelie = "Magarach". Viticulture and Winemaking. 2009;1:12-14. (in Russian)

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):617-622
DOI 10.18699/VJ17.277

Характеристика некоторых аборигенных дагестанских сортов винограда методом SSR-анализа и по основным ампелографическим признакам листьев

Е.Т. Ильницкая[1] ✉, И.И. Супрун[1], Л.Г. Наумова[2], С.В. Токмаков[1], В.А. Ганич[2]

[1] Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, Краснодар, Россия
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко, Новочеркасск, Россия

Местные, стародавние сорта различных регионов возделывания винограда – важная часть мирового генофонда культуры. Дагестан – один из древнейших регионов виноградарства в Российской Федерации. Некоторые дагестанские аборигенные сорта винограда возделываются в промышленном масштабе, другие же обнаруживаются в единичных экземплярах. Изучению аборигенного генофонда уделяется особое внимание во всех странах, производящих виноград. В настоящее время наиболее информативным методом анализа генотипов растений являются исследования на уровне ДНК. Основные характеристики листьев сортов винограда – важнейший ампелографический признак. Сорта Агадаи, Алый терский, Бор кара, Будай шули, Гок ала, Гок изюм, Махбор цибил, Яй изюм белый, Яй изюм розовый изучены нами с применением данных подходов. В результате исследования получены ДНК-профили девяти аборигенных дагестанских сортов винограда по микросателлитным локусам VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130. Указанные SSR-маркеры рекомендованы союзом генетиков винограда как основные для генотипирования *Vitis vinifera* L. Изученные генотипы обладают различными комбинациями аллелей проанализированных локусов. Оценка генетического сходства сортов по результатам микросателлитного анализа показала, что генотипы сортов Махбор цибил и Алый терский более близки к западно-европейскому генофонду *V. vinifera* L., чем другие аборигенные сорта в изученной выборке. Дагестанские сорта винограда описаны также по основным признакам сформировавшегося листа, согласно методике международной организации винограда и вина. По результатам анализа признаков листовой пластинки и по данным SSR-профилирования отмечена близость сортов Гок ала и Агадаи.

Ключевые слова: аборигенные сорта винограда; *Vitis vinifera* L.; SSR-маркеры; генотипирование.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Ильницкая Е.Т., Супрун И.И., Наумова Л.Г., Токмаков С.В., Ганич В.А. Характеристика некоторых аборигенных дагестанских сортов винограда методом SSR-анализа и по основным ампелографическим признакам листьев. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):617-622. DOI 10.18699/VJ17.277

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Ilnitskaya E.T., Suprun I.I., Naumova L.G., Tokmakov S.V., Ganich V.A. Characterisation of native Dagestan grape cultivars using SSR-analysis and the main ampelographic features of the leaves. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):617-622. DOI 10.18699/VJ17.277 (in Russian)

Received 02.05.2017
Accepted for publication 09.07.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: ilnitskaya79@mail.ru

Characterisation of native Dagestan grape cultivars using SSR-analysis and the main ampelographic features of the leaves

E.T. Ilnitskaya[1] ✉, I.I. Suprun[1], L.G. Naumova[2], S.V. Tokmakov[1], V.A. Ganich[2]

[1] North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture, Krasnodar, Russia
[2] All-Russian Research Institute of Viticulture and Winemaking named after Ya.I. Potapenko, Novocherkassk, Russia

Local, ancient grape cultivars of different cultivation regions are important part of grapevine genetic resources. Dagestan is one of the oldest regions of viticulture in the Russian Federation. Some Dagestan aboriginal grape varieties are cultivated on an industrial scale, while others are found in single numbers. The study of the native gene pool is given special attention in all grapes producing countries of the world. Currently, the most informative method of plant genotypes analysis is the study at the DNA level. The main features of the leaves of grape varieties are a key ampelographical characteristic. We studied cultivars Agadai, Alyi terskyi, Bor kara, Buday shuli, Gok ala, Gok izyum, Mahbor cibil, Yai izyum beliy, Yai izyum rozovyi by using these approaches. DNA profiles of 9 local Dagestan grape cultivars were obtained on microsatellite loci VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 and VrZAG79 using an automated genetic analyzer ABI Prism 3130. The SSR-markers are recommended as the main for *Vitis vinifera* L. genotyping. The cultivars analyzed have different sets of allele combination by the loci studied. Evaluation of the genetic similarity of cultivars according to the results of microsatellite analysis showed that the genotypes of Mahbor cibil and Aliy terskiy are closer to the Western European gene pool of *V. vinifera* L. than any other native varieties in the sample studied. In addition, the grapevine cultivars studied were described for the main features of the formed leaves according to the method of the international organization of vine and wine. The similarity of cultivars Gok Ala and Agadai was shown by the results of analysis of the leaves characteristics and according to SSR-profiling.

Key words: native grape cultivars; *Vitis vinifera* L.; SSR-markers; genotyping.

Виноградная культура – одна из древнейших и доминирующих в мировом сельхозпроизводстве. Аборигенные, стародавние сорта различных регионов возделывания винограда, так же как и дикие формы, – важнейшая часть мирового генофонда *Vitis vinifera* L. Автохтонные сорта, большинство из которых имеют лишь локальное распространение или представлены ограниченным числом в различных ампелоколлекциях, могут быть безвозвратно утеряны, причем эти генотипы могут нести редкие аллели, обладая высокими адаптивными свойствами к конкретным зонам виноградарства. Вследствие этого изучению аборигенного генофонда уделяется особое внимание во всех странах, производящих виноград (Stajneri et al., 2008; Dzhambazova et al., 2009; Cipriani et al., 2010; Ильницкая и др., 2014).

В настоящее время Дагестан – один из основных регионов возделывания винограда в Российской Федерации, при этом виноградарство в данной местности имеет многовековую историю. Здесь обнаружено множество аборигенных сортов, одичавших лоз и диких форм винограда. Значимость исследования биологического разнообразия виноградных лоз регионов Кавказа и Причерноморья (северных ареалов Черного моря) широко признана в мире и особо важна в рамках проблемы «эрозии генов» (Турок и др., 2006). При изучении происхождения сортов винограда народной селекции большое значение имеют методы их идентификации. Исследования показали эффективность унифицированной системы описания сортов винограда, разработанной международной организацией винограда и вина (Office International de la vigne et du vin, OIV, Париж, Франция) (OIV, 2001). С помощью этой системы возможно установить близость комплекса признаков различных сортов, что помогает подтвердить или опровергнуть предполагаемое родство. Наиболее ценными при установлении происхождения сортов винограда считаются признаки листьев, при формировании которых практически исключено воздействие искусственного отбора (Алиев и др., 2013). Несмотря на то что размер и форма листьев значительно варьируют по длине побега у растений одного и того же сорта и в различных условиях произрастания, они признаны надежным ампелографическим признаком.

Однако в настоящее время наиболее точными для целей исследования генофонда признаны методы изучения генотипов непосредственно на уровне ДНК. ДНК-профили дополняют традиционное ампелографическое описание сортов, позволяют изучать их происхождение, выявлять синонимы и близкородственные формы. В работах по изучению генетического разнообразия и идентификации сортов наиболее часто используют ДНК-маркерные системы, основанные на вариабельности микросателлитных участков ДНК (Karatas et al., 2007; Heuertz et al., 2008; Stajneri et al., 2008; Doulati-Baneh et al., 2013; Xuan et al., 2016).

Цель работы – изучение аборигенных дагестанских сортов винограда на основе полиморфизма микросателлитных локусов ДНК и по основным признакам сформировавшихся листьев виноградного растения.

Материалы и методы

Работа проведена на сортах винограда Агадаи, Алый терский, Бор кара, Будай шули, Гок ала, Гок изюм, Махбор цибил, Яй изюм белый, Яй изюм розовый, произрастающих в коллекции Всероссийского НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко (г. Новочеркасск) и относящихся к аборигенным сортам Дагестана (Ампелография СССР, 1946–1984; Трошин, 2002, 2007). В исследования включены как местные, достаточно распространенные в Республике Дагестан, так и редкие сорта (табл. 1).

Изучение генотипов дагестанских сортов проведено методом микросателлитного профилирования на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). В исследовании задействованы микросателлитные маркеры, рекомендованные в качестве основного минимального набора для молекулярно-генетической паспортизации генотипов *Vitis vinifera* L.: VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 (This et al., 2004). При необходимости количество маркеров для ДНК-паспортизации увеличивают. Генотипирование сортов проводили маркерными парами: VVS2 + VVMD7; VVMD27 + VVMD5; VrZAG62 + VrZAG79. SSR-маркеры были объединены с учетом диапазонов размеров амплифицируемых фрагментов по каждому локусу, согласно литературным данным, и температуры отжига пар праймеров; в одном наборе использовали различные флуоресцентные красители. ДНК выделяли из молодых листьев типичных растений изучаемых сортов методом на основе применения ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромида) (Rogers, Bendich, 1985). ПЦР проводили согласно стандартному протоколу. Амплификацию ДНК осуществляли с использованием прибора Eppendorf Mastercycler Gradient (Германия) по следующей программе: 5 мин при 95 ºС – начальная денатурация, далее 35 циклов: 10 с денатурация при 95 ºС, 30 с отжиг праймеров при 55 ºС (для пар VVS2 + VVMD7; VVMD27 + VVMD5) и при 58 ºС (VrZAG62 + VrZAG79), 30 с синтез при 72 ºС; последний цикл синтеза – 3 мин при 72 ºС – финальная элонгация. Разделение продуктов реакции и оценка результатов проведены с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 и специального программного обеспечения Gene Mapper и Peak Scanner. В качестве контроля для уточнения размеров амплифицированных фрагментов использовали ДНК сортов Шардоне и Каберне-Совиньон, несущих референсные аллели.

Молекулярно-генетические исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства.

Изучаемые сорта винограда были описаны также по основным ампелографическим признакам сформировавшегося листа (табл. 2), согласно Методике проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Виноград (*Vitis* L.) (OIV, 2001).

Кластерный анализ по результатам микросателлитного анализа выполнен методом попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA) с использованием FreeTree Application 0.9.1.50 (ZDAT v.o.s.). Графическое построение дендрограммы проведено в программе TreeView (Win32) 1.6.6. Результаты SSR-генотипирования и показателей основных признаков листа обработаны методом анализа главных координат (PCoA), выполненным в программе PAST 3.1.

Table 1. Ecogeographical characterization of Dagestan indigenous grapevine cultivars studied

Grapevine cultivar	Group (subgroup) according to A.M. Negrul's ecogeographical classification	Geographical range and origine	Synonyms
Agadai	*Convarietas orientalis* Negr. (Eastern varieties), *subconvarietas antasiatica* Negr. (table varieties)	The most widespread local variety in Dagestan, occupying large areas in vineyards in the south of the republic. The first bushes were found in the 1760s in Derbent, from where the variety spread to neighboring areas, including southern regions of Russia, Azerbaijan, Crimea, and Kazakhstan	Derbent tsibil
Alyy terskiy	*Convarietas pontica* Negr. (Black Sea varieties)	Probably a seedling of a Georgian variety. Common in some areas of Dagestan and the Stavropol Kray, where it penetrated from Kizlyar or nearby Cossack villages on the Terek	Alyi, Alyi stanichnyi, Dzhadu cibil, Kara bar, Mestnyi alyi, Cheer cibil, Cheereb cibil
Bor kara	*Convarietas pontica* Negr. (Black Sea varieties)	No reliable information about the origin. A traditional variety infrequenly found together with other genotypes in few sites of the Republic of Dagestan	Kara bor
Buday shuli	*Convarietas orientalis* Negr. (Eastern varieties), *subconvarietas antasiatica* Negr. (table varieties)	Traditional Dagestan variety found only in southern Dagestan	Ali-gaga, Budaish, Buday shelle, Budashil'
Gok ala	*Convarietas pontica* Negr. (Black Sea varieties)	No precise information about the origin. Earlier, occasional bushes were found in old vineyards of Dagestan	Karachi
Gok izyum	*Convarietas orientalis* Negr. (Eastern varieties), *subconvarietas caspica* Negr. (wine varieties)	Found in Kumtorkala Village of the Leninskiy raion of Dagestan, where single bushes occur in plantings among other varieties	Gyuk izyum
Makhbor tsibil	*Convarietas pontica* Negr. (Black Sea varieties)	The variety was discovered in the Cherkey village of the Buinaksk raion of Dagestan. Occurs in single bushes in plantings of the Kazbekovskiy raion	Mahbar cibil
Yai izyum white	*Convarietas orientalis* Negr. (Eastern varieties), *subconvarietas antasiatica* Negr. (table varieties)	No historical information about the origin of the variety; very close to the Iranian variety Khalili white. Common in several districts of Dagestan, introduced in other viticultural regions of the Russian Federation and the CIS	Ilyinskiy, Yazlik izyum
Yai izyum rozovyi	*Convarietas pontica* Negr. (Black Sea varieties)	In the second half of the last century, the variety was included in the zoned assortment of grapes. Occurs in small patches among local Dagestan varieties	Avraimi, Kyrmyzy yai izyum

Table 2. Ampelographic characteristics of a mature leaf

Trait	Code
Size of blade	065
Shape of blade	067
Number of lobes	068
Length of the upper tooth	077-1
Length of the lateral tooth	077-2
Length : width of the upper tooth	078-1
Length : width of the lateral tooth	078-2
Degree of the opening / overlapping of the petiole sinus	079
Degree of the opening / overlapping of the upper lateral sinus	082
Density of prostrate hairs between the main veins on the lower side of blade	084
Petiole length : middle vein length	093
Depth of upper lateral sinuses	094

Результаты и обсуждение

Все изученные образцы показали по результатам генотипирования отличную от других суммарную комбинацию аллелей (табл. 3). Определено шесть (VVMD5, VrZAG62) и семь (VVS2, VVMD7, VVMD27, VrZAG79) типов аллелей на локус в генотипах исследуемой выборки дагестанских сортов. По большинству локусов изученные образцы гетерозиготны, что характерно культуре *V. vinifera* L. с диплоидным набором хромосом и перекрестным типом опыления. В генотипах сортов Будай шули, Гок изюм, Агадаи и Яй изюм белый в трех из шести проанализированных локусов выявлено гомозиготное состояние. Интересно, что все эти сорта относятся к эколого-географической группе восточных сортов *convarietas orientalis* Negr. У сорта Яй изюм белый по еще одному локусу (VVMD5) выявлен нуль-аллель (отсутствие ПЦР-продукта). Известно, что сорта восточной эколого-географической группы характеризуются совокупностью рецессивных признаков (Рисованная, 2010). Достаточно высокий уровень гомозиготности по нейтральным микросателлитным

Table 3. DNA profiles of grapevine cultivars in the studied SSR loci

Cultivar	Allele sizes at SSR loci (pairs of nucleotides)					
	VVS2	VVMD7	VVMD27	VVMD5	VrZAG62	VrZAG79
			convarietas orientalis Negr.			
Agadai	135 151	250 250	185 185	230 236	196 200	252 252
Buday shuli	135 145	240 250	181 181	238 242	200 200	260 260
Gok izyum	145 145	246 250	175 181	242 242	202 202	252 260
Yai izyum white	125 125	248 250	185 185	– –	194 194	240 252
			convarietas pontica Negr.			
Alyy terskiy	135 147	240 246	189 189	234 242	202 202	244 262
Bor kara	137 145	244 250	181 181	236 236	200 204	258 260
Gok ala	135 143	236 250	179 185	234 236	194 200	252 252
Makhbor tsibil	135 145	240 246	192 194	230 234	188 202	252 262
Yai izyum pink	125 135	248 260	181 185	236 242	194 196	240 260
			Reference cultivars			
Cabernet-Sauvignon	139 151	240 240	175 189	234 242	188 194	248 248
Chardonnay	137 143	240 244	181 189	236 240	188 196	244 246

локусам, выявленный у изученных сортов *convarietas orientalis* Negr., можно интерпретировать как соответствие этому факту. Остальные аборигенные сорта из изученной нами выборки относят к группе сортов бассейна Черного моря *convarietas pontica* Negr. По изученным SSR-локусам они показали больший уровень гетерозиготности, чем проанализированные сорта из восточной группы. Так, в сортах Махбор цибил и Яй изюм розовый по всем локусам идентифицировано гетерозиготное состояние (см. табл. 3).

По результатам SSR-генотипирования выполнена оценка степени генетического сходства изученных сортов с применением метода попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA). Кластерный анализ на основе данных фингерпринтинга по микросателлитным локусам разделил сорта на две группы: в одну вошли аборигенные сорта Махбор цибил, Алый терский и два европейских сорта-контроля (Шардоне, Каберне-Совиньон), в другую – остальные семь сортов (рис. 1).

Виноградарство Дагестана имеет древнюю и сложную историю. Сортимент региона сформировался в промежуточной зоне между западными и восточными группами сортов винограда. Полученные данные позволяют предположить, что генотипы Махбор цибил и Алый терский более приближены к западноевропейскому генофонду *V. vinifera* L., а среди автохтонных сортов Агадаи, Бор кара, Будай шули, Гок ала, Гок изюм, Яй изюм белый и Яй изюм розовый могут быть выявлены генетически близкие к восточным сортам.

Основные признаки сформировавшегося листа аборигенных сортов описаны по системе индексов, в соответствии со степенью выраженности признака по кодам признака, согласно методике, принятой Международной организацией винограда и вина (OIV, 2001) (табл. 4).

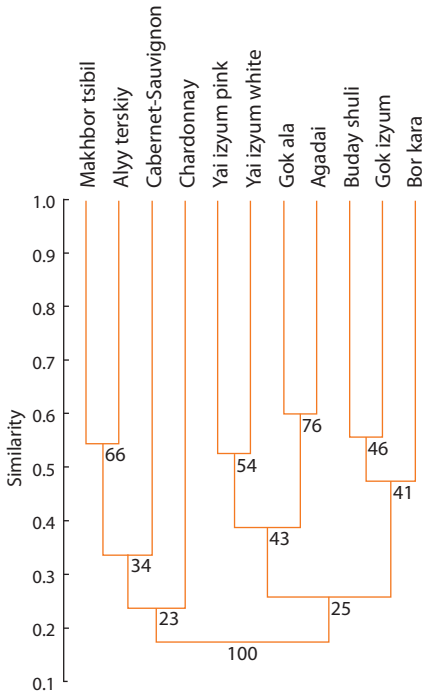


Fig. 1. Dendrogram of the genetic similarity of grapevine cultivars on the base of SSR data.

Table 4. Main traits of leafs in Dagestan grape varieties

Variety	Code									
	065	067	068	077	078	079	080	082	084	093
Agadai	7	2	3	5	5	5; 4	7	2; 1	1	2
Alyy terskiy	7	4	3	5	3	5	7	2	7	3
Bor kara	7	3	3	3	3	6	7	3	5	3; 2
Buday shuli	7	4	3	7	5	2	7	3	1	2
Gok ala	5	4	3	7	5	4; 5	7	3	5	2; 3
Gok izyum	7	4	3	5	5	3	7	3; 1	1	2
Makhbor tsibil	5	4	3	7	5	7	7	2; 1	3	2
Yai izyum white	5	4	3	5	3	3; 4	5	1; 3	1	3
Yai izyum pink	7	4	2; 3	7	5	5; 4	3; 5	1	3	3

На основе данных изучения ампелографических признаков листа и SSR-генотипирования сортов выполнен анализ методом главных координат. Сравнение полученных результатов не позволило выявить соответствия при распределении сортов в пространстве главных координат (рис. 2 и 3). Однако некоторые сходства могут быть отмечены. Так, близость сортов Гок ала и Агадаи показана и при анализе признаков листовой пластинки, и по данным SSR-профилирования. Формирование групп сортов, согласно эколого-географической классификации (*convarietas pontica* Negr. – Алый терский, Гок ала, Махбор цибил, Бор кара, Яй изюм розовый; *convarietas orientalis* Negr. – Агадаи, Будай шули, Гок изюм, Яй изюм белый), не наблюдали ни в первом, ни во втором варианте изучения. Данный результат может быть объясним. Считается, что генотипы восточной эколого-географической группы *V. vinifera sativa orientalis* Negr. возникли на границах ареала *V. vinifera* L. Исходным материалом служили дикий виноград subsp. *silvestris aberrans* Negr., произрастающий в районах, прилегающих к Каспийскому морю, и культурный виноград *V. vinifera pontica* Negr. (Рисованная, 2010). Таким образом, среди сортов, хоть и относимых к двум разным анализируемым группам по эколого-географической классификации, можно выявить и достаточно близкие генотипы.

В целом распределение сортов в пространстве координат на основе анализа полиморфизма микросател-

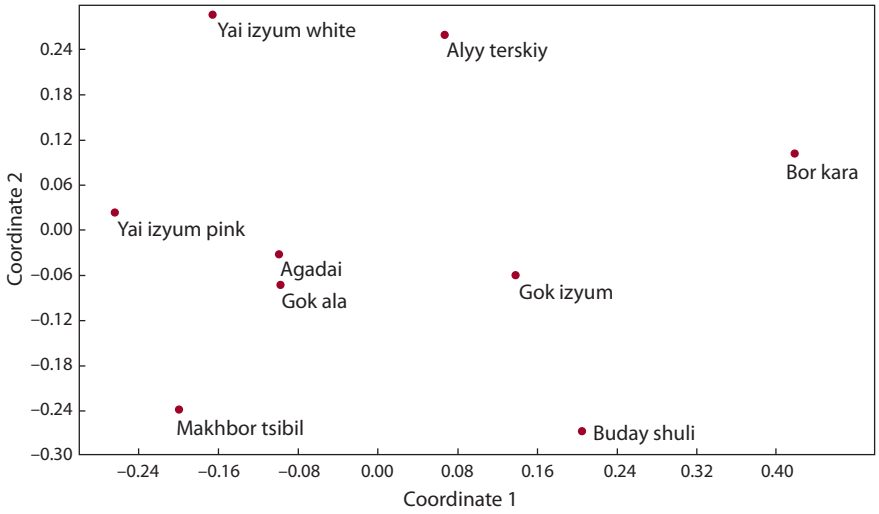


Fig. 2. Two-dimensional representation of the principal coordinate analysis of Dagestan grape varieties according to leaf blade indices.

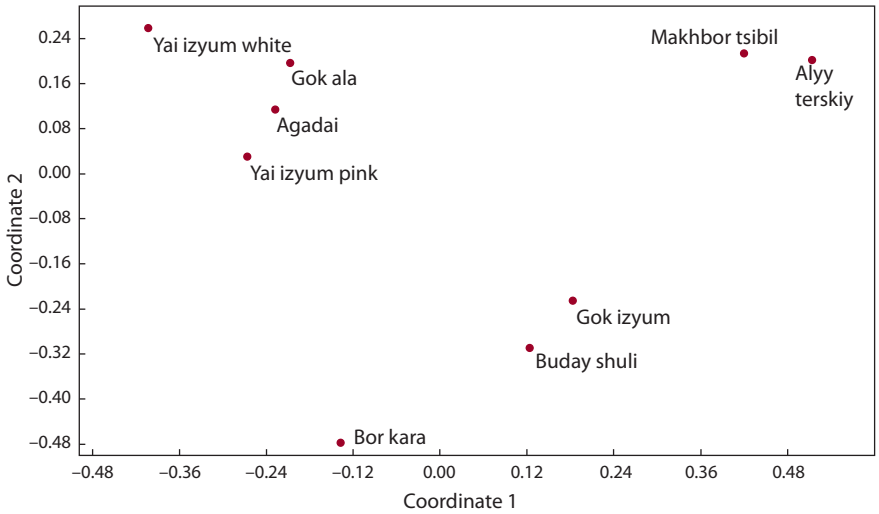


Fig. 3. Two-dimensional representation of principal coordinate analysis (Dice similarity coefficient) of Dagestan grape varieties according to SSR markers.

литных локусов позволило более четко выделить группы сортов, что сопоставимо с результатами проведенного кластерного анализа.

Заключение

По данным анализа полиморфизма микросателлитных локусов получены ДНК-паспорта аборигенных дагестанских сортов винограда Алый терский, Гок ала, Махбор цибил, Бор кара, Яй изюм розовый, Агадаи, Будай шули, Гок изюм, Яй изюм белый. Показана эффективность стандартного минимального набора микросателлитных маркеров для генотипирования данной выборки сортов. По результатам SSR-генотипирования проведен анализ генетического сходства изученных образцов методом UPGMA. На основе полученных данных можно заключить, что генотипы Махбор цибил и Алый терский более близки к западно-европейскому генофонду *V. vinifera* L., чем другие дагестанские сорта изученной выборки. Проведено также описание аборигенных сортов винограда по ампелографическим признакам сформировавшегося листа, согласно Методике международной организации винограда и вина (OIV, 2001). При сопоставлении результатов SSR-генотипирования и оценки признаков листьев не было получено полного соответствия, однако можно отметить, что среди изученных сортов наибольшей степенью сходства обладают Агадаи и Гок ала.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Aliev A.M., Kravchenko L.V., Naumova L.G., Ganich V.A. Donskie aborigennye sorta vinograda [Indigenous Don grape varieties]. Novocherkassk, 2013. (in Russian)

Ampelografiya SSSR [Ampelography of the USSR]. Moscow: Pishchepromizdat Publ., 1946–1984;1-11. (in Russian)

Cipriani G., Marrazzo M.T., Peterlunger E. Molecular characterization of the autochthonous grape cultivars of the region Friuli Venezia Giulia-North-Eastern Italy. Vitis. 2010;49:29-38.

Doulati-Baneh H., Mohammadi S.A., Labra M. Genetic structure and diversity analysis in *Vitis vinifera* L. cultivars from Iran using SSR markers. Sci. Horticult. 2013;160:29-36. DOI 10.1016/j.scienta.2013.05.029.

Dzhambazova T., Tsvetkov I., Atanassov I., Rusanov K., Martínez-Zapater J.M., Atanassov A., Hvarleva T. Genetic diversity in native Bulgarian grapevine germplasm (*Vitis vinifera* L.) based on nuclear and chloroplast microsatellite polymorphisms. Vitis. 2009;48(3): 115-121.

Heuertz M., Goryslavets S., Hausman J.F., Risovanna V. Characterization of grapevine accessions from Ukraine using microsatellite markers. Am. J. Enol. Viticult. 2008;59(2):169-178.

Ilnitskaya E.T., Tokmakov S.V., Suprun I.I. Microsatellite genotyping of Don local grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(3):523-529. (in Russian)

Karatas H., Degirmenci D., Velasco R., Vezzulli S., Bodur C., Agaoglu Y.S. Microsatellite fingerprinting of homonymous grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties in neighboring regions of South-East Turkey. Sci. Horticult. 2007;114:164-169. DOI 10.1016/j.scienta. 2007.07.001.

OIV Descriptor List for Grape Varieties and Vitis Species. OIV, 2001.

Risovannaya V.I. Variability of table and technical varieties of *V. vinifera* L. of Western European and Eastern ecological and geographical groups at allozyme loci. “Magarach”. Vinogradarstvo i vinodelie = “Magarach”. Viticulture and Winemaking. 2010;1:2-5. (in Russian)

Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol. 1985;19(1):69-76.

Stajneri N., Korosec-Korusa Z., Rusjan D., Javornic B. Microsatellite genotyping of old Slovenian grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) of the Primorje (coastal) winegrowing region. Vitis. 2008;47(4): 201-204.

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

Troshin L.P. Development of the classification of grapes. Vinodelie i vinogradarstvo = Wine-making and Viticulture. 2002;1:34-35. (in Russian)

Troshin L.P. Aborigennye sorta vinograda Rossii [Indigenous grape varieties of Russia]. Krasnodar, 2007. (in Russian)

Turok J., Magradze D.N., Troshin L.P. Preservation of the gene pool of Eurasian grapes is the topical task of European ampelographs. Nauchnyy zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU. Krasnodar: KubGAU. 2006;01(17). http://www.ej.kubagro.ru/2006/01/19/ (in Russian)

Xuan H., Horny J., Sturm J. Microsatellite markers (SSR) as a tool to assist the identification of grape (*Vitis vinifera*) cultivars. Acta Horticult. 2016;1110:133-140. DOI 10.17660/ActaHortic.2016.1110.20.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):623-629
DOI 10.18699/VJ17.278

Оценка генетического полиморфизма образцов рода облепихи (*Hippophae* L.) различного эколого-географического происхождения посредством ISSR-маркеров

А.Я. Земцова[1] ✉, Ю.А. Зубарев[1], А.В. Гунин[1], М.С. Иванова[2]

[1] Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко, Барнаул, Россия
[2] Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

Облепиха, несмотря на всю ее популярность, не является массовым объектом генетических исследований. Предпринятые рядом зарубежных авторов попытки генотипирования этой культуры относятся исключительно к крупным систематическим группам – видам и подвидам. Вместе с тем чрезвычайно актуальным представляется изучение внутривидового генетического разнообразия облепихи *Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica*, произрастающей в Сибири, что обусловлено наличием большого количества так называемых экотипов, приуроченных к различным эколого-географическим провинциям. Отсутствие проверенной и отработанной методики определения структуры генома сибирской облепихи усложняет обозначенную задачу. В этой связи целью настоящего исследования была отработка методики ISSR-анализа применительно к образцам облепихи, произрастающим в условиях Сибири, а также предварительная оценка генетического полиморфизма сортообразцов облепихи различной популяционно-систематической принадлежности посредством методов молекулярного маркирования. В результате проведенных исследований отработана методика ISSR-анализа для облепихи, произрастающей в Сибири. Из 32 протестированных ISSR-маркеров выявлены шесть эффективных для анализа полиморфизма ISSR-локусов облепихи. Установлена оптимальная температура отжига для каждого праймера. Выполнен анализ полиморфизма ISSR-маркеров и генетического разнообразия 17 сортообразцов облепихи коллекции НИИ садоводства Сибири. Анализ ISSR-спектров растений облепихи выявил 56 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 36 были полиморфными. На основе полученных данных построена дендрограмма генетического сходства исследуемого материала, где растения одного сорта образуют один кластер и которая в целом согласуется с представлениями, согласно которым вид разделяется на подвиды, а подвид – на разные экотипы. По результатам кластерного анализа исследуемые образцы разделились на две группы: первая – относящиеся к *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*, *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides* и *H. rhamnoides* ssp. *caucasica*; вторая – сортообразцы дунайского и ютландского экотипов, относящиеся к *H. rhamnoides* ssp. *carpatica*. Вхождение *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides* и *H. rhamnoides* ssp. *caucasica* в первую группу позволяет предполагать их более близкое генетическое родство с *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*, что подтверждается схожими морфологическими особенностями. Полученные данные в части выявленного полиморфизма ISSR-локусов, а также результаты кластерного анализа позволяют рекомендовать ISSR-анализ для установления систематической принадлежности и генотипирования образцов облепихи.

Ключевые слова: облепиха; систематика; полиморфизм ДНК; ISSR-анализ.

Assessment of genetic polymorphism in sea buckthorn (*Hippophae* L.) of different environmentally-geographical origin by ISSR-markers

A.Y. Zemtsova[1] ✉, Y.A. Zubarev[1], A.V. Gunin[1], M.S. Ivanova[2]

[1] Lisavenko Research Institute of Horticulture for Siberia, Barnaul, Russia
[2] Altai State University, Barnaul, Russia

Sea buckthorn, despite of high popularity at the moment, is not a common object of genetic researches. Some efforts of foreign scientists in this field are concerned with only big systematic groups like species and subspecies. At the same time genetic researches inside of subspecies *mongolica* growing in Siberia till recently have not been started. There are too many so called ecotypes of sea buckthorn belonging to *Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica* growing in different environmentally-geographical areas. That is why the task of deep genetic research of that subspecies is very important. The absence of an approved procedure of genome definition for Siberian sea buckthorn makes the above task quite complicated. That is why the main aim of the current investigation was developing a procedure of ISSR-analysis for sea buckthorn growing in Siberia, as well as preliminary estimation of genetic polymorphism of sea buckthorn varieties belonging to different environmentally-geographical areas by methods of molecular markers. As a result, the procedure of ISSR-analysis for sea buckthorn growing in Siberia has been developed. From 32 estimated ISSR-markers only 6 have been educed as effective for ISSR-locus polymorphism evaluation of sea buckthorn. The annealing temperature for each primer has been found. Analyses of ISSR-markers polymorphism as well as genetic diversity of 17 sea buckthorn varieties have been done. ISSR-spectrum analyses of sea buckthorn plants have educed 56 amplified DNA fragments, 36 of them were polymorphic. According to obtained data a dendrogram of genetic affinity of evaluated varieties has been built, where one variety generates one cluster. In general, it conforms to the idea that one species is divided into subspecies and one subspecies is divided into different ecotypes. As a result of cluster

Received 22.01.2017
Accepted for publication 22.04.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: niilisavenko@yandex.ru

analyses all investigated varieties were divided into two big groups. The first includes varieties belonging to *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*, *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides*, *H. rhamnoides* ssp. *caucasica*; the second includes Danube and Yutlandian ecotypes belonging to *H. rhamnoides* ssp. *carpatica*. The occurrence of *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides* and *H. rhamnoides* ssp. *caucasica* inside the first group allows us to make an assumption about their closer genetic relationship with *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*, which is consistent with their similar morphological features. Revealed ISSR-locus polymorphism as well as the results of clusters analyses allows ISSR-analyses to be recommended for sea buckthorn variability evaluation as well as for genotyping varieties.

Key words: sea buckthorn; systematization; DNA polymorphism; ISSR-analyses.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Земцова А.Я., Зубарев Ю.А., Гунин А.В., Иванова М.С. Оценка генетического полиморфизма образцов рода облепихи (*Hippophae* L.) различного эколого-географического происхождения посредством ISSR-маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):623-629. DOI 10.18699/VJ17.278

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zemtsova A.Y., Zubarev Y.A., Gunin A.V., Ivanova M.S. Assessment of genetic polymorphism in sea buckthorn (*Hippophae* L.) of different environmentally-geographical origin by ISSR-markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):623-629. DOI 10.18699/VJ17.278 (in Russian)

Признанным мировым центром по селекции облепихи является НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко (НИИСС, г. Барнаул). К настоящему времени селекционерами института создано 49 сортов облепихи с использованием в гибридизации экотипов из различных мест естественного произрастания на Алтае, в том числе с берегов рек Катунь, Чулышман, Чуя, а также из Бурятии и Красноярского края, и сортообразцы, полученные с использованием химических мутагенов. Коллекция института одна из наиболее многочисленных в мире, в ней насчитывается порядка 50 тыс. гибридных сеянцев и более 700 сортообразцов. Многие из созданных в институте сортов, в свою очередь, служат исходными формами в селекционных программах целого ряда стран Азии и Европы.

Ежегодно проводится масштабная работа по гибридизации, отбору, анализу гибридных сеянцев, их размножению, комплексному изучению выделенных сортообразцов. Однако на сегодняшний день нет достоверных данных по геномному составу коллекции, четкого научно обоснованного представления о ее видовой принадлежности, что крайне важно как для идентификации сортов, так и для успешной дальнейшей селекции.

В последнее десятилетие все более широкое применение получают молекулярно-генетические методы, с помощью которых созданы ДНК-банки ценных, редких и исчезающих видов растений, проводятся исследования по изучению внутривидовой изменчивости сохраняемых объектов, уточнению спорных вопросов их систематики и классификации, разработке методик генетической паспортизации популяций и исследованию генетической стабильности таксонов. Параллельно с этим могут решаться вопросы паспортизации сортов растений на уровне генов, что весьма актуально в связи с усиливающимся вниманием к правовой охране селекционных достижений. Современные аналитические методы исследования специфичности биологических объектов позволяют на новой основе решать проблему идентификации растений и их генотипов (Новикова и др., 2012).

Для оценки генетического разнообразия селекционного материала широко используются такие молекулярно-генетические методы анализа, как RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSR (simple sequence repeats), ISSR (inter-simple sequence repeats).

Облепиха не является популярным объектом молекулярных исследований. Тем не менее в работах ряда зарубежных авторов предприняты попытки расшифровки генома этой культуры, относящиеся, однако, исключительно к крупным систематическим группам – видам и подвидам. Наиболее часто встречаемые молекулярные методы в исследовании генома облепихи – это RAPD, AFLP, ISSR, SSR (Yao et al.,1993; Bartish et al., 1999, 2000, 2003; Sun et al., 2002; Yongshan et al., 2003a, b; Tian et al., 2004; Chen et al., 2008; Li et al., 2009; Wang et al., 2011; Raina et al., 2012; Jain et al., 2014).

Следует отметить, что облепиха в Сибири с точки зрения хозяйственно-биологических особенностей и систематической принадлежности существенным образом отличается от китайского и европейского генофонда. Основной подвид, встречающийся в Сибири, – это *Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica*, однако известно множество экологических форм, типов, групп, что требует решения вопросов систематики на более узком уровне. В этой связи актуальными становятся две взаимосвязанные задачи: оптимизация методики ПЦР-анализа применительно к сибирскому генофонду и использование этого анализа для генетической идентификации коллекции облепихи НИИСС.

Именно коллекция НИИСС, в которой собраны образцы облепихи различного эколого-географического происхождения, как близкого (внутри одного подвида), так и весьма отдаленного, позволяет комплексно и с высоким

уровнем достоверности решить задачу применения ПЦР-анализа для генетической идентификации, уточнить представления о внутривидовой систематике сортообразцов этой культуры.

Генетическое разнообразие сортов облепихи коллекции НИИСС оценивалось методом ISSR-анализа (inter-simple sequence repeats – межмикросателлитные повторы последовательностей). Выбор этого метода объясняется тем, что ISSR-маркирование не требует предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК. ISSR- и RAPD-спектры аналогичны, но обычно первые содержат больший набор полиморфных полос (до 97), позволяя выявлять более высокий уровень генного полиморфизма (Куцев, 2009), что чрезвычайно важно для решения наших задач. Для определения генома облепихи используются также SSR-маркеры (Lacis et al., 2014). Основным недостатком этого метода является высокая стоимость разработки SSR-праймеров, так как необходимо клонирование и секвенирование произвольных участков ДНК для выявления микросателлитных повторов и участков генома для определения специфического локуса (Омашева и др., 2013).

Метод ISSR-маркирования основан на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) с одним или несколькими праймерами (длиной 15–24 нуклеотида), состоящими из тандемных коротких 2–4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3′-конце. В геномах растений и животных количество микросателлитных повторов очень велико, что делает этот метод удобным для генетического анализа. Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут быть использованы как якорные последовательности к ним. Метод не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов ДНК для подбора праймеров и хорошо воспроизводим (Боронникова, 2009).

Целью нашего исследования была оценка генетического полиморфизма сортообразцов облепихи различной популяционно-систематической принадлежности посредством методов молекулярного маркирования.

Материалы и методы

Исследования проводились в лаборатории биоинженерии Алтайского государственного университета совместно с Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Сбор материала осуществляли на территории экспериментально-производственного отделения НИИСС (Барнаул).

Исследовали образцы листьев 17 сортообразцов облепихи различного эколого-географического происхождения, в том числе гибридного. Для расширения уровня варьирования изучаемых показателей и установления достоверных статистических различий рассматривали также образцы, не относящиеся к подвиду *mongolica*. Сортообразцы (экотипы) в пределах подвида *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*: 42-68-2, Живко (красноярский × саянский экотип); Великан, Янтарная (саянский × катунский экотип); Дар Катуни, Новость Алтая (катунский экотип); Чуйская, 35-61-2244 (чуйский экотип); Чулышманка, Любимая (саянский × чулышманский экотип); Заря Дабат (бурятский экотип); Елизавета, Иня – сорта, полученные в результате химического мутагенеза путем обработки семян сорта Пантелеевская (саянский × катунский). Сортообразцы (экотипы) вне пределов подвида *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*: Pollmix 1 (сорт немецкой селекции, *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides*), Ютландская (ютландский экотип, *H. rhamnoides* ssp. *carpatica*); Дунайская (дунайский экотип *H. rhamnoides* ssp. *carpatica*); КП-686 (киргизский экотип, *H. rhamnoides* ssp. *caucasica*).

ДНК выделяли из 20–30 мг растительной ткани листа с помощью набора Diamond DNA (ООО «НПФ «Алтайбиотех») и Nucleospin Plant II на колонках в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Наличие ДНК в полученном растворе проверяли при помощи электрофореза. Для проведения ПЦР-анализа использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, содержащую 15.5 мкл H_2O; 2.5 мкл 10X-буфера с 2.5 мкл 25 мМ $MgCl_2$; 2 мкл 10 мМ раствора праймера; 1 мкл 10 мМ dNTPs; 2 мкл Taq-полимеразы; 2 мкл ДНК. В качестве отрицательного (К–) контроля в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 2 мкл деионизированной воды. Амплификацию проводили в термоциклере MyCycler BioRad с использованием реактивов производства ООО «Медиген» по следующей программе: предварительная денатурация при 94 °С в течение 3 мин; в последующих 35 циклах 95 °С – 10 с; 50 °С – 45 с; 72 °С – 1 мин 30 с; завершающая стадия: 70 °С – 7 мин, охлаждение при 4 °С. Для проверки достоверности полученных ДНК-спектров опыт повторяли не менее трех раз. Для выявления полиморфизма ДНК облепихи был произведен выбор информативных ISSR-праймеров. Каждый праймер индивидуально анализировали в ПЦР ISSR-методом с геномной ДНК. Нами протестировано 32 ISSR-праймера, из которых отобрано шесть наиболее информативных для дальнейшего анализа. Для повышения выхода амплифицированных фрагментов маркеров был проведен эксперимент по подбору оптимальной температуры отжига (Tm) праймеров – амплификация с градиентом температур отжига праймера от 45 до 55 °С.

Продукты амплификации разделяли в 3%-м агарозном геле и 0.5 М ТАЕ-буфере в присутствии бромистого этидия при 50 В в течение 5 ч в горизонтальной электрофорезной камере Sub Cell GTSystem (Bio-Rad, США). После электрофореза гели были сфотографированы в системе гель-документации Gel-Doc XR (Bio-Rad, США). Для компьютерной обработки полученные результаты были представлены в виде матрицы бинарных данных. ISSR-профили анализировали по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле. Компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК проведен с помощью компьютерных программ NTSYSpc 2.1, TFPGA 1.3. Для построения филогенетических деревьев на основе данных фрагментного анализа использовали UPGMA метод.

Результаты и обсуждение

Выделение ДНК – важный этап выполнения генетического анализа, так как от качества и количества выделенной ДНК зависит успешность его дальнейших этапов. Качественный анализ ДНК проводился путем электрофореза в агарозном геле, который позволяет выявить степень деградации. Вы-

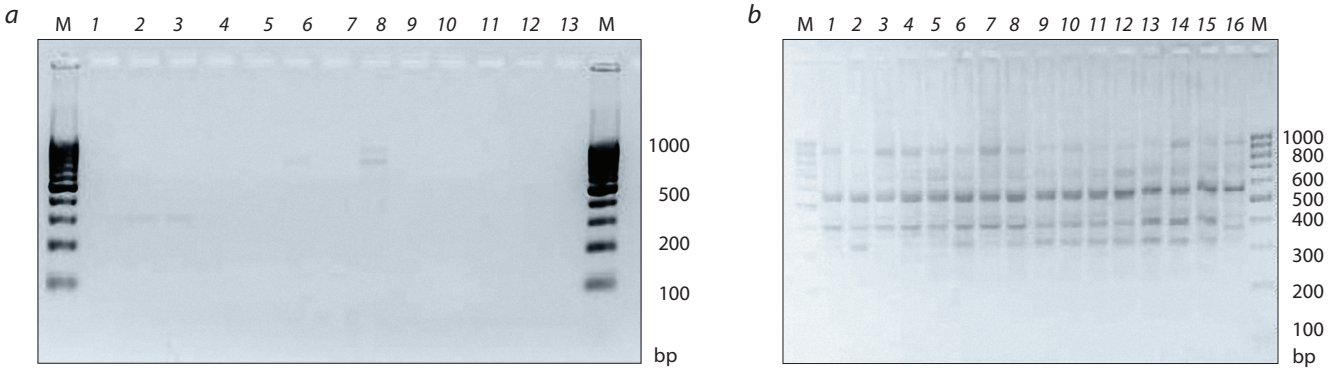


Fig. 1. Electrophoretic image of PCR-ISSR: *a*, DNA extracted with the Diamond DNA kit; *b*, DNA extracted with the Nucleospin Plant II kit. Numerals indicate samples; M, DNA molecular weight ladder.

Primers used in sample genotyping

Designation	Sequence	Tm, °C	Size of amplified fragments, bp*	Number of amplified fragments	Number of polymorphic fragments	Polymorphism level, %
UBC873	5′GACAGACAGACAGACA3′	53.3	200–1000	11	9	81.8
HB12	5′CACCACCACGC3′	55.0	300–1000	10	6	60.0
HB14	5′CTCCTCCTCGC3′	51.0	200–1000	8	6	75.0
814	5′CTCTCTCTCTCTCTCTTG3′	48.9	200–1000	6	2	33.3
17899A	5′CACACACACACAAG3′	51.3	200–1000	11	4	36.4
17899B	5′CACACACACACAGG3′	54.4	200–1000	10	8	80.0

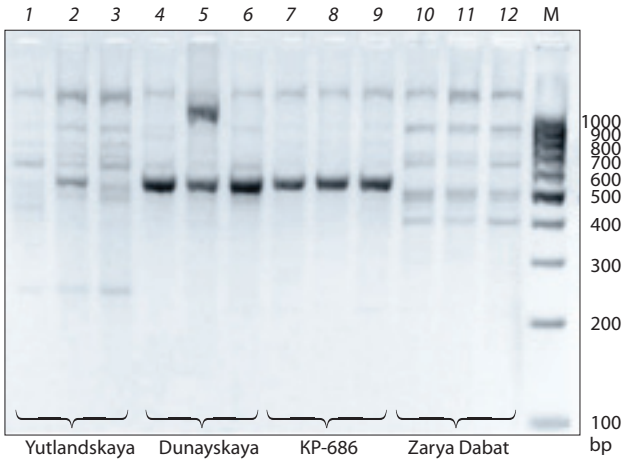


Fig. 2. Fragment of the PCR-ISSR electrophoretic image with primer 17899B. Numerals indicate samples; M, DNA molecular weight ladder.

деление ДНК с помощью набора Diamond DNA не дало ожидаемых результатов: для всех изучаемых образцов наблюдался слабый уровень амплификации, выраженный в отсутствии четких фрагментов на электрофореграмме (рис. 1, *а*). Наиболее качественным оказалось выделение ДНК на колонках набором Nucleospin Plant II. На электрофореграмме были видны четкие фрагменты (см. рис. 1, *б*).

Протестировано 32 ISSR-маркера, из которых шесть дали воспроизводимый результат со всеми изученными образцами облепихи. Для молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК облепихи были отобраны следующие праймеры: UBC873, HB12, HB14, 814, 17899A, 17899B. С целью улучшения качества получаемых электрофореграмм проводили подбор оптимальной температуры отжига праймеров, устанавливая ее в диапазоне от 45 до 55 °C. Оптимальные температуры отжига для каждого праймера и количество амплифицированных фрагментов представлены в таблице.

В изученных образцах выявлено 56 амплифицированных ISSR-фрагментов ДНК, из которых 36 были полиморфными. Число амплифицированных фрагментов ДНК в общей выборке растений варьировало в зависимости от праймера от 6 (праймер 814) до 11 (UBC873, 17899A) (рис. 2). В среднем при ISSR-анализе один праймер инициировал синтез 9 фрагментов ДНК.

При анализе фотографий электрофорезного геля была составлена бинарная матрица признаков в программе Microsoft Exel (рис. 3): наличие фрагментов ДНК одинаковой длины отмечали цифрой 1, отсутствие – цифрой 0.

Анализ полиморфизма фрагментов ДНК при использовании данных ISSR-маркеров оказался достаточно информативным методом, благодаря которому удалось различить образцы облепихи и построить дендрограмму генетического сходства исследуемого материала (рис. 4).

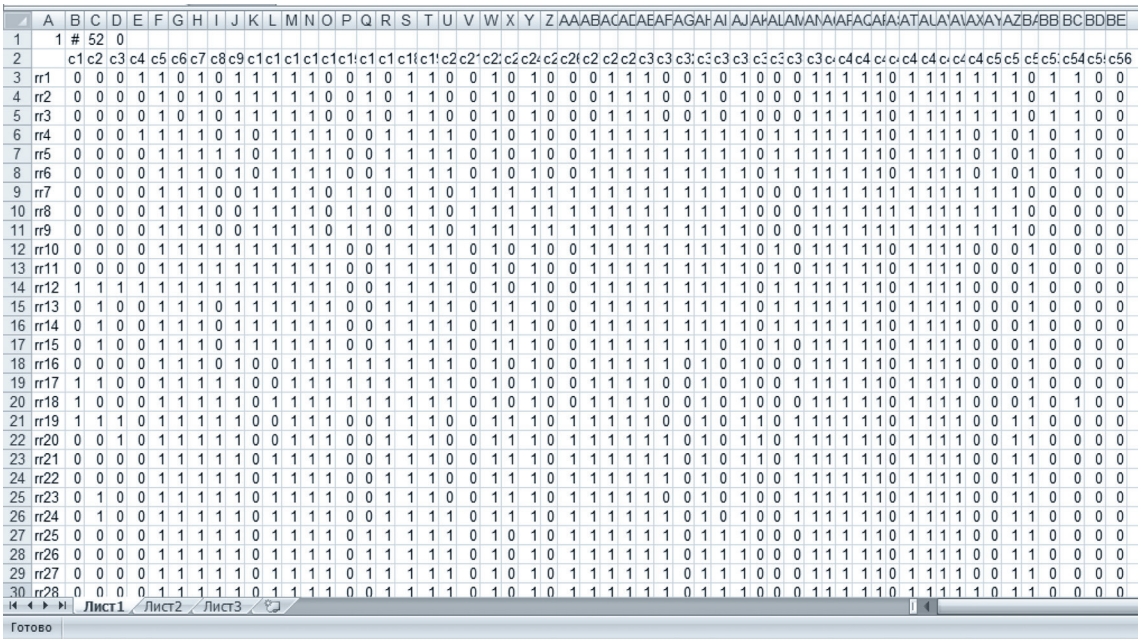


Fig. 3. Fragment of the binary matrix of characters.

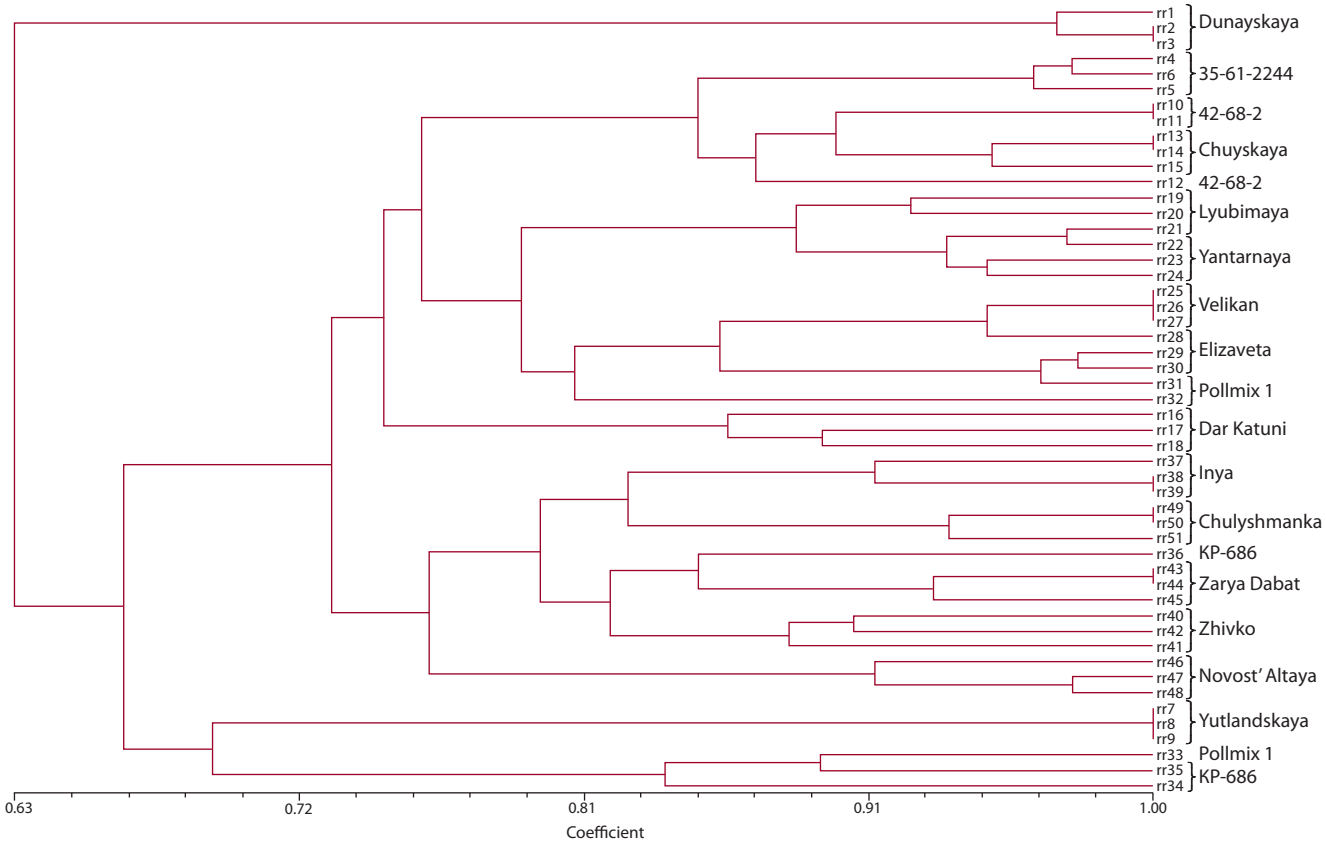


Fig. 4. UPGMA-dendrogram of sea buckthorn varieties according to ISSR data constructed with NTSYSpc 2.1 software.

В результате проведенного анализа образцы, взятые с разных экземпляров растений одного и того же сорта, объединились в кластеры первого порядка. В целом полученная дендрограмма согласуется с нашими предположениями, согласно которым вид разделяется на подвиды и разные экотипы. Так, дунайский экотип на построенном нами «дереве» выделился в отдельный кластер. На данной филограмме хорошо выделяются два кластера. В пределах

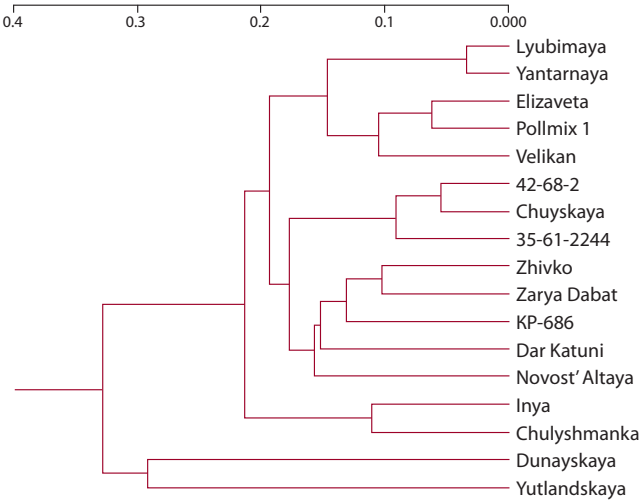


Fig. 5. UPGMA-dendrogram of sea buckthorn varieties according to ISSR data constructed with TFPGA 1.3 software.

небольшого первого кластера оказались образцы ютландского, киргизского экотипа и сорт немецкой селекции Pollmix 1. Второй крупный кластер, за исключением двух образцов немецкой селекции (Pollmix 1) и одного киргизского образца (КП-686), составляют образцы, относящиеся к ssp. *mongolica* (см. рис. 4).

Полученная нами ранее бинарная матрица признаков была преобразована (наличие полосы представляется в виде «1», отсутствие – в виде «2») и проанализирована в программе TFPGA 1.3 (tools for population genetic analyses), разработанной M.P. Miller (1997) специально для обработки популяционно-генетических данных. Полученная дендрограмма (рис. 5) имеет сходство с дендрограммой, построенной в программе NTSYSpc 2.1.

В результате проведенного кластерного анализа произошло разделение образцов на две отдельные группы: сортообразцы, относящиеся в основном к ssp. *mongolica*, и сортообразцы дунайского и ютландского экотипов. В первой группе сортообразцов обозначились три кластера. Первый кластер включает в себя пять сортов: Елизавета, Янтарная, Великан (два последних получены от скрещивания сорта Щербинки-1 (саянский экотип) с сеянцами катунского экотипа), сорт Любимая – от скрещивания сорта Щербинки-1 с сеянцами формы Кудырга (чулышманский экотип). В этот кластер также входит сорт немецкой селекции Pollmix1, что представляется весьма интересным в связи с имеющимися морфологическими сходствами между *H. rhamnoides* ssp. *mongolica* (российские сортообразцы) и *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides* (немецкие). Возможно, эти два подвида более близки по происхождению, чем предполагалось ранее.

Самый обширный – второй кластер, состоящий из сортов чуйского, катунского, бурятского, киргизского экотипов и сортообразцов, полученных от скрещивания сорта Красноярская 22 (красноярский экотип) с формой саянского экотипа. Как и в первом кластере, во втором присутствует сортообразец киргизского экотипа, не принадлежащий к подвиду *mongolica*. Примечательно, что этот образец морфологически не менее близок к основной группе изучаемых сортообразцов, чем немецкий экземпляр. Это также подводит нас к предположению о более высокой генетической близости данных подвидов.

В третий кластер объединились сорта Чулышманка (саянский × чулышманский экотип) и Иня (получен в результате использования химического мутагенеза путем обработки семян сорта Пантелеевская).

Во вторую группу, как уже было отмечено, вошли сортообразцы дунайского и ютландского экотипа, по морфологическим признакам существенно отличающиеся от основной группы исследуемых объектов.

Полученный результат позволяет рассматривать используемый метод как перспективный при изучении генетического разнообразия облепихи.

Заключение

Использование колонок Nucleospin Plant II для выделения ДНК из свежей растительной ткани позволяет извлечь ДНК в достаточном для ISSR-анализа количестве. Из 32 протестированных ISSR-маркеров выявлены шесть эффективных для анализа полиморфизма ISSR-локусов облепихи. Анализ ISSR-спектров сортообразцов облепихи выявил 56 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 36 полиморфны. На основе полученных результатов нами была построена дендрограмма генетического сходства исследуемого материала. В целом дендрограмма согласуется с данными нашей гипотезы, в соответствии с которой вид разделяется на подвиды и разные экотипы, а растения одного сорта образуют один кластер. На основании представленных результатов можно утверждать, что ISSR-маркирование является перспективным методом при изучении генотипического разнообразия облепихи.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bartish I.V., Jeppsson N. Application of molecular markers to study the systematic, phylogeny, biogeography, genetic diversity and population genetics of *Hippophae* L. Seabuckthorn (*Hippophae* L.): A Multipurpose Wonder Plant. 2003;1:64-71.

Bartish I.V., Jeppsson T., Bartish G.I., Lu R., Nybom H. Inter- and intraspecific genetic variation in *Hippophae* (Elaeagnaceae) investigated by RAPD markers. Plant Syst. Evol. 2000;225:85-101.

Bartish I.V., Jeppsson N., Nybom H. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Mol. Ecol. 1999;8:791-802. DOI 10.1046/j.1365-294X.1999.00631x.

Boronnikova S.V. Investigation of genetic variability in the population of the rare *Adenophora lilifolia* (L.) DC. species of the Ural region on the basis of ISSR marker analyses. Genetika = Genetics (Moscow). 2009;45(5):652-655. (in Russian)

Chen G., Wang Y., Zhao C., Korpelainen H., Li C. Genetic diversity of *Hippophae rhamnoides* populations at varying altitudes in the Wolong natural reserve of China as revealed by ISSR. Silvae Genet. 2008;57(1):29-36.

Jain A., Chaudhary S., Sharma P.C. Application of DNA technologies for improvement of seabuckthorn. Seabuckthorn (*Hippophae* L.): A Multipurpose Wonder Plant. 2014;4:167-178.

Kutsev M.G. Fragmentnyy analiz DNK rasteniy: RAPD, DAF, ISSR [Fragment analysis of plant DNA: RAPD, DAF, and ISSR]. Barnaul, Artika Publ., 2009. (in Russian)

Lacis G., Kota I., Rungis D. Application of SSR markers for the assessment of genetic diversity in Latvian seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). Seabuckthorn (*Hippophae* L.): A Multipurpose Wonder Plant. 2014;4:157-166.

Li H., Ruan C.-J., Teixeira da Silva J.A. Identification and genetic relationship based on ISSR analysis in a germplasm collection of sea buckthorn (*Hippophae* L.) from China and other countries. Sci. Hortic. 2009;123(2):263-271.

Miller M.P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author, 1997.

Novikova A.A., Sheykina O.V., Novikov O.V., Doronina G.U. Assessment of the possibility of applying ISSR-markers to the taxonomy and genetic classification of plants belonging to the *Rhododendron* genus. Nauchnyy zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU. 2012;82(08):1-11. (in Russian)

Omasheva M.E., Aubakirova K.P., Ryabushkina N.A. Molecular markers: Causes and consequences of genotyping errors. Biotekhnologiya. Teoriya i praktika = Biothechnology: Theory and Practice. 2013;4:20-28. (in Russian)

Raina S.N., Jain S., Sehgal D., Kumar A., Dar T.H., Bhat V., Pandey V., Vaishnavi S., Bhargav A., Singh V., Rani V., Tandon R., Tewari M., Mahmoudi A. Diversity and relationships of multipurpose seabuckthorn *(Hippophae* L.) germplasm from the Indian Himalayas as assessed by AFLP and SAMPL markers. Genet. Resour. Crop Evol. 2012;59:1033-1053. DOI 10.1007/s10722-011-9742-1.

Sun K., Chen X., Ma R., Li C., Wang Q., Ge S. Molecular phylogenetics of *Hippophae* L. (Elaeagnaceae) based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA. Plant Syst. Evol. 2002;235: 121-134.

Tian C., Lei Y., Shi S. Genetic diversity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) populations in northeastern and northwestern China as revealed by ISSR markers. New Forests. 2004;27(3):229-237.

Wang Y., Jiang H., Peng S., Korpelainen H. Genetic structure in fragmented populations of *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* in China investigated by ISSR and cpSSR markers. Plant Syst. Evol. 2011; 295:97-107.

Yao Y., Tigerstedt P.M.A. Isozyme studies of genetic diversity and evolution in Hippophae. Genet. Resour. Crop Evol. 1993;40:153-164.

Yongshan L., Xuelin C., Hong L. Taxonomy of seabuckthorn (*Hippophae* L.). Seabuckthorn (*Hippophae* L.): A Multipurpose Wonder Plant. 2003a;1:35-46.

Yongshan L., Xuelin C., Kun S., Ruijun M. A new subspecies of *Hippophae* (Elaeagnaceae) from China. Novon. 2003b;13(2):200-202.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):630-637
DOI 10.18699/VJ17.279

Коллекция микроорганизмов ИЦиГ СО РАН как генетический ресурс для биотехнологии

А.В. Брянская[1] ✉, Ю.Е. Уварова[1], А.С. Розанов[1], Н.М. Слынько[1], В.Н. Шляхтун[1], К.В. Старостин[1], Е.А. Демидов[1], Е.В. Лазарева[2], О.П. Таран[3], С.Е. Пельтек[1]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[3] Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

В создании новых биотехнологий важное значение имеют генетические знания о микроорганизмах, так как эффективность любых биотехнологий определяется особенностями структурно-функциональной организации молекулярно-генетических систем и их компонент, используемых для наработки целевых продуктов. При этом коллекции микробных культур играют решающую роль в мобилизации биологических ресурсов и позволяют сформировать прочную базу для генетических, молекулярно-биологических и биотехнологических исследований. Целью данной работы было проведение оценки ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик штаммов коллекции микроорганизмов, созданной в Федеральном исследовательском центре Институт цитологии и генетики (ФИЦ ИЦиГ) СО РАН, в качестве генетического ресурса для биотехнологии. Для 30 штаммов микроорганизмов коллекции, выделенных сотрудниками ИЦиГ из экстремальных природных экосистем, осуществлено описание ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик с использованием современных методов молекулярной биологии и масс-спектрометрии. Проведено выделение ДНК и секвенирование последовательностей генов 16S рРНК. Штаммы коллекции охарактеризованы по морфологическим, физиологическим, молекулярно-генетическим и масс-спектрометрическим характеристикам. Установлены особенности роста штаммов на разных средах, изучена морфология клеток. Штаммы протестированы на способность использовать различные субстраты. Установлены физиологические характеристики штаммов коллекции (отношение к кислороду, тип питания, диапазон температур и pH, отношение к NaCl и др.), различная устойчивость штаммов к антибиотикам. Определены хемотаксономические характеристики по составу жирных кислот штаммов коллекции. Проведено создание характеристичных масс-спектров белковых профилей исследованных штаммов коллекции. Получены и задепонированы в ГенБанке последовательности ДНК штаммов. Выполнена оценка биотехнологических свойств штаммов, определено содержание метаболитов (этанола, молочной и уксусной кислот) в культуральной жидкости. Ценность коллекции микроорганизмов ФИЦ ИЦиГ СО РАН как генетического ресурса для биотехнологии и биоинженерии определяется не только видовым разнообразием входящих в нее штаммов и широким ареалом их выделения, но и глубиной их характеризации с использованием максимально широкого арсенала как классических, так и современных методов, включая методы геномики, протеомики, транскриптомики и биоинформатики.

Ключевые слова: коллекция микроорганизмов; генетический ресурс; биотехнологии; штамм; молекулярно-генетические и фенотипические характеристики; экстремальные экосистемы.

Collection of microorganisms of ICG SB RAS as a genetic resource for biotechnology

A.V. Bryanskaya[1] ✉, Y.E. Uvarova[1], A.S. Rozanov[1], N.M. Slynko[1], V.N. Shlyakhtun[1], K.V. Starostin[1], E.A. Demidov[1], E.V. Lazareva[2], O.P. Taran[3], S.E. Peltek[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] V.S. Sobolev Institute of Geology and Mineralogy SB RAS, Novosibirsk, Russia
[3] Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk, Russia

Genetic knowledge of microorganisms plays a critical role in the creation of new biotechnologies, since the effectiveness of any biotechnology is determined by the particular qualities of the structurally functional organization of molecular-genetic systems and their components used for the production of targeted products. Collections of microbial cultures play a decisive role in mobilizing biological resources and make it possible to form a solid base for genetic, molecular biological and biotechnological research. The aim of this work was to assess the key molecular-genetic and phenotypic characteristics of strains of the collection of microorganisms created in the "FRC Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences" as a genetic resource for biotechnology. Thirty strains of microorganisms of the collection were isolated by employees of the FRC ICG SB RAS from extreme natural ecosystems, the key molecular-genetic and phenotypic characteristics were described using modern methods of molecular biology and mass-spectrometry. DNA isolation and the sequencing of 16S rRNA gene sequences were performed. The strains of the collection were characterized by morphological, physiological, molecular-genetic and mass-spectrometric characteristics. The particular qualities of growing of strains on different substrates have been established, the study of cell morphology has been carried out. The physiological characteristics of the strains of the collection have been established: the attitude to oxygen, the type of nutrition, the range of temperature and pH, the attitude to NaCl and others. Different resistance of strains to antibiotics has been established. The creation of personal mass spectra of protein profiles of the studied strains of the collection was carried out. The resulting DNA sequences of the strains are deposited in the GenBank. The chemotaxonomic characteristics

Received 07.09.2017
Accepted for publication 29.09.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: alla@bionet.nsc.ru

of strains have been determined. The biotechnological properties of the strains were assessed, the amount of metabolites (ethanol, lactic and acetic acids) in the culture liquid was determined. The value of the collection of microorganisms of the FRC ICG SB RAS as a genetic resource for biotechnology and bioengineering is determined not only by the species diversity of its strains, but also by a wide range of their area isolation and by the depth of their characterization using the widest arsenal of both classical and modern methods (including methods of genomics, proteomics, transcriptomics and bioinformatics).

Key words: collection of microorganisms; genetic resource; biotechnology; strain; molecular genetic and phenotypic characteristics; extreme ecosystems.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Брянская А.В., Уварова Ю.Е., Розанов А.С., Слынько Н.М., Шляхтун В.Н., Старостин К.В., Демидов Е.А., Лазарева Е.В., Таран О.П., Пельтек С.Е. Коллекция микроорганизмов ИЦиГ СО РАН как генетический ресурс для биотехнологии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):630-637. DOI 10.18699/VJ17.279

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Bryanskaya A.V., Uvarova Y.E., Rozanov A.S., Slynko N.M., Shlyakhtun V.N., Starostin K.V., Demidov E.A., Lazareva E.V., Taran O.P., Peltek S.E. Collection of microorganisms of ICG SB RAS as a genetic resource for biotechnology. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):630-637. DOI 10.18699/VJ17.279 (in Russian)

В создании новых биотехнологий критическую роль играют генетические знания о микроорганизмах, так как эффективность любых биотехнологий определяется особенностями структурно-функциональной организации молекулярно-генетических систем и их компонент, используемых для наработки целевых продуктов. Именно поэтому важнейшее значение имеет проведение широкомасштабных исследований и разработок в области генетических основ биотехнологических процессов в рамках комплексного подхода, использующего арсенал самых современных методов генетики, микробиологии, молекулярной биологии, генетической инженерии, геномики, протеомики, метаболомики и биоинформатики (Li et al., 2014; Scaife et al., 2015; Sun et al., 2015; Armengaud, 2016).

Огромное количество новых данных о микроорганизмах является ключом к исследованиям и разработкам в сфере биотехнологий (Elleuche et al., 2014; Pandhal, Noirel, 2014; Becker, Wittmann, 2016; Zammit, 2016). И именно в этом смысле коллекции микробных культур играют решающую роль в мобилизации биологических ресурсов. Коллекции служат хранилищем для штаммов, культур, геномов организмов, информации, касающейся наследственности и функций биологических систем, поставщиком безопасных и конфиденциальных услуг для хранения ключевых организмов для научных исследований и промышленности. Коллекции необходимы, чтобы сформировать прочную базу для генетических, молекулярно-биологических и биотехнологических исследований. Существующие ныне коллекции микроорганизмов со временем будут превращены в центры биологических ресурсов, с последующим объединением таких центров в глобальную сеть (www.oecd.org/dataoecd/55/48/2487422.pdf).

Коллекция микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии, исследования их генетики и метаболизма, созданная в Федеральном исследовательском центре Институт цитологии и генетики (ФИЦ ИЦиГ) СО РАН, является базой для обеспечения биотехнологических разработок разнообразными источниками геномов и генов на основе: более 1500 штаммов, культур микроорганизмов и образцов ДНК, значимых для науки и биотехнологии; представителей различных филогенетических (грибы, бактерии, археи) и физиологических групп (включая анаэробы и экстремофилы). Большинство штаммов коллекционного фонда выделено из ранее не изученных уникальных экстремальных экосистем: соленых озер, горячих источников, а также из почвы, морских акваторий, пресноводных водоемов, расположенных на территории Сибири и Дальнего Востока.

Повышенный интерес к проблеме экстремофильных микроорганизмов не случаен и обусловлен тем, что детальное изучение экстремофильных микроорганизмов на молекулярном уровне позволяет выявлять новые метаболические пути и особые механизмы адаптации к условиям, значительно отличающимся от обычных. С точки зрения практического использования экстремофилы являются богатейшим источником новых ферментов и метаболитов для промышленности, науки и медицины (Кевбрин, 2007). Ферментативные системы ряда микроорганизмов широко используются в настоящее время, но их потенциал раскрыт еще далеко не полностью.

Целью данной работы было проведение оценки ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик ряда штаммов коллекции микроорганизмов, созданной в ФИЦ ИЦиГ СО РАН в качестве генетического ресурса для биотехнологии. При этом выполнялись следующие задачи: 1) выделение ДНК и секвенирование последовательностей генов 16S рРНК; 2) оценка ключевых фенотипических характеристик штаммов; 3) оценка физиологических и хемотаксономических свойств штаммов; 4) оценка биотехнологических свойств штаммов.

Материалы и методы

Для описания ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик чистых культур микро-

организмов из коллекции ИЦиГ СО РАН было отобрано 30 штаммов. Исследованные штаммы были выделены из различных природных и природно-техногенных экстремальных экосистем Российской Федерации: из соленых озер Чано-Кулундинской области (Новосибирская область и Алтайский край), термального источника Сея (Баргузинская долина, Байкальская рифтовая зона), термопроявлений Долины гейзеров и кальдеры вулкана Узон Курило-Камчатского вулканического пояса, ореола рассеяния Урского хвостохранилища (Кемеровская область, пос. Урск) и гидроотвала Беловского цинкового завода (Кемеровская область, г. Белово), воды и ризосферы высших растений Новосибирского водохранилища.

Большинство точек отбора образцов для выделения штаммов отличалось экстремальными геохимическими условиями. Так, растворы озер Новосибирской области – нейтральные и слабощелочные ($6.5 < pH < 8.5$), характеризовались повышенной соленостью (12.3–26.7 г/л) либо относились к рассолам с минерализацией от 100 до 290 г/л (Bryanskaya et al., 2016). Растворы озер содержали также значительные концентрации B, Li, Sr, I (Лазарева и др., 2012). Воды термального источника Сея (Байкальская рифтовая зона) – щелочные (pH 9.8), горячие (49 °C), Na-F-HCO_3-SO_4 состава, характеризовались высоким содержанием анионогенных элементов в растворе (Lazareva et al., 2009; Лазарева и др., 2010). Микробное сообщество источника отличалось способностью концентрировать Ge, что делает объект привлекательным с точки зрения возможной биотехнологической добычи данного элемента. Физико-химические параметры термопроявлений Долины гейзеров и кальдеры вулкана Узон очень разнообразны по физико-химическим параметрам и составу, но их объединяет высокое содержание в растворах высокотоксичных элементов – Hg, As, Sb. Содержания эти столь высоки, что в пределах кальдеры Узон происходит формирование собственных минералов этих элементов в грифонах источников (Добрецов и др., 2015). Растворы Урского хвостохранилища относились к кислым дренажным (pH 1.9) и содержали повышенные концентрации Zn, Pb, Hg. Кроме того, в торфе ореола рассеяния установлено концентрирование Au и накопление Zn, Cu, Hg, Se, Ag, Pb (Saryg-ool et al., 2017). Микроорганизмы, способные выживать в таких экстремальных условиях, вероятно, обладают высокой степенью экстремофильности и являются перспективными для биотехнологических применений.

Среди исследованных штаммов наибольшее количество (14) выделено из воды и донных осадков соленых озер Новосибирской области. Из термальных источников Курило-Камчатского вулканического пояса получено 6 штаммов, из термальных источников Байкальской рифтовой зоны – 1 штамм, из соленых озер Алтайского края – 1 штамм, ореола рассеяния Урского хвостохранилища и Беловского цинкового завода – 7 штаммов, из ризосферы высших растений Новосибирского водохранилища – 1 штамм (Доп. материалы 1)[1]. Штаммы выделены на среде Лурия–Бертани (LB) и мясо-пептонном агаре (МПА) при температурах 37 и 60 °C (Практикум…, 2005). Работы выполнены в ЦКП «Коллекция микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии».

Одним из ключевых признаков таксономической принадлежности (филогенетического положения) штаммов служила последовательность гена 16S рРНК. Для этого ДНК бактерий выделяли стандартным методом с использованием фенола (Маниатис и др., 1984). Амплификацию гена 16S рРНК проводили при помощи универсальных бактериальных праймеров 16S-8-f-B (5′-AGRGTTTGATCCTGGCTCA-3′) и 16S-1350-r-B (5′-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3′). Реакционная смесь содержала 1.5 мМ $MgCl_2$, 65 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 16 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0.05 % Tween 20, 0.2 мМ dNTP, 0.3 мМ праймеров и 1 е.а. рекомбинантной Taq-полимеразы (SibEnzyme, Новосибирск). Секвенирование ДНК проводилось в ЦКП «Геномика» СО РАН. Поиск сходных последовательностей в нуклеотидных базах данных выполняли при помощи программ серии Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), выравнивание – при помощи программы ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2). Оценку морфологии клеток штаммов и установление факта спорообразования и размеров спор проводили на микроскопе Axioskop A1 (Karl Zeiss).

Для оценки способности штаммов утилизировать различные субстраты были использованы наборы МИКРОЛА-ТЕСТ (ERBA LACHEMA, Чехия).

Физиологические характеристики штаммов коллекции установлены согласно (Практикум…, 2005). Устойчивость штаммов к антибиотикам была исследована методом дисков (Практикум…, 2005). Концентрации хлорамфеникола и неомицина – 10 мг, пенициллина – 10 ЕД, эритромицина – 15 мг, канамицина – 30 мг.

Для хемотаксономической характеристики штаммов по составу жирных кислот пробоподготовку образцов и получение метиловых эфиров жирных кислот проводили по (Jenkins et al., 1977; Schaffer et al., 2004) щелочным гидролизом биоматериала с последующим подкислением, экстракцией жирных кислот гексаном и их метилированием системой HCl/CH_3OH. Анализ выполняли на хроматографе Agilent Technologies 6890N с кварцевой капиллярной колонкой DB-1 и квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5973N. Метиловые эфиры жирных кислот определяли с использованием базы масс-спектров The NIST MassSpectral Library Version 2.0a, а также сравнением полученных значений RI со значениями из той же базы. Значения RI определяли и рассчитывали, исходя из времен выхода пиков по (Dool, Kratz, 1963) с использованием данных анализа смеси гомологичных линейных алканов.

Для создания характеристичных масс-спектров для каждого штамма отбирали двенадцать проб бактериальной культуры. Пробу, содержащую примерно 10 мг культуры, ресуспендировали в 300 мкл деионизированной воды и инактивировали 900 мкл перегнанного этанола. После центрифугирования (2 мин, 15 600 g) удаляли супернатант и высушивали осадок. Осадок ресуспендировали в 50 мкл 70 % муравьиной кислоты. К суспензии добавляли 50 мкл ацетонитрила, полученную смесь тщательно перемешивали и центрифугировали 2 мин при 15 600 g. Для анализа ис-

[1] Дополнительные материалы 1 и 2 см. в Приложении по адресу: http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx9.pdf

пользовали супернатант. Пробу объемом 0.8 мкл наносили на масс-спектрометрическую мишень, после высыхания на нее наслаивали 0.8 мкл матрицы (6 мг/мл α-циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50 % ацетонитриле и 2.5 % муравьиной кислоты). Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Ultraflex III TOF/TOF стандартным методом для биотипирования. Внешнюю калибровку проводили по белковому экстракту *Escherichia coli*. Для каждой из двенадцати проб снимали по три масс-спектра. Полученные серии по 36 спектров использовали для генерации характеристичных масс-спектров в программе Biotyper 3. Характеристичные масс-спектры анализировали с помощью кластерного анализа.

Для оценки биотехнологических свойств штаммов определяли содержание в культуральной жидкости метаболитов – целевых продуктов (этанол, молочная кислота, уксусная кислота). Для количественного измерения метаболитов в культуральной жидкости был использован метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. Исследование образцов осуществляли на газожидкостном хроматографе Agilent Technologies 6890N с квадрупольным масс-спектрометром Agilent Technologies 5973N. Хромато-масс-спектрометрический анализ исследуемых растворов проводили по полному ионному току в режиме сканирования (SCAN) в диапазоне масс от 10 до 800 а.е.м., в режиме мониторинга селективных ионов (SIM) по молекулярному иону анализируемого соединения. Концентрацию этилового спирта, молочной и уксусной кислот находили сравнением площадей пиков экспериментальных образцов с калибровочными растворами.

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности с соблюдением условий стерильности.

Результаты

Филогенетическое положение исследованных штаммов. Из коллекции ИЦиГ СО РАН было отобрано 30 штаммов, выделенных из различных экосистем и регионов РФ, с целью определения и описания их молекулярно-генетических и фенотипических характеристик. Исследованные штаммы относились к двум родам: *Bacillus* и *Anoxybacillus* (см. Доп. материалы 1).

Особенности роста штаммов. Установлено, что большинство штаммов при росте на твердых средах образуют небольшие круглые колонии белого, молочного, грязно-белого или желтого цвета. Диаметр колоний варьировал от точечных (менее 1 мм) до 8 мм. Поверхность и профиль колоний менялись от гладких блестящих выпуклых до плоских шероховатых, с волнистым краем. Рост по штриху у штаммов варьировал от не расплывающегося до сильно расплывающегося, от четковидного до сплошного. Для многих штаммов установлено пигментообразование.

Морфология клеток. Все штаммы были представлены палочковидными клетками различной длины. Спорообразование установлено для большинства штаммов (рис. 1).

Оценка способности штаммов к утилизации различных субстратов. Все исследованные штаммы были протестированы на способность использовать различные субстраты (Доп. материалы 2). Установлено, что 16 штаммов обладали β-галактозидазной активностью.

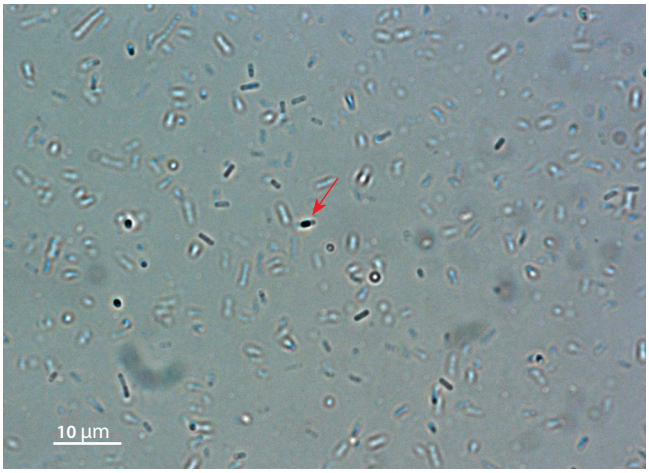


Fig. 1. Morphology of vegetative cells and spores of strain 47(11)il. The arrow points to a cell with a spore.

Все штаммы не использовали малонат, цитрат, орнитин и серосодержащие соединения. Все штаммы, кроме одного (штамм 4U), не использовали лизин. Только три штамма обладали уреазной активностью. Все штаммы не проявляли β-глюкоронидазной активности. Штаммы по-разному использовали маннитол, трегалозу и лактозу, целлобиозу, аргинин, мелибиозу, сорбитол, салицин, раффинозу, инозитол, арабитол, адонитол, дульцит. Шесть штаммов имели β-ксилозидазную активность. Таким образом, исследованные штаммы значительно отличались по своим биохимическим характеристикам.

Физиологические характеристики. Все отобранные штаммы являлись аэробами и/или факультативными анаэробами. По типу питания штаммы относились к гетеротрофам, хемоорганогетеротрофам. Преимущественное большинство штаммов хорошо росло на средах с казеином, крахмалом и твином в качестве единственного источника углерода. Большинство штаммов обладало выраженной казеиназной активностью и хорошей амилолитической активностью. При реакции с йодом помимо обычного обесцвечивания в ряде случаев наблюдалось покраснение среды вокруг колоний, свидетельствовавшее об образовании декстринов.

Диапазон температур для роста термофильных микроорганизмов составлял 40–70 °C с оптимумом при 60 °C, мезофильных микроорганизмов – от 25 до 40, 50 и 55 °C с оптимумом преимущественно при 35 °C. Интенсивный рост штаммов наблюдался при концентрации NaCl 1 г/л. Часть штаммов не росла или росла слабо при концентрации в среде NaCl 5 г/л.

Устойчивость к антибиотикам. В целом штаммы оказались наиболее устойчивы к пенициллину. Меньшие зоны подавления роста отмечены также для хлорамфеникола. Несмотря на то что эритромицин и канамицин были использованы в больших концентрациях, чем неомицин и хлорамфеникол, в ряде случаев диаметры зон отсутствия роста не отличались.

Хемотаксономическая характеристика штаммов. У всех исследованных штаммов практически отсутствовали ненасыщенные жирные кислоты. Все обнаруженные

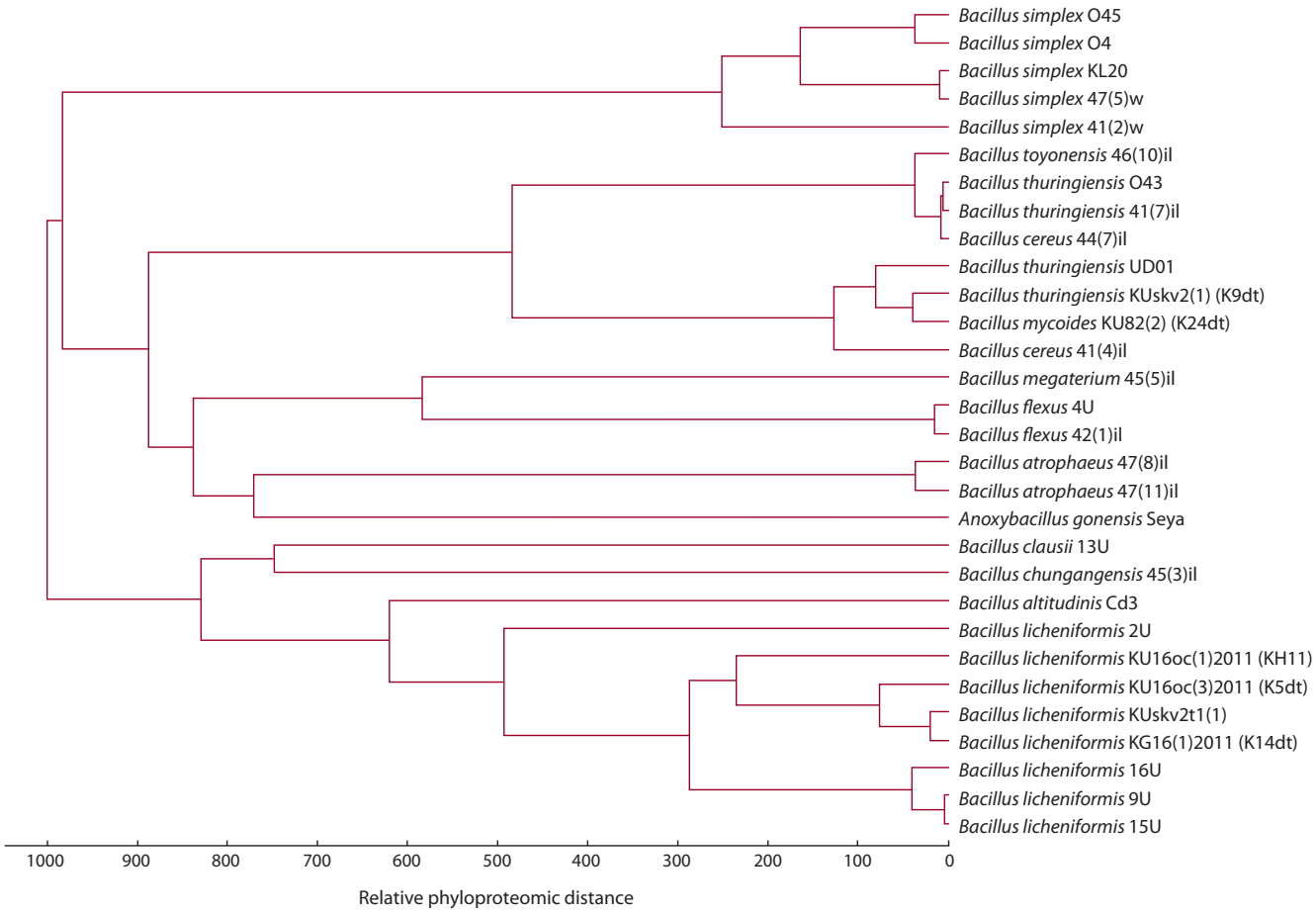


Fig. 2. Phyloproteomic tree constructed with Biotyper 3 for characteristic mass spectra of strains studied.

Ethanol contents in the culture liquid of strains studied

Taxon	Strain identifier	Ethanol content, %
A. gonensis	Seya	0.000875
B. chungangensis	45(3)il	0.013125
B. megaterium	45(5)il	0

кислоты содержали от 14 до 18 атомов углерода. За исключением штаммов Seya, 41(4)il, 13U и 46(10)il, у штаммов преобладали жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода. Штаммы Seya, 41(4)il и 13U характеризовались равным или повышенным содержанием жирных кислот с линейным строением, в остальных доминировали кислоты с разветвленным строением. Штамм 45(3)il практически не содержал линейных жирных кислот. Это является видовой характеристикой, что подтверждает сравнение с результатами, полученными (Cho et al., 2010). Наиболее представленные в коллекции виды – *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* и *B. simplex* – обладали сходными значениями соотношений нормальных/разветвленных и четных/нечетных кислот.

Хемотаксономическая характеризация по масс-спектрам белковых профилей проводилась с помощью кластерного анализа филопротеомных данных (рис. 2). Результаты кластеризации находились в соответствии с таксономической принадлежностью штаммов. Полученные характеристичные масс-спектры внесены в базу данных (http://www.bionet.nsc.ru/mbl/database/database.html) и могут быть использованы для идентификации микроорганизмов.

Оценка способности исследуемых штаммов к наработке целевых продуктов. Для ряда штаммов коллекции было определено содержание метаболитов в культуральной жидкости. Измеряли содержание следующих целевых продуктов: этанола, молочной кислоты, уксусной кислоты. Наличия молочной и уксусной кислот в культуральной жидкости исследованных штаммов не установлено. Содержание этанола составило от 0 до 0.01 %, что свидетельствует об отсутствии способности исследованных штаммов продуцировать искомые целевые продукты (см. таблицу).

Предварительные результаты, полученные для других 40 штаммов коллекции ИЦиГ СО РАН, относившихся к родам *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus* и *Aeribacillus*, показали, что большинство штаммов способны к наработке молочной кислоты. Более того, для ряда штаммов количество нарабатываемой молочной кислоты в условиях периодического культивирования достигало 1.29 г/л. Эти штаммы нарабатывали также этанол в количестве от 0.01

до 0.05 %. Кроме того, выявлен штамм рода *Anoxybacillus*, вырабатывающий на порядок больше этанола, чем другие культуры, – 0.2 %.

Последовательности ДНК исследованных микроорганизмов коллекции были депонированы в GenBank с присвоением им номеров KY323316–KY323345.

Обсуждение

Для 30 штаммов микроорганизмов коллекции ФИЦ ИЦиГ СО РАН, выделенных из экстремальных мест обитания, сделано описание ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик. Свойства, выявленные у штаммов, соответствовали их филогенетическому положению в семействе Bacillaceae (Slepecky, Hemphill, 2006; Logan, Vos, 2015). Бактерии родов *Bacillus* и *Anoxybacillus* широко распространены в природе и могут быть выделены практически из любого местообитания при культивировании на различных средах, при разных температурах, концентрации ионов водорода и др. (Slepecky, Hemphill, 2006). Клетки *Bacillus* могут составлять значительную долю общей численности гетеротрофной микрофлоры различных местообитаний (Logan, Vos, 2015), также они являются одной из доминирующих групп в культивируемых гетеротрофных микробных сообществах, например оз. Байкал (Суслова, 2007).

Род *Bacillus* – одна из наиболее разнообразных и коммерчески полезных групп микроорганизмов. Способность некоторых штаммов выдерживать высокие или низкие температуры и высокие или низкие значения pH сделала их важными источниками получения коммерческих препаратов ферментов. При развитии на простых сахарах, в особенности на глюкозе, они способны синтезировать ряд продуктов – молочную, уксусную и пропионовую кислоты, ацетилметилкарбинол и т. п., что делает их перспективными объектами для биотехнологии (Slepecky, Hemphill, 2006). В настоящее время штаммы *Bacillus* используются для получения продуктов четырех типов: ферментов; антибиотиков; высокоочищенных биопрепаратов, включая усилители запаха и пищевые добавки; инсектицидов (Priest, 1993).

Для массового скрининга больших коллекций микроорганизмов, в том числе близкородственных видов, в качестве точного, надежного, а главное, очень простого и быстрого инструмента зарекомендовала себя МАЛДИ времяпролетная масс-спектрометрия (Ruelle et al., 2004). Однако для эффективной работы этого метода необходима репрезентативная база данных, состоящая из характеристичных масс-спектров. Для тридцати штаммов, представленных в настоящей работе, одновременно с получением последовательностей гена 16S рРНК были получены характеристичные масс-спектры. Результаты филопротеомного анализа, представленные в виде дендрограммы (см. рис. 2), находились в соответствии с результатами молекулярно-генетического анализа (см. Доп. материалы 1). Группы штаммов, относящиеся к видам *B. simplex* и *B. licheniformis*, образовали на дендрограмме отдельные ветви. Третья крупная ветвь сформирована представителями так называемой *Bacillus cereus* group, состоящей из таких видов, как *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* и др. Виды, относящиеся к этой группе, имеют высокую филогенетическую идентичность, что затрудняет их достоверную идентификацию на внутригрупповом уровне с помощью стандартных методов, таких как секвенирование гена 16S рРНК, ДНК-ДНК гибридизация и др. (Rasko et al., 2005). Несмотря на то что в ряде работ продемонстрирована более высокая точность идентификации с помощью МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии по сравнению с секвенированием гена 16S рРНК (Rasko et al., 2005), надежная идентификация представителей *Bacillus cereus* group используемым методом требует наличия обширной и репрезентативной базы данных и продвинутых математических методов анализа (Lasch et al., 2009). Таким образом, необходимо дальнейшее пополнение базы данных, созданной в ФИЦ ИЦиГ СО РАН (Starostin et al., 2015), как представителями обнаруженной группы микроорганизмов, так и другими таксонами, что позволит создать эффективный инструмент для быстрой и точной идентификации больших коллекций микроорганизмов, а также дифференциации микроорганизмов на внутригрупповом и внутривидовом уровне.

В настоящей работе были оценены биотехнологические свойства штаммов коллекции, определено содержание метаболитов (этанола, молочной и уксусной кислот) в культуральной жидкости. Продукция этанола и молочной кислоты некоторыми штаммами показала высокий выход продуктов и потенциальную перспективность использования данных штаммов в биотехнологических процессах, что подтверждает долгую и выдающуюся историю рода *Bacillus* в области биотехнологии (Priest, 1993).

Кроме того, для штаммов коллекции ФИЦ ИЦиГ СО РАН проводится полногеномное секвенирование и процедура биотипирования на основании данных MALDI-TOF масс-спектрометрии (Bryanskaya et al., 2014; Starostin et al., 2015; Rozanov et al., 2017), а также скрининг штаммов для выявления возможности их трансформации. Выполняется поиск мобильных элементов и плазмид, пригодных для создания систем введения экзогенной ДНК в геном микроорганизма; изучение системы рестрикции–модификации выбранных микроорганизмов; создание челночных векторов (Rozanov et al., 2014). На основании этих исследований осуществляется оценка перспективности использования штаммов в биотехнологии и разрабатываются научно-практические рекомендации по их применению; создается база данных о свойствах выделенных штаммов.

Таким образом, в рамках нашей работы осуществлена оценка ключевых молекулярно-генетических и фенотипических характеристик ряда штаммов коллекции, созданной в ФИЦ ИЦиГ СО РАН, в соответствии с самыми современными требованиями к генетической коллекции микроорганизмов для разработки биотехнологий. Ядром коллекции являются культуры, выделенные из уникальных экстремальных экосистем. Выделение биотехнологически перспективных микроорганизмов, способных к продукции целевых соединений в условиях высокой солености, щелочности, температуры, проведено классическими микробиологическими методами. В результате получены оригинальные штаммы микроорганизмов. Характеристика штаммов коллекции проводится современными методами молекулярной биологии, геномики, протеомики и масс-спектрометрии.

Ценность коллекции микроорганизмов ФИЦ ИЦиГ СО РАН как генетического ресурса для биотехнологии определяется не только видовым разнообразием входящих в нее штаммов и ареалом их выделения, но и глубиной их характеризации с использованием максимально широкого арсенала как классических, так и современных методов.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Administration of Novosibirsk oblast, project 17-44-540815, and by the program of the development of bioresource collections, Federal Agency for Scientific Organizations, project 0324-2017-0003. Analyses of the environment of the organisms were conducted at the Shared Access Center for Multielement and Isotopic Studies, Siberian Branch of the RAS.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Armengaud J. Next-generation proteomics faces new challenges in environmental biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 2016;38:174-182. DOI 10.1016/j.copbio.2016.02.025.

Becker J., Wittmann C. Industrial microorganisms: *Corynebacterium glutamicum*. Industrial Biotechnology: Microorganisms. C. Wittmann, J.C. Liao (Eds.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2016;183-220. DOI 10.1002/9783527807796.ch6.

Bryanskaya A.V., Rozanov A.S., Logacheva M.D., Kotenko A.V., Peltek S.E. Draft genome sequence of *Geobacillus icigianus* strain G1w1T isolated from hot springs in the Valley of Geysers, Kamchatka (Russian Federation). Genome Announc. 2014;2(5):e01098-14. DOI 10.1128/genomeA.01098-14.

Bryanskaya A.V., Malup T.K., Lazareva E.V., Taran O.P., Rozanov A.S., Efimov V.M., Peltek S.E. The role of environmental factors for the composition of microbial communities of saline lakes in the Novosibirsk region (Russia). BMC Microbiology. 2016;16(1):S4. DOI 10.1186/s12866-015-0618-y.

Cho S., Jung M.Y., Park M.H., Kim W. *Bacillus chungangensis* sp. nov., a halophilic species isolated from sea sand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010;60:1349-1352. DOI 10.1099/ijs.0.013607-0.

Dobretsov N.L., Lazareva E.V., Zhmodik S.M., Bryanskaya A.V., Morozova V.V., Tikunova N.V., Peltek S.E., Karpov G.A., Taran O.P., Ogorodnikova O.L., Kirichenko I.S., Rozanov A.S., Babkin I.V., Shuvaeva O.V., Chebykin E.P. Geological, hydrogeochemical, and microbiological characteristics of the oil site of the Uzon caldera (Kamchatka). Russian Geology and Geophysics. 2015;56(1-2):39-63. DOI 10.15372/GiG20150103.

Dool D., Kratz P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J. Chromatogr. A. 1963;11:463-471. DOI 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.

Elleuche S., Schröder C., Sahm K., Antranikian G. Extremozymes – biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. Curr. Opin. Biotechnol. 2014;29:116-123. DOI 10.1016/j.copbio.2014.04.003.

Jenkins C.L., Kuhn D.A., Daly K.R. Fatty acid composition of Simonsiella strains. Arch. Microbiol. 1977;113:209-213. DOI 10.1007/BF00492027.

Kevbrin V.V. Termofilnye alkalofilnye mikroorganizmy [Thermophilic alkaliphilic microorganisms]. Trudy Instituta mikrobiologii im. S.N. Vinogradskogo [Proceedings of the Vinogradskiy Institute of Microbiology]. Moscow: Nauka Publ., 2007;374-395. (in Russian)

Lasch P., Beyer W., Nattermann H., Stämmler M., Siegbrecht E., Grunow R., Naumann D. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. Appl. Environ. Microbiol. 2009;75(22):7229-7242. DOI 10.1128/AEM.00857-09.

Lazareva E.V., Bryanskaya A.V., Taran O.P., Kolmogorov Yu.P., Malup T.K., Peltek S.E., Zhmodik S.M. Investigation of the distribution of elements among the components of a salt lake system by the XFEA-SR method. Poverkhnost. Rentgenovskie, sinkhrotronnye i neytronnye issledovaniya = Surface: X-ray, Synchrotron and Neutron Studies. 2012;12:70-80. DOI 10.1134/S1027451012120051. (in Russian)

Lazareva E.V., Bryanskaya A.V., Zhmodik S.M., Kolmogorov Y.P., Pestunova O.P., Barkhutova D.D., Zolotarev K.V., Shaporenko A.D. Elements redistribution between organic and mineral parts of microbial mats: SRXFA research (Baikal Rift Zone). Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A. 2009;603:137-140. DOI 10.1016/j.nima.2008.12.178.

Lazareva E.V., Bryanskaya A.V., Zhmodik S.M., Smirnov S.Z., Pestunova O.P., Barkhutova D.D., Polyakova E.V. Mineralization in cyano-bacterial mats of alkaline hydrotherms of the Barguzin basin of the Baikal rift zone. Doklady RAN = Proceedings of the Russian Academy of Sciences. 2010;430(5):675-680. DOI 10.1134/S1028334X10020169. (in Russian)

Li L., Degardin M., Lavergne T., Malyshev D.A., Dhami K., Ordoukhanian P., Romesberg F.E. Natural-like replication of an unnatural base pair for the expansion of the genetic alphabet and biotechnology applications. J. Am. Chem. Soc. 2014;136(3):826-829. DOI 10.1021/ja408814g.

Logan N.A., Vos P.D. Bacillus. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. DOI 10.1002/9781118960608.gbm00530.

Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie [Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning]. Moscow: Mir Publ., 1984. (in Russian)

Pandhal J., Noirel J. Synthetic microbial ecosystems for biotechnology. Biotechnol. Lett. 2014;36(6):1141-1151. DOI 10.1007/s10529-014-1480-y.

Praktikum po mikrobiologii. Pod red. A.I. Netrusova [A.I. Netrusov (Ed.) Practical course on microbiology]. Moscow: Akademiya Publ., 2005. (in Russian)

Priest F.G. Systematics and ecology of Bacillus. In: A. Sonenshein, J.A. Hoch, R. Losick (Eds.). *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria. Washington, DC: ASM Press, 1993;3-16. DOI 10.1128/9781555818388.ch1.

Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S., Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. FEMS Microbiol. Rev. 2005;29(2):303-329. DOI 10.1016/j.femsre.2004.12.005.

Rozanov A.S., Ivanisenko T.V., Bryanskaya A.V., Shekhovtsov S.V., Logacheva M.D., Saik O.V., Malup T.K., Demenkov P.S., Goryachkovskaya T.N., Ivanisenko V.A., Peltek S.E. Bioinformatics analysis of the genome of *Geobacillus stearothermophilus* 22 Strain isolated from the Garga hot spring, Baikal Region. Russ. J. Genetics: Appl. Res. 2014;4(4):267-272. DOI 10.1134/S207905971404011X.

Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Kotenko A.V., Peltek S.E. Draft genome sequence of *Thermoactinomyces* sp. Gus2-1 isolated from the hot-spring Gusikha in Bargusin Valley (Baikal Rift Zone, Russia). Genomics Data. 2017;11:1-2. DOI 10.1016/j.gdata.2016.11.014.

Ruelle V., Moualij B.E., Zorzi W., Ledent P., Pauw E.D. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004;18:18:2013-2019. DOI 10.1002/rcm.1584.

Saryg-ool B.Yu., Myagkaya I.N., Kirichenko I.S., Gustaytis M.A., Shuvaeva O.V., Zhmodik S.M., Lazareva E.V. Redistribution of elements between wastes and organic-bearing material in the dispersion train of gold-bearing sulfide tailings: Pt. I. Geochemistry and Mine-

ralogy. Sci. Total Environ. 2017;581-582:460-471. DOI 10.1016/j.scitotenv.2016.12.154.

Scaife M.A., Nguyen G.T.D.T., Rico J., Lambert D., Helliwell K.E., Smith A.G. Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. Plant J. 2015;82(3):532-546. DOI 10.1111/tpj.12781.

Schaffer C., Franck W.L., Scheberl A., Kosma P., McDermott T.R., Messner P. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004;54:2361-2368. DOI 10.1099/ijs.0.63227-0.

Slepecky R.A., Hemphill H.E. The genus *Bacillus* – nonmedical. Prokaryotes. 2006;4:530-562. DOI 10.1007/0-387-30744-3_16.

Starostin K.V., Demidov E.A., Bryanskaya A.V., Efimov V.M., Rozanov A.S., Peltek S.E. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. Sci. Rep. 2015;5:16989. DOI 10.1038/srep16989.

Sun Z., Harris H.M.B., McCann A., Guo C., Argimón S., Zhang W., Yang X., Jeffery I.B., Cooney J.C., Kagawa T.F., Liu W., Song Y., Salvetti E., Wrobel A., Rasinkangas P., Parkhill J., Rea M.C., O'Sullivan O., Ritari J., Douillard F.P., Ross R.P., Yang R., Briner A.E., Felis G.E., Vos W.M., Barrangou R., Klaenhammer T.R., Caufield P.W., Cui Y., Zhang H., O'Toole P.W. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. Nat. Commun. 2015;6:8322. DOI 10.1038/ncomms9322.

Suslova M.Yu. Rasprostranenie i raznoobrazie sporoobrazuyushchikh bakteriy roda Bacillus v vodnykh ekosistemakh [Distribution and diversity of spore-forming bacteria of the genus Bacillus in aquatic ecosystems]. Irkutsk: Novoe Delo Publ., 2007;14-36. (in Russian)

Zammit G. A culture collection of Maltese microorganisms for application in biotechnology, biomedicine and industry. Xjenza Online = J. Malta Chamber of Sci. 2016;4:86-89. DOI 10.7423/XJENZA.2016.1.12.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):638-645
DOI 10.18699/VJ17.280

Ювенильные окраски мини-свиней селекции ИЦиГ СО РАН

С.В. Никитин[1] ✉, С.П. Князев[2], К.С. Шатохин[3], Г.М. Гончаренко[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] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», кафедра разведения, кормления и частной зоотехнии, Новосибирск, Россия
[3] Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, Новосибирская область, пос. Краснообск, Россия

Настоящая работа продолжает начатое в предыдущем исследовании изучение расцветок мини-свиней селекции ИЦиГ СО РАН. Она тоже носит феноменологический характер, но рассматривается ювенильная окраска, которая является обязательным онтогенетическим элементом масти дикого типа (агути) у свиней вида *Sus scrofa* L. Однако у мини-свиней ИЦиГ, кроме особей масти дикого типа, ювенильной окраской обладают и поросята черно-пестрой масти. Следует заметить, что данных о подобном явлении у свиней черно-пестрой масти в литературе найти не удалось. Предположено, что своеобразная ювенильная окраска черно-пестрых мини-свиней ИЦиГ – следствие повышенного синтеза пигментов волосяного покрова, интенсивность которого, очевидно, превышает показатели как у дикого кабана, так и у домашних свиней. Показано, что у поросят мини-свиней ИЦиГ масти дикого типа цветовая гамма и рисунок ювенильной ливреи не соответствуют нормальным для дикого кабана. Новорожденные поросята у мини-свиней ИЦиГ масти дикого типа, как правило, имеют либо избыток желтого (оранжевого, коричневого) пигмента, что делает рисунок ювенильной ливреи размытым, неконтрастным, либо его недостаток, в результате чего они окрашены в серый или серо-голубой цвет с темно-серыми продольными полосками. Сам рисунок ювенильной ливреи у поросят мини-свиней ИЦиГ нарушен. Как правило, вместо продольно-полосатого имеет место сетчатый рисунок ливреи. Поэтому наблюдаемую у мини-свиней ИЦиГ масть, подобную агути, следует называть более корректно – масть псевдодикого типа. Предположено, что благодаря специально спланированным скрещиваниям удалось «вывести на поверхность» генетический груз мутаций в комплексе аллелей, принимающих участие в формировании масти дикого типа, и накопившийся в популяции, не подвергавшейся стабилизирующему отбору по этой архаичной для домашних свиней расцветке. Накопление этого генетического груза у мини-свиней стало возможным благодаря гипостатичности масти дикого типа по отношению к эпистатичным окраскам, стандартным для современных коммерческих заводских пород.

Ключевые слова: мини-свиньи; ювенильная ливрея; масть дикого типа; агути; масть черно-пестрая; синтез пигментов; локусы масти.

Juvenile coat colours in mini-pigs at ICG

S.V. Nikitin[1] ✉, S.P. Knyazev[2], K.S. Shatokhin[3], G.M. Goncharenko[3], V.I. Zaporozhets[1], V.I. Ermolayev[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia
[3] Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Bio Tecnologies RAS, Novosibirsk region, Krasnoobsk, Russia

This article continues a previous study colors in mini-pigs at ICG. It also has a phenomenological character, but it consideres juvenile colour, which is an integral element of the ontogenetic formation of the suit, wild type agouti pigs of the species *Sus scrofa* L. However, in ICG mini pigs, in addition to individuals with the suit of the wild type, juvenile colour is a feature of pigs with the black spotted suit. It should be noted that data about a similar phenomenon in pigs with black spotted colour were not found in the literature. We proposed that a unique juvenile colour of black spotted mini-pigs ICG is a consequence of increased synthesis of pigments of hair, the intensity of which obviously exceeds the performance by the wild boar and domestic pigs. Newborn piglets of mini pigs ICG of the colour of the wild type typically have too little or too much yellow (orange, brown) pigment, which makes the figure of juvenile livery blurry – low contrast, or the lack of it, with the result that they are gray or gray-blue color with dark gray longitudinal stripes. The pattern of juvenile livery piglets of mini pigs ICG is disrupted. As a rule, instead of a longitudinal stripe, a mesh pattern livery is observed. Therefore, the agouti like colour observed in mini-pigs ICG should rather be called more properly pseudowild type. It was suggested that the specially planned crosses were able to "reveal" the genetic load of mutations in the complex of alleles involved in the formation of the suit of the wild type and accumulated in the population, not exposed to stabilizing selection on this archaic for domestic pigs' colour. The accumulation of this genetic cargo at the mini-pigs was made possible by gipostatic suit wild type relative to epistatic colour standard for modern commercial plant breeds.

Key words: mini pigs; juvenile livery; colour of the wild type; agouti; black spotted colour; the synthesis of the pigments; the loci of the colour.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
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

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
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)

Received 21.04.2017
Accepted for publication 12.07.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: nsv1956@mail.ru

Настоящая статья продолжает начатый в 2012 г. цикл работ, посвященных описанию фено- и генотипических особенностей миниатюрных свиней Института цитологии и генетики СО РАН. Такое описание необходимо для выделения совокупности признаков, селекционно-значимых для данной группы мини-свиней, а также для определения наиболее перспективных направлений научных исследований. Предыдущая публикация описывала разнообразие окрасок мини-свиней ИЦиГ (Никитин и др., 2016). В ней было показано, что в стаде присутствуют две группы мастей. В первую группу, условно назовем ее статической, входят белая и черная масти, для которых характерна возрастная неизменность – ювенильный и полновозрастной фенотипы идентичны. Вторая группа, обозначим ее как динамическую, включает масти с возрастным диморфизмом – ювенильный и полновозрастной фенотипы различны. У мини-свиней ИЦиГ – это масти дикого или, выражаясь более корректно, псевдодикого, типа и черно-пестрая. Это оказалось полной неожиданностью, так как сведений о том, что окраска свиней черно-пестрой масти может с возрастом изменяться, в литературе найти не удалось. Ювенильная расцветка, отличная от полновозрастной, присуща большинству видов семейства свиных (Familia Suidae Gray, 1821) и оленевых (Familia Cervidae Gray, 1821) отряда парнокопытных (Ordo Artiodactyla Owen, 1848), а также видам семейства тапировых (Familia Tapiridae Burnett, 1830) отряда непарнокопытных (Ordo Perissodactyla Owen, 1848) (Соколов, 1979). У исходной для домашних свиней формы – дикого кабана (*Sus scrofa ferus*) – ювенильная окраска (ливрейная расцветка или ювенильная ливрея) представлена семью продольными темными полосами на рыжем фоне. Одна из этих полос проходит по хребту, шесть других – симметрично по три на каждом боку. Боковые полосы двухцветные – темные края и совпадающая с фоновым цветом середина (Козло, 1973; Данилкин, 2002). Сходную с диким кабаном ювенильную ливрею имеют и другие представители рода *Sus* (Соколов, 1979; Oliver, 2004). В формировании масти дикого типа у вида *Sus scrofa* основной вклад вносят локусы *ASIP* (аллель *A*) и *MC*1*R* (аллель E^+), но участвует также и ряд других локусов (Ollivier, Sellier, 1982; Andersson, Plastow, 2011). Черно-пестрая масть с белым фоновым цветом, пожалуй, единственная из окрасочных мутаций, регулярно встречающаяся у европейского дикого кабана (Козло, 1973). В ней можно выделить две фенотипические компоненты – это хаотически разбросанные по телу черные пятна и цвет фона. Отвечает за черно-пеструю масть аллель E^p локуса *MC*1*R* (Andersson, Plastow, 2011). Особи, гомозиготные по данному аллелю (E^p/E^p), имеют черные пятна на белом или красном фоне. Относительно фонового цвета существуют две точки зрения: либо черная пятнистость на красном или белом фоне обусловлена действием двух различных мутаций в локусе *MC*1*R* (Kijas et al., 2001), либо это результат взаимодействия аллелей локусов *MC*1*R* и *EDNRB* (Wilkinson et al., 2013). Физиологический механизм формирования черно-пестрости основан на неравномерности распределения меланокортина на поверхности тела плода, где он случайным образом концентрируется, образуя черные пятна (Fang et al., 2009).

Цель настоящего исследования заключается в описании вариантов ювенильных расцветок, наблюдаемых в стаде мини-свиней ИЦиГ у особей с окраской псевдодикого типа и черно-пестрой масти, и рассмотрении возможных генетических причин этих вариаций.

Материалы и методы

В исследовании использованы поросята лабораторных мини-свиней, разводимых в питомнике Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН (поселок Каинская Заимка Новосибирского района Новосибирской области), родившиеся в 2016 г. от специально проведенных скрещиваний, позволяющих максимально оценить потенциал вариабельности окрасок мини-свиней ИЦиГ. Варианты ювенильной расцветки определяли визуально. Всего было обследовано 216 особей в возрасте от трех недель до одного месяца, с окраской псевдодикого типа – 55, черно-пестрой – 47 особей. Были сделаны 63 фотографии 10 особей ливрейной расцветки и 32 – 4 особей черно-пестрой масти. Чтобы показать конечный результат возрастных изменений «динамических» окрасок, две особи – псевдодикого типа и черно-пестрая – были сфотографированы в годовалом возрасте после формирования полновозрастной расцветки.

Результаты

Окраска дикого типа. Ювенильная ливрея у поросят мини-свиней ИЦиГ подобна ливрее дикого кабана, но это именно подобие, а не идентичность. Поэтому окраску, классифицируемую в стаде мини-свиней как «дикий тип», более корректно именовать мастью псевдодикого типа.

Ювенильная ливрея мини-свиней ИЦиГ по цветовой гамме и рисунку отличается от таковой у дикого кабана и варьирует существенно шире. Наряду с особями, имеющими сочетание цветов, близкое к природному дикому типу (рис. 1), встречаются поросята с высокой концентрацией феомеланина в волосяном покрове (рис. 2) или, напротив, с его редукцией (рис. 3). Изредка рождаются поросята с очень светлой ливреей, представляющей светло-серые полосы на практически белом фоне, которые по мере взросления приобретают светло-серую, чалую масть (рис. 4). Собственно говоря, визуально наблюдаемые у мини-свиней ИЦиГ динамики изменений концентраций пигментов волосяного покрова от рождения до двух лет показывают, что концентрация феомеланина снижается, а эумеланина, напротив, растет вне зависимости от цветовой гаммы ювенильной ливреи.

Рисунок ювенильной ливреи у мини-свиней ИЦиГ псевдодикой масти отличается от рисунка, стандартного для дикого кабана. Вместо контрастных упорядоченных продольных полос имеют место полосы «размытые», как правило, одноцветно-темные, с резкими изгибами, отклонениями от продольной оси туловища, раздвоениями, перемычками и отростками (см. рис. 1–3, 5). Как следствие, вместо темных полос на светлом фоне рисунок ливреи может представлять светлые неправильной формы продолговатые пятна и короткие полоски на темном фоне, напоминая ювенильную окраску оленей или тапиров. Некоторое количество особей с искаженным рисунком ювенильной ливреи встречается и у европейского дикого кабана. Но эти искажения сводятся к поперечным

Fig. 1. A piglet of ICG mini pigs with a combination of colors (red and brown) close to that in the wild boar.
Photo by S. Knyazev.

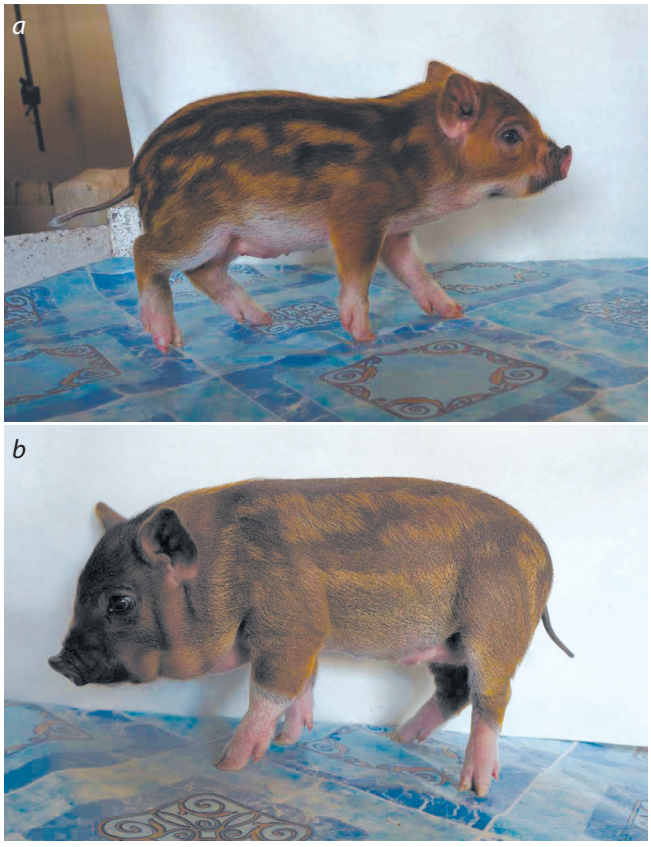


Fig. 2. Piglets of ICG mini pigs with a high concentration of pheomelanin in the hair.
Photo by S. Knyazev.

Fig. 3. Piglets of ICG mini pigs with reduced pheomelanin production.
Photo by S. Knyazev.

Fig. 4. A piglet with light gray roan color, almost white.
Photo by V. Koval.

перемычкам между продольными полосами и, возможно, свойственны только популяциям, в которых происходили спонтанные скрещивания с домашними свиньями (Козло, 1973). У мини-свиней ИЦиГ все новорожденные особи псевдодикой масти имеют ювенильную ливрею с искаженным рисунком, особи с рисунком, классическим для видов рода *Sus*, т. е. состоящим на боках только из продольных полос, отсутствуют. Можно предположить, что вариации рисунка ювенильной ливреи у дикого кабана и мини-свиней ИЦиГ являются случайными отклонениями от нормы. Возможно, это и верно для дикого кабана, но то, что мини-свиньи ИЦиГ всегда имеют искаженный рисунок ливреи, подразумевает наличие наследственной компоненты.

В формировании масти дикого типа принимают участие аллель *A* локуса *ASIP* и аллель E^+ локуса *MC*1*R*.

Fig. 5. Piglets of ICG mini pigs with aberrations in the juvenile livery pattern.
Photo by S. Knyazev.

Мини-свиньи ИЦиГ псевдодикой масти, как правило, имеют черные пятна, т. е. являются гетерозиготами E^+/E^p по локусу *MC*1*R* (Никитин и др., 2016). Аллель E^p обеспечивает черно-пеструю масть, для которой характерно хаотическое расположение черных пятен, поэтому логично предположить, что взаимодействие аллеля E^p с аллелем E^+ или аллелем *A* локуса *ASIP*, либо оба таких взаимодействия, увеличивает случайную вариацию в рисунке ювенильной ливреи. Можно также предположить, что существуют генетические факторы, не относящиеся к локусам *ASIP* и *MC*1*R*, которые увеличивают неопределенность реализации рисунка ювенильной ливреи. Однако вопрос о том, какое из перечисленных предположений верно, может быть решен только в результате дальнейших исследований.

Черно-пестрая масть. У мини-свиней ИЦиГ она имеет также ювенильную окраску. Для новорожденных поросят мини-свиней ИЦиГ черно-пестрой масти характерен полиморфизм по цвету фона, который может быть белым, серым-чалым, светло-рыжим или коричнево-рыжим (рис. 6). При этом существует два непрерывных вариационных ряда континуальных изменений ювенильных фоновых цветов:

1. Белый → … → светло-серый → … → серый → … → темно-серый.
2. Белый → … → бледно-рыжий → … → рыжий → … → кирпичный.

Таким образом, у мини-свиней ИЦиГ черно-пестрой масти с генотипом E^p/E^p прежнюю дискретную детерминацию фонового цвета (либо белый, либо красный) сменило континуальное проявление признака.

По мере взросления особи белый фон может сохраниться или преобразоваться в светло-серый с голубоватым оттенком, серый становится темно-серым, светло-рыжий – серым или белым, коричнево-рыжий – темно-серым, почти черным.

Очевидно, интенсивность образования пигментов в эмбриональный период у мини-свиней ИЦиГ существенно превышает норму, свойственную как дикому кабану, так и домашним свиньям. Как следствие, избыточный синтез пигментов и насыщение ими эмбрионального волосяного покрова приводит к «размыванию» рисунка ювенильной ливреи (см. рис. 1–3, 5) и «окрашиванию» исходно белого фона у черно-пестрых особей (см. рис. 6). Обращает на себя внимание сходство возрастных динамик изменений концентраций фео- и эумеланина в волосяном покрове у мини-свиней ИЦиГ псевдодикой и черно-пестрой масти. И в том и в другом случае после рождения особи происходит снижение доли волос с высокой концентрацией феомеланина при росте доли волос с эумеланином. Своего максимума концентрация феомеланина, очевидно, достигает еще в пренатальный период, а концентрация эумеланина – к возрасту одного-двух лет. Таким образом, динамики возрастных изменений концентрации пигментов у поросят псевдодикой и черно-пестрой масти совпадают и, надо полагать, контролируются одними и теми же аллелями одних и тех же локусов. Такая параллельная регуляция синтеза и ингибиции пигментов у мини-свиней ИЦиГ двух разных

Fig. 6. Black-spotted piglets of ICG mini pigs.
Photo by S. Knyazev.

Fig. 7. A pseudoagouti boar devoid of the yellow pigment at the age of one year. The same boar at the age of 1 month can be seen in Fig. 3 *a*.
Photo by S. Knyazev.

Fig. 8. A black-spotted sow with dark gray background color at the age of one year. The same sow at the age of one month can be seen in Fig. 6 *d*.
Photo by S. Knyazev.

расцветок вполне может осуществляться одной генетической системой с неспецифическим, не различающим фео- и эумеланин, эффектом. Однако динамики процессов синтеза и ингибиции пигментов, скорее, указывают на два отдельных генетических механизма, работающих с разными пигментами. Для феомеланина, очевидно, характерны интенсивный синтез в пренатальный период и его прекращение или значительное снижение после рождения. В дальнейшем онтогенезе, в процессе линек, ювенильные волосы, несущие высокую концентрацию феомеланина, заменяются у особей псевдодикой агути-подобной масти соответственно окрашенной щетиной. В отдельных случаях механизм синтеза феомеланина уже в пренатальный период оказывается подавлен. В резуль-

тате рождаются поросята с серой или голубовато-серой ливреей (см. рис. 3), которые к возрасту одного года приобретают агутиподобную масть, лишенную желтого/коричневого пигмента (рис. 7).

У черно-пестрых особей процесс синтеза-ингибиции феомеланина выглядит более контрастно: концентрация феомеланина у особи максимальна при рождении, далее волосы с феомеланином постепенно утрачиваются и в возрасте около одного года могут наблюдаться только отдельные оранжево-рыжие волоски на холке и спине. Интенсивность синтеза и максимальная концентрация феомеланина в пренатальный период варьируют, что хорошо заметно на черно-пестрых особях, которые при рождении могут иметь фоновый цвет от бледно-рыжеватого до рыже-коричневого (см. рис. 6). Динамика изменения концентрации эумеланина в щетине мини-свиней ИЦиГ выглядит иначе, чем феомеланина. Для нее характерно постоянное увеличение концентрации пигмента, по крайней мере на протяжении первых двух лет жизни особи. Начало процесса интенсивного синтеза эумеланина, очевидно, может приходиться как на пренатальный, так и на постнатальный период. Свидетельство этому – поросята масти «серые псевдоагути» (см. рис. 3) и черно-пестрые с серым при рождении фоном (см. рис. 6, *в*), а также «сереющие» с возрастом черно-пестрые поросята с рыжим или белым при рождении фоном и «чернеющие» поросята масти псевдодикого типа с коричнево-рыжей ливреей.

В стаде мини-свиней ИЦиГ изредка встречаются весьма интересные черно-пестрые особи с интенсивным синтезом феомеланина, у которых начало синтеза эумеланина смещено на пренатальный период. У таких поросят передняя часть туловища может иметь своеобразный коричнево-сизый цвет, обусловленный смещением волос с фео- и эумеланином (см. рис. 6, *г*). Интересно отметить, что именно в направлении от головы к хвосту происходит смена шерстного покрова у диких кабанов (Козло, 1973). Очевидно, у представленной особи (см. рис. 6, *г*) в пренатальный период произошло опережающее формирование волос с эумеланином, предназначенных для смены содержащих феомеланин эмбриональных волос именно в той части тела, с которой и должна была эта смена начаться, т. е. в передней части туловища. Таким образом, в этой части тела присутствуют волосы двух «генераций»: ранние феомеланинсодержащие и поздние эумеланинсодержащие. В дальнейшем данная особь в процессе линьки утратила содержащие феомеланин волосы и полностью покрылась содержащими эумеланин, приобретя темно-серый фоновый цвет (рис. 8). В целом процесс синтеза эумеланина у мини-свиней ИЦиГ оказывается более растянутым, чем синтез феомеланина, а начало синтеза эумеланина большей частью приходится на постнатальный период и, очевидно, совпадает с окончанием синтеза феомеланина.

У черно-пестрых животных динамики понижения и повышения концентрации пигментов повторяют таковые у особей псевдодикой масти. Однако возникает вполне естественный вопрос о том, что же может быть причиной, позволяющей визуально проявиться этому совпадению. В связи с этим весьма интересными представляются проявления черно-пестрости у гетерозигот по аллелю E^p. Проведенное нами ранее на мини-свиньях ИЦиГ исследование (Никитин и др., 2016), дополненное наблюдениями на свинокомплексе «Чистогорский», где в межпородных скрещиваниях используют свиней породы дюрок красной масти, показывает, что у гетерозигот по аллелю E^p цвет фона определяется вторым аллелем локуса *MC*1*R* (таблица).

Background colors in pigs heterozygous for the E^p allele of the *MC*1*R* loci

Genotype	Background colour
E^p/E^+	Wild type: juvenile livery and mature agouti
E^p/E^D	Black
E^p/e	Red

Таким образом, белый фон у гомозигот E^p/E^p можно интерпретировать не как собственно белый цвет, а как отсутствие цвета, т. е. «прозрачность», позволяющую у гетерозигот $E^p/\ldots$ проявиться цвету, детерминируемому оппозитным аллелем локуса *MC*1*R*. С этой точки зрения, многократно описанная в литературе черно-пестрая по красному фону масть гомозигот E^p/E^p может быть результатом действия аллеля другого локуса, контролирующего интенсивный синтез красного пигмента. Нечто подобное, вероятно, имеет место и у мини-свиней ИЦиГ.

Визуально фиксируемые вариации концентраций фео- и эумеланина у мини-свиней ИЦиГ, очевидно, обусловлены одной и той же причиной – изменениями в механизме, контролирующем процесс формирования масти дикого типа. Специфический набор элементов этой масти, в первую очередь, определяется взаимодействием аллелей *A* (локус *ASIP*) и E^+ (локус *MC*1*R*) (Andersson, Plastow, 2011). Параллельная изменчивость ювенильных окрасок у мини-свиней ИЦиГ псевдодикой и черно-пестрой масти не может быть обусловлена локусом *MC*1*R* просто потому, что черно-пестрые гомозиготы имеют генотип E^p/E^p, а для реализации масти дикого типа необходим аллель E^+, хотя бы в гетерозиготном состоянии. Участие локуса *ASIP* в формировании наблюдаемого разнообразия ювенильных вариантов псевдодикой и черно-пестрой окраски, по нашему мнению, также представляется маловероятным. Описанная в литературе мутация локуса *ASIP* (рецессивный аллель *a*) одновременно отключает весь комплекс элементов, из которых складывается масть дикого типа, – гомозиготы *a*/*a* имеют не меняющуюся с возрастом, незонарную, однородную и одноцветную масть. Функция локуса *ASIP*, скорее всего, заключается во включении и отключении всей совокупности механизмов, контролирующих отдельные, в той или иной степени независимые последовательности событий, приводящих к формированию масти дикого типа. Вероятным источником наблюдаемого у мини-свиней ИЦиГ разнообразия окрасок могут быть мутации в локусах, обслуживающих последовательности событий, которые включают аллель *A* локуса *ASIP*. Подтверждением такой концепции можно рассматривать недавнюю публикацию итогов математического моделирования, показывающего в общем виде процесс формирования неравномерно дис-

кретной – пятнистой окраски животных (Nesterenko et al., 2017). Модель демонстрирует, что окраски подобного типа являются результатом самоорганизации в эмбриогенезе диссипативных динамических пространственных структур. Ювенильная ливрея формируется в эмбриогенезе и представляет собой неравномерную окраску, состоящую из четко ограниченных дискретных элементов. Следовательно, она является конечным продуктом действия эмбриональной диссипативной структуры, которая «содержит инструкцию» по упорядоченной в пространстве, а не случайной дифференцировке тканей зародыша, формируя градиенты концентраций соответствующих белков-морфогенов. Распределение клеток, содержащих фео- и эумеланин, согласно предлагаемой модели (Nesterenko et al., 2017), будет зависеть от территориального распределения белков-протеогликанов, с которыми связываются белки-морфогены, в межклеточном матриксе. Надо полагать, что у дикого кабана существует генетически обусловленная система распределения концентраций соответствующих протеогликанов, которая и определяет цветовую гамму и конфигурацию рисунка ювенильной ливреи в определенных рамках, допускающих ограниченный диапазон случайной вариации. Мутации (а может быть, даже и единичная мутация, разрушающая координацию формирования градиентов распределения концентраций белков-морфогенов) вполне способны обеспечить все многообразие ювенильных расцветок мини-свиней ИЦиГ, включая и те, которые были выявлены у особей черно-пестрой масти.

Обсуждение

Разнообразие ювенильных окрасок у мини-свиней ИЦиГ кажется на первый взгляд спонтанным. Однако оно спровоцировано специально проведенными скрещиваниями, благодаря которым было вскрыто происходящее у домашней формы вида *Sus scrofa* разрушение сложной адаптивной системы (окраски дикого типа) при отсутствии отбора по данному признаку. Классическим примером разрушения и деградации сложной адаптивной системы служат слепые пещерные рыбы, у которых при отсутствии отбора на способность видеть мутационный процесс разрушил зрительную систему с полной или частичной редукцией глаз (Кирпичников, 1987; Бердников, 2003). Интересным примером такого же разрушения сложной адаптивной системы, происходящим в короткое время, могут служить изменения волосяного покрова при клеточном содержании пушных зверей (Беляев, 1972). Масть диких кабанов является сложной адаптивной системой, находящейся в природных популяциях под давлением стабилизирующего естественно отбора, который жестко ограничивает диапазон ее вариации. Процесс разрушения агути-комплекса у вида *Sus scrofa*, очевидно, стартовал с началом его одомашнивания около восьми тысяч лет назад (Kijas, Andersson, 2001). При одомашнивании масть дикого типа утратила свое адаптивное маскирующее значение, а демаскирующие окраски, сигнализирующие о том, что животное домашнее, стали адаптивно выгодными и селекционно предпочтительными. Поскольку масть дикого типа является гипостатичной по отношению к основным окраскам домашних свиней, она могла на протяжении тысячелетий находиться у них в скрытом состоянии, не подвергаясь отбору. А это означает, что у домашних свиней в комплексе аллелей, формирующих масть дикого типа, могли безболезненно и безнаказанно для носителей накапливаться мутации, его разрушающие. Скрещивания, проведенные в селекционной группе мини-свиней ИЦиГ, выявили этот генетический груз, что и обеспечило высокую вариацию цветовой гаммы и конфигурации рисунка ювенильной ливреи у поросят псевдодикой масти, а также своеобразную, не имеющую аналогов, включающую ювенильную и полновозрастную стадию, черно-пеструю масть.

Наблюдаемое у мини-свиней ИЦиГ явление напоминает действие дестабилизирующего отбора (Беляев, 1974; Belyaev, 1979), за исключением отсутствия самого этого отбора при разведении мини-свиней. Сопоставление наших результатов с концепцией дестабилизирующего отбора поневоле наводит на мысль о том, что его дестабилизирующая функция может заключаться в переносе основного вектора отбора по общей приспособленности с одного признака на другой. В такой ситуации при существенном ослаблении давления отбора на признак, имевший ранее наиболее важное значение, весь связанный с ним генетический груз (как накопленный ранее, так и вновь образующийся) получает возможность для реализации. Собственно говоря, это и было блестяще показано академиком Д.К. Беляевым при отборе пушных зверей по их реакции на человека. Когда давление отбора было искусственно максимизировано на одном конкретном признаке, произошел «выход на поверхность» имевшихся в селекционируемой группе еще до начала отбора по реакции на человека мутаций признаков, не связанных с селекционируемым параметром (Беляев, 1972, 1974). Логика стабилизирующего отбора по приспособленности позволяет предположить, что его прессинг должен либо подавлять мутабильность локусов, контролирующих адаптивные приспособительные структуры, либо, наоборот, усиливать репарацию поврежденных мутациями участков этих локусов. И в том и в другом варианте прекращение или значительное ослабление давления отбора на адаптивные структуры должно повлечь за собой частичное или полное разрушение механизмов, снижающих мутабильность локусов, эти структуры контролирующих. Как следствие, частота мутаций в локусах, контролирующих ставшие уже ненужными адаптивные системы, должна увеличиться. Возможно, нечто подобное имело место в экспериментах Д.К. Беляева, приведших к концепции дестабилизирующего отбора, а также, очевидно, произошло у домашних свиней с окраской дикого типа.

В заключение следует обсудить возможные эволюционные последствия разрушений продольно-полосатой ювенильной ливреи, наблюдаемые у мини-свиней ИЦиГ. Прежде всего, вариация элементов ювенильной ливреи показывает, что исходный адаптивный фенотип с продольными темными полосами на светлом фоне может преобразовываться в фенотип со светлыми пятнами на темном фоне. В сущности, у мини-свиней ИЦиГ присутствуют расцветки, промежуточные между полосатостью поросят дикого кабана и пятнистостью телят оленей. Это представляет определенный интерес, так как может быть аналогом одного из эволюционных векторов в отряде пар-

нокопытных. В общем виде данный эволюционный вектор можно охарактеризовать как разрушение одной сложной упорядоченной адаптивной системы с последующим формированием из ее фрагментов новой, на данный момент более актуальной. Определенный интерес представляют также снижение контрастности рисунка ювенильной ливреи и утрата двухцветности полос. Последнее, по сути, – утрата контрастности между частями элемента ювенильной ливреи (полосы). Очевидно, этот феномен показывает рост энтропии внутри структуры, утратившей свою адаптивную ценность. Снижение контрастности между элементами ювенильной ливреи свидетельствует об ослаблении механизма, реализующего территориальную локализацию клеток, содержащих фео- и эумеланин. Таким образом, кроме разрушения элементов ювенильной ливреи происходит их взаимное проникновение друг в друга. Вполне естественно, что этот процесс быстрее проходит между тесно контактирующими частями одного элемента (внутри полосы), чем между двумя разными элементами ювенильной ливреи (полосы и фон). Отсюда и одноцветность полос у мини-свиней ИЦиГ масти псевдодикого типа при пониженной контрастности между цветом полос и фоновым цветом ювенильной ливреи. Окончательным результатом процесса «рассеивания» пигментных клеток и взаимного проникновения элементов ювенильной ливреи друг в друга должен стать вариант с максимальной энтропией, т. е. относительно однородная ювенильная окраска. Вполне возможно, что именно это и случилось у отдельных видов отряда парнокопытных (Соколов, 1979).

Следовательно, накопление энтропии в эмбриональной самоорганизующейся динамической пространственной структуре, освободившейся от давления отбора, может быть своеобразным эволюционным вектором. В случае с домашними свиньями этот процесс обеспечивается выходом ювенильной ливрейной расцветки из-под давления отбора и ее переходом в скрытое состояние потенциальной, но не реализуемой возможности. В целом у мини-свиней ИЦиГ, очевидно, присутствуют зачатки по крайней мере двух эволюционных векторов, результаты действия которых наблюдаются в отряде парнокопытных.

Acknowledgments

This work was supported in part by State Budgeted Project 0324-2016-0002.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Andersson L., Plastow G. Molecular genetics of coat colour variation. The Genetics of the Pig. Ed. by M.F. Rothschild, A. Ruvinsky. CAB International. Wallingford, 2011;38-50.

Belyaev D.K. Geneticheskie aspekty domestikatsii zhivotnykh [Genetic aspects of animal domestication]. Problemy domestikatsii zhivotnykh i rasteniy [Problems of Animal and Plant Domestication]. Moscow: Nauka Publ., 1972;39-45. (in Russian)

Belyaev D.K. O nekotorykh voprosakh stabiliziruyushchego i destabiliziruyushchego otbora: Istoriya i teoriya evolyutsionnogo ucheniya [On some issues in stabilizing and destabilizing selection: The history and theory of the evolutionary doctrine]. Leningrad: Nauka Publ., 1974;2:76-84. (in Russian)

Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication. J. Hered. 1979;70:301-308.

Berdnikov V.A. Selection for evolution rate as one of the factors defining the morphology of multicellular organisms. Ekologicheskaya genetika = Ecological Genetics (Saint-Petersburg). 2003;1(S):59-66. (in Russian)

Danilkin A.A. Svinyie (Suidae) [Pigs (Suidae)]. Ser. Mlekopitayushchie Rossii i sopredelnykh regionov [Mammals of Russia and adjacent regions]. Moscow: Geos Publ., 2002. (in Russian)

Fang M., Larson G., Ribeiro H.S., Li N., Andersson L. Contrasting mode of evolution at a coat color locus in wild and domestic pigs. PLoS Genetics. 2009;5:e1000341.

Kijas J.M.H., Andersson L. A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. J. Mol. Evol. 2001;52:302-308.

Kijas J.M., Moller M., Plastow G., Andersson L. A frameshift mutation in *MC1R* and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. Genetics. 2001;158:779-785.

Kirpichnikov V.S. Genetika i selektsiya ryb [Genetics and breeding of fish]. Leningrad: Nauka Publ., 1987. (in Russian)

Kozlo P.G. Opredelenie vozrasta, selektsiya i otlov dikogo kabana [The wild boar: age determination, breeding, and trapping]. Minsk: Uradzhay Publ., 1973. (in Russian)

Nesterenko A.M., Kuznetsov M.B., Korotkova D.D., Zaraisky A.G. Morphogene adsorption as a Turing instability regulator: Theoretical analysis and possible applications in multicellular embryonic systems. PLoS ONE. 2017;12(2):e0171212. DOI 10.1371/journal.pone.0171212.

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)

Oliver W.L.R. First (and last?) breeding loan export of Visayan (Negros) warty pigs. Suiform Soundings. 2004;4(1):25-27.

Ollivier L., Sellier P. Pig genetics: a review. Ann. Genet. Sel. Anim. 1982;14(4):481-544.

Sokolov V.E. Sistematika mlekopitayushchikh. T. 3 [Taxonomy of mammals. Vol. 3]. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1979. (in Russian)

Wilkinson S., Lu Z.H., Megens H.J., Archibald A.L., Haley C., Jackson I.J., Groenen M.A., Crooijmans R.P., Ogden R., Wiener P. Signatures of diversifying selection in European pig breeds. PLoS Genetics. 2013;9:e1003453.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):646-650
DOI 10.18699/VJ17.281

Криоконсервация эпидидимального семени домашнего кота

С.Я. Амстиславский[1] ✉, Е.Ю. Брусенцев[1], В.И. Мокроусова[1, 2], Е.А. Кизилова[1, 2], В.В. Кожевникова[1, 2], В.А. Напримеров[1, 3], И.Н. Рожкова[1]

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

Домашний кот (*Felis silvestris catus*) используется в качестве модельного объекта для разработки эффективных методов криоконсервирования семени исчезающих видов кошачьих. В исследовании представлено сравнение двух коммерчески доступных криопротекторных смесей CaniPlus Freeze (CPF) и SpermFreeze (SF), используемых для криоконсервации семени домашнего кота (*Felis silvestris catus*). Семя получали из каудальных эпидидимисов взрослых самцов и замораживали с помощью CPF либо SF. Жизнеспособность замороженно-оттаянных сперматозоидов оценивали методом VitalScreen; морфологический анализ семени проводили с использованием окраски гематоксилином и эозином; в обоих случаях окраску сочетали со световой микроскопией. Доля живых сперматозоидов после замораживания с применением CPF и SF достоверно не различалась: 32.3 ± 4.4 % для CPF и 43.3 ± 4.0 % для SF. Доля морфологически нормальных сперматозоидов после процедур замораживания–оттаивания семени домашнего кота составила 26.0 ± 2.3 % для CPF и 23.9 ± 1.9 % для SF. В обоих случаях не было достоверных отличий по этому показателю от интактного (не подвергавшегося замораживанию) семени, в этой группе доля сперматозоидов с нормальной морфологией составила 29.0 ± 4.1 %. Наиболее частыми были аномалии хвоста, а также комбинированные аномалии; наиболее редкими – аномалии головки. Доля сперматозоидов с аномалиями головки, шейки, хвоста, комбинированных не различалась при сравнении каждой из трех групп между собой по названным категориям. Результаты данной работы свидетельствуют о том, что обе криопротекторные смеси могут быть использованы для замораживания семени домашнего кота, несмотря на то, что CPF создавали для замораживания семени псовых, а SF – для замораживания семени человека (до сих пор эту криопротекторную смесь использовали исключительно в репродуктивной медицине). Можно заключить, что метод криоконсервации семени кошачьих с использованием каждой из этих двух коммерчески доступных криопротекторных смесей применим для криоархивирования существующих пород домашних кошек.

Ключевые слова: домашний кот; эпидидимальные сперматозоиды; криоконсервация.

Cryopreservation of epididymal semen of domestic cat

S.Ya. Amstislavsky[1] ✉, E.Yu. Brusentsev[1], V.I. Mokrousova[1, 2], E.A. Kizilova[1, 2], V.V. Kozhevnikova[1, 2], V.A. Naprimerov[1, 3], I.N. Rozhkova[1]

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

Domestic cat (*Felis silvestris catus*) is used as a model species for developing effective methods of wild felids' semen cryopreservation. The present study represents a comparison of domestic cat semen cryopreservation with two commercially available cryoprotectant agents (CPAs): CaniPlus Freeze (CPF) and SpermFreeze (SF). Semen was collected from the caudal epididymises of adult males and frozen with CPF and SF, correspondingly. The viability of frozen-thawed spermatozoa was evaluated by VitalScreen kit, staining with hematoxylin and eosin was performed for analysis of the spermatozoa morphology; both analyses were combined with the light microscopy. The viability rate of the frozen-thawed semen cryopreserved with CPF and SF did not differ: 32.3 ± 4.4 % for CPF and 43.3 ± 4.0 % for SF. Total percentage of morphologically normal spermatozoa after freezing and thawing domestic cat semen was 26.0 ± 2.3 % for CPF and 23.9 ± 1.9 % for SF. In both cases, there were no differences from non-frozen semen, in the latter group the total percentage of spermatozoa with normal morphology was 29.0 ± 4.1 %. The most frequent anomalies were the anomalies of tail, and the rarest anomalies were head defects. The percentages of spermatozoa with anomalies of the head, mid piece, tail and combined did not differ in these three groups. Taken together these results suggest that both CPAs are suitable for the purpose of domestic cat semen freezing and cryopreservation, although CPF was designed for Canidae semen cryopreservation and SF was developed for human semen freezing and so far was used exclusively in reproductive medicine. It might be concluded that these two commercially available cryoprotectant media are applicable for the purposes of domestic cat breeds' semen cryopreservation.

Key words: domestic cat; epididymal spermatozoa; cryopreservation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Амстиславский С.Я., Брусенцев Е.Ю., Мокроусова В.И., Кизилова Е.А., Кожевникова В.В., Напримеров В.А., Рожкова И.Н. Криоконсервация эпididимального семени домашнего кота. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):646-650. DOI 10.18699/VJ17.281

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Amstislavsky S.Ya., Brusentsev E.Yu., Mokrousova V.I., Kizilova E.A., Kozhevnikova V.V., Naprimerov V.A., Rozhkova I.N. Cryopreservation of epididymal semen of domestic cat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):646-650. DOI 10.18699/VJ17.281 (in Russian)

Received 25.05.2017
Accepted for publication 18.09.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Домашний кот (*Felis silvestris catus*) является модельным объектом для разработки эффективных методов криоконсервирования семени исчезающих видов кошачьих (Wildt et al., 1992; Luvoni, 2006; Amstislavsky et al., 2012). Это самый популярный вид среди домашних питомцев, который также используется как лабораторное животное (Driscoll et al., 2009; Agca, 2012). Существует около 100 различных пород домашнего кота, но только половина из них подтверждена Международной федерацией кошек – FIFe (www.fifeweb.org). Искусственное осеменение со свежим, охлажденным и замороженным семенем домашнего кота проводилось различными методами (Zambelli et al., 2002; Luvoni, 2006; Tsutsui, 2006; Rijsselaere, Van Soom, 2010), но до сих пор нет рутинного метода криоконсервации семени кошачьих. В настоящее время транспортировка охлажденного/замороженного семени используется гораздо реже для котов, чем для собак (Johnson et al., 2001). Принимая это во внимание, следует разработать надежный метод криоконсервации семени кошачьих, применимый как для криоархивирования существующих пород домашних котов, так и для создания криобанков находящихся под угрозой исчезновения и уязвимых видов Felidae. В качестве криопротекторов для замораживания семени кошачьих часто используются глицерин и яичный желток (Zambelli et al., 2002; Luvoni, 2006), однако разрабатываются и альтернативные методы. CaniPlus Freeze (CPF) был создан для замораживания семени представителей семейства Canidae (www.minitube.de) и успешно применялся не только для собаки (Hidalgo et al., 2014), но и для бурого медведя (Gomes-Alves et al., 2014), а также хомячков рода *Phodopus* (Амстиславский и др., 2016). Существует также запатентованная эффективная криопротекторная смесь SpermFreeze (SF), которая широко используется в репродуктивной медицине (www.fertipro.com). Несмотря на эффективное применение этой криопротекторной смеси для замораживания сперматозоидов человека (Bandularatne, Bongso, 2002), она еще не применялась к другим видам млекопитающих.

Помимо домашнего кота, в семействе Felidae насчитывается 38 видов (Johnson et al., 2006; O'Brien et al., 2008). В настоящее время для сохранения генетического разнообразия диких кошек *ex situ* используются как традиционные подходы, так и более современные методы, например создание криобанков генетических ресурсов (Comizzoli et al., 2009; Амстиславский и др., 2015, 2017; Jewgenow et al., 2017). Семя 27 видов/подвидов диких кошачьих было успешно криоконсервировано хотя бы один раз; по другим представителям семейства кошачьих данные по замораживанию семени в литературе отсутствуют (Fickel et al., 2007; Амстиславский и др., 2017). Эффективность замораживания семени диких видов кошачьих в подавляющем большинстве случаев ниже, чем у домашнего кота (Амстиславский и др., 2017). Более того, с самцами диких кошачьих часто приходится работать вне комфортных условий лаборатории. В связи с этим поиск надежного способа замораживания семени кошачьих с применением имеющихся на рынке готовых криопротекторных смесей представляется особенно актуальной задачей, причем домашний кот является наиболее доступной моделью для ее решения.

Цель данного исследования – сравнение жизнеспособности эпидидимального семени домашнего кота после замораживания с использованием криопротекторных смесей CPF и SF.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В работе использовали семенники с эпидидимисами от десяти взрослых домашних котов, полученные из ветеринарных клиник г. Новосибирска. Семя от каждого из самцов было заморожено как с CPF, так и с SF. В качестве контроля использовали семя этого же кота, не подвергавшееся замораживанию. В эксперименте по оценке жизнеспособности сперматозоидов после их криоконсервации использованы образцы от десяти самцов, а для оценки морфологии сперматозоидов – от восьми самцов.

Получение семени, замораживание и оттаивание. Семенники с эпидидимисами получали после стандартных процедур орхиэктомии и транспортировали при +4 °C в фосфатном буферном растворе Дульбекко (DPBS) в Институт цитологии и генетики СО РАН. Органы промывали DPBS. Затем каудальную часть эпидидимиса отделяли, переносили в чашку Петри с каплей 500 мкл среды FertiCultIVF (FertiPro, Бельгия), измельчали и помещали в термостат при 37 °C на 20 мин. После этого жидкость собирали пипеткой и переносили в пробирку.

Семя домашнего кота (50 мкл) смешивали со 100 мкл раствора CPF (Minitube, Германия). Аналогично 100 мкл семени смешивали с 70 мкл раствора SF (FertiPro, Бельгия). Затем образцы выдерживали при +4 °C в холодильнике в течение двух часов и замораживали в 0.25 мл пластиковых соломинах (Cryo Bio System, Франция), как описано ниже.

Пластиковые соломины с образцами семени помещали в коробку из пенопласта на высоту 5 см над уровнем жидкого азота (LN_2) в течение 20 мин, затем погружали в LN_2. Замороженные соломины с образцами семени помещали в криохранилище и выдерживали при –196 °C не менее недели.

Процедуру оттаивания семени проводили, как описано ранее (Амстиславский и др., 2016). Соломины с образцами доставали из LN_2 и выдерживали в течение 10 с при комнатной температуре (~25 °C), а затем помещали в водяную баню на 30 с при 37 °C.

Оценка жизнеспособности сперматозоидов. Жизнеспособность сперматозоидов после криоконсервации оценивали с помощью световой микроскопии Nikon Eclipse E200 (Nikon, Япония) в сочетании с окрашиванием эозин-нигрозином при помощи набора VitalScreen (FertiPro, Бельгия). Мертвые сперматозоиды при этом окрашиваются в красный цвет эозином, а нигрозин создает фиолетовый фон для облегчения подсчета живых сперматозоидов, которые не окрашиваются (Blom, 1950; Zambelli et al., 1993).

Морфологический анализ образцов семени проводили с использованием световой микроскопии после высушивания и фиксации мазков семени с использованием 4 % формальдегида (pH 7.4–7.6), промывки в ddH_2O и последующего стандартного окрашивания гематоксилином-эозином при использовании световой микроскопии

с применением Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss, Германия). Изображения получены и проанализированы с использованием оборудования и инфраструктуры ЦКП МАБО СО РАН (http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=113).

Статистический анализ. Доля живых сперматозоидов, а также морфологически нормальных и аномальных форм сперматозоидов представлена как среднее ± ошибка среднего. Среди аномальных форм сперматозоидов посчитана доля отдельных типов аномалий: аномалии головки, шейки, хвоста, комбинированных. Сравнение проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Жизнеспособность сперматозоидов после замораживания и криоконсервации была оценена с помощью теста VitalScreen (рис. 1). Данный тест показал, что после криоконсервации семени с применением CPF доля жизнеспособных сперматозоидов была снижена (32.3 ± 4.4) по сравнению с интактным семенем (48.6 ± 5.7; $p < 0.05$). Замораживание семени с использованием SF, напротив, не приводило к снижению доли жизнеспособных сперматозоидов (43.3 ± 4.0).

Образцы семени, замороженные двумя способами, не отличались по доле морфологически нормальных и ано-

Fig. 1. Assessment of the viability of frozen-thawed domestic cat spermatozoa after staining with VitalScreen.

(*a*) Spermatozoa frozen in CPF; (*b*) spermatozoa frozen in SF. Colored spermatozoa are dead, and uncolored spermatozoa are alive. Scale bar 10 μm.

Morphology of intact and frozen–thawed spermatozoa of a domestic cat after use of two cryoprotecting media

Characters	Intact (n = 8)	After cryopreservation	
		CaniPlus Freeze (n = 8)	SpermFreeze (n = 8)
Total number of spermatozoa examined	2 162	2 267	2 400
Normal spermatozoa, %	29.0 ± 4.1	26.0 ± 2.3	23.9 ± 1.9
Abnormal spermatozoa, %	71.0 ± 4.1	74.0 ± 2.3	76.1 ± 1.9
Anomalies, %			
head	2.8 ± 0.4^{a}	5.1 ± 1.2^{ab}	4.1 ± 1.2^{ab}
midpiece	9.9 ± 2.2^{b}	5.9 ± 1.3^{ab}	5.9 ± 1.8^{ab}
tail	27.4 ± 3.3^{c}	25.4 ± 3.0^{c}	28.4 ± 3.6^{c}
combined	30.9 ± 3.7^{c}	37.6 ± 4.0^{c}	37.7 ± 4.3^{c}

Different alphabetical indices indicate significant differences. Differences are significant at a, b: $p < 0.05$; b, c: $p < 0.01$; a, c: $p < 0.001$.

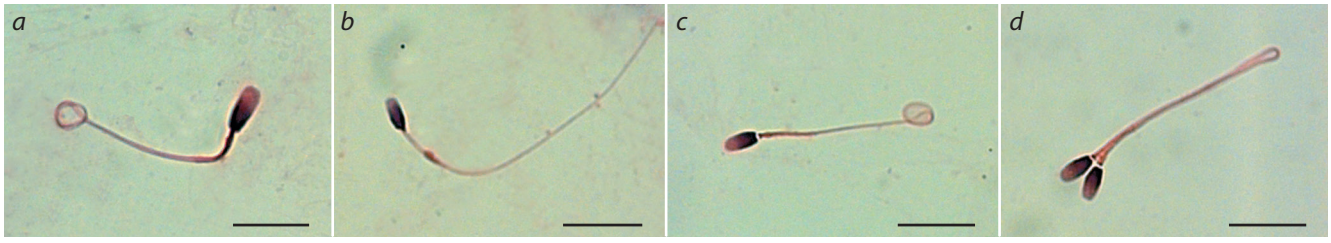


Fig. 2. Morphology of frozen-thawed spermatozoa of a domestic cat after staining with hematoxylin and eosin.

(*a*) Spermatozoa with combined anomalies (head and tale anomalies); (*b*) spermatozoa with midpiece anomalies; (*c*) spermatozoa with tale anomalies; (*d*) teratomorphic spermatozoa with combined (head and tale) anomalies. Scale bar 10 μm.

мальных форм сперматозоидов ни друг от друга, ни от интактных образцов (таблица). Наиболее частыми были аномалии хвоста, а также комбинированные аномалии во всех трех категориях семени (рис. 2). Наиболее редкими из них были аномалии головки. Следует отметить, что доля сперматозоидов с аномалиями головки, шейки, хвоста и комбинированными аномалиями не различалась при сравнении каждой из трех групп между собой по названным категориям (см. таблицу).

Обсуждение

Применение чувствительного и объективного метода VitalScreen в качестве теста для оценки жизнеспособности сперматозоидов после процедур замораживания–оттаивания позволило нам сделать сравнение эпидидимального семени до и после криоконсервации с использованием двух разных криопротекторных смесей. Более ранние исследования подтверждают, что этот метод подходит для оценки жизнеспособности сперматозоидов разных млекопитающих (Blom, 1950), в том числе кошачьих (Zambelli et al., 1993; Buranaamnuay, 2015).

В более ранних работах сообщалось, что CPF можно использовать для замораживания семени различных видов млекопитающих, включая собак, медведей и хомячков (Gomes-Alves et al., 2014; Hidalgo et al., 2014; Амстиславский и др., 2016). Наше недавнее пилотное исследование показало, что эякуляторное семя красной рыси возможно криоконсервировать с применением CPF в качестве криопротекторной смеси (Амстиславский и др., 2017). В представленной работе по исследованию эпидидимального семени домашнего кота установлено, что при применении CPF более 30 % сперматозоидов сохраняют свою жизнеспособность после криоконсервации и доля аномальных сперматозоидов при этом не увеличивается. На основании этих результатов можно утверждать о применимости CPF для замораживания сперматозоидов кошачьих. Наши собственные экспериментальные результаты и анализ литературы свидетельствуют об универсальности CPF и использования этой криопротекторной смеси для различных видов млекопитающих.

По нашим данным, SF никогда не применялся ранее с целью криоконсервации семени какого-либо вида млекопитающего помимо человека. Таким образом, в данном исследовании впервые сообщается о его успешном использовании для замораживания эпидидимального семени домашнего кота. При применении SF более 40 % сперматозоидов в среднем сохраняют жизнеспособность, причем криоконсервация не отражается на доле морфологически нормальных сперматозоидов. По данным литературы, она варьирует для эпидидимального семени у разных видов кошачьих от 25.0 до 78.5 % (Prochowska et al., 2016), и приведенные здесь результаты укладываются в этот интервал. Следует отметить, что наиболее частыми аномалиями сперматозоидов в нашем исследовании были комбинированные и аномалии хвоста, что согласуется с данными других исследований (Contri et al., 2012).

Хотя глицерин в высоких концентрациях токсичен для сперматозоидов кошачьих, в подавляющем большинстве исследований замораживание семени котов проводилось с использованием именно этого криопротектора в концентрациях 3.0–7.5 % (Luvoni, 2006). Обычно процедуры замораживания–оттаивания снижают жизнеспособность сперматозоидов эпидидимального семени домашних котов на 20–30 % (Luvoni, 2006; Kunkitti et al., 2016; Prochowska et al., 2016).

Можно сделать вывод, что из двух криопротекторных смесей, сравниваемых в нашей работе, SF более подходит для криоконсервации эпидидимального семени домашнего кота, чем CPF. Основными компонентами SF являются глицерин и человеческий сывороточный альбумин (HSA) (Bandularatne, Bongso, 2002). HSA улучшает показатели выживаемости сперматозоидов человека после криоконсервации (Bandularatne, Bongso, 2002). Тест VitalScreen продемонстрировал, что эпидидимальное семя кота сохраняет жизнеспособность после криоконсервации как с использованием SF, так и при применении CPF, хотя в последнем случае доля жизнеспособных сперматозоидов была ниже по сравнению с интактным семенем, не подвергавшимся криоконсервации. Полученные результаты позволяют предположить, что HSA оказывает положительное влияние при криоконсервации сперматозоидов не только человека, но также и домашнего кота.

Данные нашего исследования свидетельствуют о возможности применения криопротекторных смесей CPF и SF с целью замораживания эпидидимального семени домашнего кота. Использование SF несколько более эффективно по сравнению с CPF для сохранения жизнеспособности сперматозоидов домашнего кота после процедур замораживания–оттаивания.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-03258, and State Budgeted Project 0324-2016-0002, Department of Animal and Human Genetics, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Agca Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals. Theriogenology. 2012;78:1653-1665. DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.08.012.

Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G.C. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora. Reprod. Domest. Anim. 2012;47:164-175. DOI 10.1111/j.1439-0531.2011.01886.x.

Amstislavskiy S.Y., Brusentsev E.Y., Okotrub K.A., Rozhkova I.N. Embryo and gamete cryopreservation for the conservation of laboratory animal genetic resources. Ontogenez = Ontogenesis. 2015;46(2):67-81. DOI 10.7868/S0475145015020020. (in Russian)

Amstislavskiy S.Y., Kizilova E.A., Brusentsev E.Y., Abramova T.O., Naprimerov V.A. Cryopreservation of epididymal semen in Djungarian (*Phodopus sungorus*, *Cricetinae*) and Campbell's (*Phodopus campbelli*) hamsters. Zoologicheskiy zhurnal = Zoological Journal. 2016;95(5):604-613. DOI 10.7868/S0044513416050044. (in Russian)

Amstislavskiy S.Y., Kozhevnikova V.V., Muzika V.V., Kizilova E.A. Reproductive biology and a genome resource bank of Felidae. Ontogenez = Ontogenesis. 2017;48(2):93-106. DOI 10.7868/S0475145017020021. (in Russian)

Bandularatne E., Bongso A. Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. J. Androl. 2002;23:242-249. DOI 10.1002/j.1939-4640.2002.tb02621.x.

Blom E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. Fertil. Steril. 1950;1:176-177.

Buranaamnuay K. Determination of appropriate cryopreservation protocols for epididymal cat spermatozoa. Reprod. Domest. Anim. 2015; 50:378-385. DOI 10.1111/rda.12496.

Comizzoli P., Crosier A.E., Songsasen N., Szykman Gunther M., Howard J.G., Wildt D.E. Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. Reprod. Domest. Anim. 2009;44:47-52. DOI 10.1111/j.1439-0531.2009.01373.x.

Contri A., Zambelli D., Faustini M., Cunto M., Gloria A., Carluccio A. Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. Reproduction. 2012;144:339-347. DOI 10.1530/REP-12-0125.

Driscoll C.A., Clutton-Brock J., Kitchener A.C., O'Brien S.J. The taming of the cat. Genetic and archaeological findings hint that wildcats became housecats earlier – and in a different place – than previously thought. Sci. Am. 2009;300:68-75. DOI 10.1038/scientificamerican 0609-68.

Fickel J., Wagener A., Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. Eur. J. Wildl. Res. 2007;53(2):81-89. DOI 10.1007/s10344-007-0089-z.

Gomes-Alves S., Alvarez M., Nicolas M., Lopez-Uruena E., Martinez-Rodriguez C., Borragan S., de Paz P., Anel L. Use of commercial extenders and alternatives to prevent sperm agglutination for cryopreservation of brown bear semen. Theriogenology. 2014;82:469-474. DOI 10.1016/j.theriogenology.2014.05.015.

Hidalgo M., Portero J.M., Demyda-Peyras S., Ortiz I., Dorado J. Cryopreservation of canine semen after cold storage in a Neopor box: effect of extender, centrifugation and storage time. Vet. Rec. 2014; 175:20. DOI 10.1136/vr.102010.

Jewgenow K., Braun B.C., Dehnhard M., Zahmel J., Goeritz F. Research on reproduction is essential for captive breeding of endangered carnivore species. Reprod. Domest. Anim. 2017;2:18-23. DOI 10.1111/rda.12836.

Johnson S.D., Root Kustritz M.V., Olson P.N.S. Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia: Saunders Comp., 2001;592.

Johnson W.E., Eizirik E., Pecon-Slattery J., Murphy W.J., Antunes A., Teeling E., O'Brien S.J. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. Science. 2006;311(5757):73-77. DOI 10.1126/science.1122277.

Kunkitti P., Axner E., Bergqvist A.S., Sjunnesson Y. *In vitro* fertilization using frozen-thawed feline epididymal spermatozoa from corpus and cauda regions. Theriogenology. 2016;86:1403-1408. DOI 10.1016/j. theriogenology.2016.04.085.

Luvoni G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. Theriogenology. 2006;66:101-111. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.03.012.

O'Brien S.J., Johnson W., Driscoll C., Pontius J., Pecon-Slattery J., Menotti-Raymond M. State of cat genomics. Trends Genet. 2008; 24(6):268-279. DOI 10.1016/j.tig.2008.03.004.

Prochowska S., Nizanski W., Partyka A. Comparative analysis of *in vitro* characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa from cats (Felis domesticus). Theriogenology. 2016;86:2063-2072. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.07.002.

Rijsselaere T., Van Soom A. Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift. 2010; 79:467-470.

Tsutsui T. Artificial insemination in domestic cats (Felis catus). Theriogenology. 2006;66:122-125. DOI 10.1016/j. theriogenology.2006. 03.015.

Wildt D.E., Monfort S.L., Donoghue A.M., Johnston L.A., Howard J.G. Embryogenesis in conservation biology – or, how to make an endangered species embryo. Theriogenology. 1992;37:161-184. DOI http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(92)90253-N.

Zambelli D., Bergonzoni M.L., De Fanti C., Carluccio A. Sperm morphology evaluation techniques in the cat, rabbit and dog. Vet. Proceedings. 1993;47:279-283.

Zambelli D., Caneppele B., Castagnetti C., Belluzzi S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. Reprod. Domest. Anim. 2002;37:310-313. DOI 10.1046/j. 1439-0531.2002.00365.x.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):651-656
DOI 10.18699/VJ17.282

Комбинационная способность ЦМС-линий зернового сорго на основе A1, A2, A3, A4, 9E и M-35-1A типов цитоплазматической мужской стерильности

О.П. Кибальник

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы» «Россорго», Саратов, Россия

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) широко применяется в гетерозисной селекции сельскохозяйственных культур, в том числе сорго. В селекционной работе РосНИИСК «Россорго» используется скороспелый и адаптированный к условиям возделывания в Нижнем Поволжье исходный материал – коллекция ЦМС-линий на основе разных типов стерильных цитоплазм (A1, A2, A3, A4, 9E и M-35-1A) и сортов зернового сорго. Для создания высокогетерозисных гибридов необходимо выявить родительские формы с высокой комбинационной способностью. Гибриды получены на основе восьми ЦМС-линий: A1 О-Янг 1, A2 КВВ 114, A2 Восторг, A2 Тамара, A3 Фетерита 14, A4 КП 70, M-35-1A Пищевое 614, 9E Пищевое 614. В качестве опылителей (тестеров) в скрещивания включены семь сортов: Меркурий, Огонек, Аванс, Топаз, Волжское 615, Пищевое 35, Волжское 4. Испытания проведены на опытном поле РосНИИСК «Россорго» в 2015–2016 гг. Метеорологические условия в период проведения исследований различались по количеству осадков и сумме активных температур. Комбинационную способность (КС) исходного материала определяли по методу топкросса. Установлено, что у сорго проявление признаков (высота растений, параметры соцветий, масса зерна с одной метелки и 1000 зерен, урожайность) контролируют гены с аддитивным эффектом. Для дальнейшей селекции на гетерозис выделены ЦМС-линии (A1 О-Янг 1, A3 Фетерита 14 и A4 КП 70), у которых высокие эффекты общей комбинационной способности по основным селекционным признакам отличаются стабильностью по годам. Высокой КС также характеризуются сорта Волжское 4 (по высоте растений, массе зерна с одной метелки и урожайности), Аванс и Топаз (по массе 1000 зерен и урожайности). Для конкурсного сортоиспытания выявлены перспективные гибриды F_1 сорго с высокими эффектами специфической комбинационной способности по урожайности и массе 1000 зерен. Предложены гибриды для создания синтетических сортов-популяций.

Ключевые слова: сорго; гибриды F_1; цитоплазматическая мужская стерильность; типы ЦМС; комбинационная способность; селекционно-ценные признаки.

Combining ability of CMS-lines of grain sorghum based on A1, A2, A3, A4, 9E and M-35-1A types of cytoplasmic male sterility

O.P. Kibalnik

Russian Research and Project-Technologic Institute for Sorghum and Maize "Rossorgo", Saratov, Russia

Cytoplasmic male sterility (CMS) is widely used in heterosis breeding of crops, including sorghum. In breeding work, "Rossorgo" uses early maturing source material adapted to the conditions of cultivation in the Lower Volga region, a collection CMS-lines with different types of sterile cytoplasm (A1, A2, A3, A4, 9E, M-35-1A) and varieties of grain sorghum. To create heterosis hybrids, it is required to identify the parental form with a high combining ability. Hybrids were derived from CMS-lines: A1 O-Yang 1, A2 KVV 114, A2 Vostorg, A2 Tamara, A3 Feterita 14, A4 KP 70, M-35-1A and 9E Pischevoe 614. The pollinators (testers) to crossing included varieties of grain sorghum: Mercury, Ogonek, Avans, Topaz, Volzhskoe 615, Pischevoe 35, Volzhskoe 4. The tests were conducted on the experimental field of "Rossorgo" in 2015–2016. Meteorological conditions during the studies differed in the amount of precipitation and the sum of active temperatures. Combining ability (CA) of the starting material was determined by the method of topcross. It was found that the manifestation of traits (plant height, parameters of the panicle, the weight of grains in one panicle and 1000 grains, yield) in sorghum is controlled by genes with additive effect. For further breeding for heterosis, CMS-lines (A1 O-Yang 1, A3 Feterita 14 and A4 KP 70) were selected with strong high effects of GCA on the main breeding grounds stable for years. High CA also characterized varieties Volzhskoe 4 (height of plant, weight of grains in one panicle and yield), Avans and Topaz (mass of 1000 grains and yield). For competitive variety trials, promising F_1 hybrids of sorghum with high SCA effects for yield and weight of 1000 grains were identified. Hybrids to create synthetic varieties-populations were proposed.

Key words: sorghum; hybrids F_1; cytoplasmic male sterility; types of CMS; combining ability; breeding valuable traits.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Кибальник О.П. Комбинационная способность ЦМС-линий зернового сорго на основе A1, A2, A3, A4, 9E и M-35-1A типов цитоплазматической мужской стерильности. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):651-656. DOI 10.18699/VJ17.282

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Kibalnik O.P. Combining ability of CMS-lines of grain sorghum based on A1, A2, A3, A4, 9E and M-35-1A types of cytoplasmic male sterility. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):651-656. DOI 10.18699/VJ17.282 (in Russian)

Received 09.06.2017
Accepted for publication 24.07.2017
© AUTHOR, 2017

e-mail: kibalnik79@yandex.ru

Зерновое сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) является одной из наиболее засухоустойчивых и высокоурожайных сельскохозяйственных культур в мировом земледелии и возделывается в регионах с острозасушливым климатом. По общей площади посевов среди зерновых культур сорго занимает пятое место после пшеницы, риса, кукурузы и ячменя (Hundekar et al., 2014; Mohammed et al., 2015). В России зерновое сорго выращивается в основном для производства зернофуража и монокорма (Алабушев и др., 2003; Ковтунова, Ковтунов, 2016); возможно также применение его в пищевой и перерабатывающей промышленности (Ковтунов, Горпиниченко, 2011; Никитин и др., 2016). Для дальнейшего распространения этой культуры селекционерам следует создавать скороспелые, адаптированные сорта и гибриды, обеспечивающие высокую урожайность в условиях конкретной микрозоны возделывания.

В настоящее время селекционная работа по созданию гибридов сорго основана на включении в скрещивания материнской формы – линий с цитоплазматической мужской стерильностью и отцовской – восстановителей фертильности (сортов или линий). В связи с этим необходимый этап в селекции на гетерозис – изучение общей (ОКС) и специфической (СКС) комбинационной способности исходного материала (Кибальник и др., 2014; Justin et al., 2015). Известно, что ОКС определяется действием аддитивных генов, а СКС – доминантных и эпистатических (Kumar et al., 2013; Жужукин и др., 2016; Хотылева и др., 2016). Родительские формы с высокими эффектами ОКС являются источниками селекционно-ценных признаков и более приспособлены к условиям выращивания (Fasahat et al., 2016). Поэтому результаты оценки комбинационной способности позволяют более эффективно применять их в селекционных программах скрещиваний и способствуют выявлению гибридов, превосходящих родительские формы по основным хозяйственным признакам (Kenga et al., 2006; Reddy et al., 2007; Беседа и др., 2009).

В селекции сорго на гетерозис в основном используются стерильные линии с высокой комбинационной способностью, полученные на основе цитоплазмы A1 (Mahdy et al., 2011; More et al., 2014; Patil, Kute, 2015). Для повышения адаптивного потенциала гибридов необходимо расширение генетического разнообразия исходного материала, в том числе включение в качестве компонентов скрещиваний стерильных линий с разными типами ЦМС. У сорго известно большое количество ЦМС-индуцирующих цитоплазм – A1, A2, A3, A4, A5, A6, 9E, M-35-1A и др. (Reddy et al., 2005). На основании этого селекционеры включают в схемы скрещиваний ЦМС-линии с новыми типами стерильности – A2 и A3 (Mohammed, 2009; Reddy et al., 2009; Aruna et al., 2013; Гаршин и др., 2014), A4, 9E и M-35-1A (Кибальник, Эльконин, 2014; Кибальник, 2016). Цель данной работы заключалась в оценке комбинационной способности новых стерильных линий (с типами ЦМС – A1, A2, A3, A4, 9E, M-35-1A) и сортов сорго по селекционно-ценным признакам.

Материалы и методы

Гибриды F_1 получены на основе ЦМС-линий: BC_7 – A1 О-Янг 1; BC_{15} – A2 КВВ 114; BC_{12} – A2 Восторг; BC_7 – A2 Тамара; BC_{12} – A3 Фетерита 14; BC_{12} – A4 КП 70; BC_{12} – M-35-1A Пищевое 614 (П-614); BC_{12} – 9E Пищевое 614 (Elkonin et al., 1995, 1997; Эльконин и др., 1997). В качестве опылителей (тестеров) использовали сорта зернового сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) селекции РосНИИСК «Россорго»: Меркурий, Огонек, Аванс, Топаз, Волжское 615, Пищевое 35, Волжское 4. Все участвующие в гибридизации тестеры до начала опыления ежегодно поддерживались в условиях изоляции.

Гибриды F_1 выращивали на опытном поле РосНИИСК «Россорго» в 2015–2016 гг. Площадь делянки – 7.7 м^2. Размещение делянок рендомизированное (Доспехов, 2011). Повторность в опыте трехкратная. Густоту стояния растений устанавливали вручную (100 тыс. раст./га). Оценку селекционно-ценных признаков гибридов F_1 и учеты проводили по общепринятой методике (Методика государственного сортоиспытания…, 1989).

Метеорологические условия за период испытания гибридов F_1 сорго различались. В 2015 г. выпало 106.2 мм осадков, а сумма активных температур составила 2613.1 °С. Погодные условия 2016 г. характеризовались большим количеством осадков (178.3 мм) и суммой активных температур (2805.0 °С).

Комбинационную способность компонентов скрещиваний определяли по методу топкросса (Савченко, 1973). Статистическая обработка экспериментальных результатов исследований выполнена методом однофакторного дисперсионного анализа с помощью программы AGROS 2.09.

Результаты и обсуждение

Общая комбинационная способность

Материнские линии. Высокие эффекты ОКС по длине и ширине соцветия, массе зерна с одной метелки отмечены у стерильной линии A1 О-Янг 1. ЦМС-линия A2 КВВ 114 характеризуется высокой ОКС по урожайности, ширине соцветия и средней – по высоте растений. Гибриды, полученные с использованием линии A3 Фетерита 14, отличались высокорослостью и наибольшей урожайностью зерна. Стерильная линия A4 КП 70 обладает высокой ОКС по массе 1000 зерен (3.91–4.32) и средней – по массе зерна с одной метелки (0.41–0.99). Материнская линия A2 Восторг выделилась средними значениями ОКС по высоте растений (3.12–11.44) и ширине соцветия (0.15–0.21). Низкая ОКС выявлена у линий A2 Тамара, M-35-1A Пищевое 614 и 9E Пищевое 614 (табл. 1).

Показатели высоких эффектов ОКС ЦМС-линий A1 О-Янг 1, A3 Фетерита 14 и A4 КП 70 отличаются стабильностью по годам. Вместе с тем значительная реакция стерильных линий на сложившиеся метеоусловия по ОКС длины соцветия отмечена у A2 КВВ 114, A2 Восторг, 9E Пищевое 614; ширины соцветия – 9E Пищевое 614; массы зерна с одной метелки – A2 Восторг; массы 1000 зерен – M-35-1A Пищевое 614 и урожайности зерна – A2 Восторг.

Тестеры. Среди сортов высокая ОКС по высоте растений, массе зерна с одной метелки и урожайности выявлена у Волжского 4 (см. табл. 1). Сорта Топаз и Аванс характеризуются высокими эффектами ОКС по

Table 1. Effects of the general combination ability of parents on commercially valuable traits in crosses

Sterile lines and varieties	Plant height		Inflorescence length		Inflorescence width		Grain weight per panicle		1000 grain weight		Grain yield	
	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016
CMS lines												
A1 O-Yang 1	–2.64	7.70	4.66	5.12	1.88	2.07	5.04	10.05	–2.27	–1.95	–0.83	1.48
A2 KVV 114	7.86	1.96	0.30	–0.37	4.05	1.27	–0.28	–2.51	–3.60	–2.93	0.94	0.04
A2 Tamara	–	–15.83	–	–0.74	–	1.73	–	–1.59	–	2.51	–	–0.43
A2 Vostorg	3.12	11.44	–1.25	1.26	0.15	0.21	3.79	–5.01	–0.14	–1.58	1.28	–0.46
A3 Feterita14	22.80	22.67	–3.71	–2.51	–1.57	–0.02	–1.87	2.63	3.53	2.59	0.27	1.04
A4 KP 70	–2.99	–1.98	–0.56	2.39	–4.82	–0.69	0.41	0.99	3.91	4.32	0.16	–0.55
M-35-1A Pishchevoe 614	–12.90	–12.98	–0.40	–2.67	–2.04	–2.26	–5.70	–1.93	0.30	–1.10	–1.33	–0.63
9E Pishchevoe 614	–15.20	–12.99	0.98	–2.46	2.34	–2.29	–1.39	–2.61	–1.73	–1.85	–0.48	–0.48
F_{obs}	213.4*	660.9*	38.5*	108.6*	65.0*	121.3*	56.4*	52.6*	190.8*	45.7*	114.6*	48.8*
Testers												
Merkuriy	–8.24	–4.58	–0.92	3.22	–0.48	1.48	–6.72	–2.90	–0.80	–0.73	–0.87	0.40
Ogonek	–12.32	–5.18	–2.07	–0.69	0.02	0.11	–9.03	–6.98	–0.64	–1.63	–1.03	–0.62
Avans	–3.82	–0.19	0.79	–0.95	–1.85	–0.01	1.00	2.96	4.15	3.14	0.50	0.28
Topaz	–2.33	0.26	–3.22	0.62	–3.73	–0.31	3.24	0.11	2.32	1.26	0.10	0.48
Volzhskoe 615	7.12	–3.23	–1.18	0.56	1.43	0.15	0.86	5.35	–1.47	0.26	0.09	–0.13
Pishchevoe 35	14.95	4.06	2.04	–2.32	1.42	–0.80	1.79	–1.09	–2.13	–1.60	0.34	–0.53
Volzhskoe 4	4.64	8.86	4.56	–0.44	3.20	–0.60	8.84	2.55	–1.40	–0.70	0.86	0.12
F_{obs}	113.2*	104.0*	42.4*	48.7*	10.31*	27.2*	159.3*	46.7*	126.0*	21.1*	64.1*	16.8*

* $p \leq 0.05$.

массе 1000 зерен (1.26–2.32 и 3.14–4.15 соответственно) и урожайности (0.10–0.48 и 0.28–0.50 соответственно). Наибольшие значения ОКС по ширине соцветия и массе зерна с одной метелки отмечены у сорта Волжское 615. У сортов Меркурий и Огонек установлены отрицательные значения эффектов ОКС по высоте растений и элементам структуры урожайности зерна.

Показатели эффектов ОКС отцовских форм также изменялись в зависимости от сложившихся погодных условий по признакам: высота растений (Топаз, Волжское 615); длина соцветия (у всех сортов, кроме Огонек); масса зерна с одной метелки (Пищевое 35), масса 1000 зерен (Волжское 615) и урожайность зерна (Меркурий, Волжское 615, Пищевое 35).

Специфическая комбинационная способность

Материнские линии. Анализ дисперсий СКС стерильных линий показал, что высокие значения по высоте растений и ширине соцветий установлены у A2 KBB 114; по массе зерна с одной метелки и урожайности – A2 Восторг; по ширине соцветия и урожайности – A3 Фетерита 14 (табл. 2). Стерильная линия A4 КП 70 характеризуется высокой СКС по массе 1000 зерен (13.94–36.12) и средней – по всем селекционно-ценным признакам.

Выявлено существенное изменение показателей дисперсии СКС у компонентов скрещиваний в зависимости от метеоусловий года исследований. Высокая дисперсия СКС в отдельные сезоны отмечена у ЦМС-линий: A1 О-Янг 1 (по высоте растений, массе зерна с одной метелки и урожайности), A2 KBB 114 (по массе 1000 зерен и урожайности зерна), A2 Восторг (по высоте растений); а стабильные показатели – A3 Фетерита 14 (по высоте растений, длине соцветий, массе зерна с одной метелки и урожайности), A2 Восторг (по урожайности зерна – 1.28–1.79), M-35-1A Пищевое 614 (по массе 1000 зерен – 8.89–9.77), 9E Пищевое 614 (по параметрам соцветий, массе зерна с одной метелки и 1000 зерен).

Тестеры. Высокой специфической комбинационной способностью отличаются сорта: Волжское 4 (по всем признакам, кроме длины соцветия), Меркурий и Аванс (по урожайности – 0.69–2.34), Огонек (по ширине соцветия – 3.49–14.95), Топаз (по длине соцветия и урожайности зерна), Пищевое 35 (по высоте растений – 79.16–147.89). Сорт Волжское 615 характеризуется средними значениями дисперсий СКС по элементам структуры урожайности, параметрам соцветия и низкими – по высоте растений. Слабое варьирование значений дисперсий СКС установлено у сортов: Аванс и Волжское 4 (по высоте растений), Меркурий (по массе 1000 зерен), Топаз (по высоте растений и урожайности зерна), Огонек (по массе зерна с одной метелки и урожайности зерна), Пищевое 35 (по массе зерна с одной метелки и 1000 зерен, урожайности зерна).

Для выявления перспективных гибридов сорго используют оценку эффектов СКС (табл. 3). Среди изученных

Table 2. Variance of the special combining ability for major commercially valuable traits in parental sorghum accessions

Sterile lines and varieties	Plant height		Inflorescence length		Inflorescence width		Grain weight per panicle		1000 grain weight		Grain yield	
	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016
CMS lines												
A1 O-Yang 1	104.47	55.12	6.41	5.24	14.43	3.16	271.62	22.00	6.61	7.97	0.24	1.82
A2 KVV 114	129.25	234.44	8.50	6.63	11.03	5.45	76.52	14.36	10.02	1.65	1.31	0.50
A2 Tamara	–	33.44	–	19.68	–	2.23	–	24.78	–	18.30	–	0.22
A2 Vostorg	36.06	179.13	3.47	2.66	4.35	0.76	94.97	77.51	7.42	4.28	1.28	1.79
A3 Feterita 14	47.41	44.70	12.07	10.15	10.70	5.52	44.11	42.34	6.98	9.48	1.84	1.68
A4 KP 70	24.95	85.68	54.27	6.82	12.02	0.64	6.08	44.75	13.94	36.12	0.26	1.50
M-35-1A Pishchevoe 614	70.30	36.16	17.44	6.32	6.38	1.72	14.80	73.75	9.77	8.89	0.61	0.29
9E Pishchevoe 614	89.33	46.07	3.46	4.20	2.60	1.33	25.89	27.86	5.51	4.42	1.41	0.42
Testers												
Merkuriy	40.38	62.83	11.27	6.13	4.04	3.69	10.19	61.67	10.36	11.53	0.69	2.34
Ogonek	54.64	82.89	9.09	10.41	14.95	3.49	24.56	26.61	10.11	4.14	0.94	0.87
Avans	70.80	68.33	7.13	13.86	8.11	1.12	78.64	23.72	10.43	2.20	1.92	0.29
Topaz	73.05	74.24	50.85	6.92	4.59	2.01	57.48	16.98	4.99	12.78	1.20	1.36
Volzhskoe 615	44.49	38.78	10.45	8.58	11.35	2.04	24.83	77.04	6.54	11.60	0.17	1.02
Pishchevoe 35	79.16	147.89	4.26	2.83	3.84	2.28	23.05	24.80	9.46	10.56	0.10	0.25
Volzhskoe 4	139.25	137.68	12.57	4.16	14.64	3.21	315.25	49.77	8.37	25.28	1.92	0.89
F_{obs} (in parental accessions)	15.1*	51.8*	15.0*	17.7*	10.3*	18.1*	55.1*	16.0*	33.4*	11.5*	21.4*	12.4*

* $p \leq 0.05$.

Table 3. Effects of the special combination ability of best sorghum hybrids for morphological traits and yield components

Cross combinations	Plant height		Inflorescence length		Inflorescence width		Grain weight per panicle		1000 grain weight		Grain yield	
	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016
A2 KVV 114 / Volzhskoe 4	22.6	22.36	–2.26	3.38	–1.18	2.76	–8.04	–4.36	1.32	1.16	–0.40	0.65
A2 Vostorg / Pishchevoe 35	10.1	23.17	–0.01	–1.07	–0.21	0.42	6.33	–9.48	0.27	–0.66	0.31	–0.72
A1 O-Yang 1 / Avans	14.0	11.68	–2.01	3.00	0.05	–0.22	–10.2	7.07	0.03	1.86	–0.48	0.41
A3 Feterita 14 / Topaz	0.61	7.44	4.25	1.95	1.68	–0.32	11.8	–5.03	–0.60	–0.38	0.73	–0.93
A4 KP 70 / Volzhskoe 615	5.88	5.80	6.15	1.40	6.14	–0.22	1.74	–0.57	–2.32	–5.51	0.01	1.06
A3 Feterita 14 / Ogonek	1.96	3.09	3.53	2.48	5.49	2.93	–5.77	4.19	4.52	0.83	–1.38	1.32
A1 O-Yang 1 / Volzhskoe 4	–12.9	–9.58	4.24	–2.01	6.98	–2.63	36.7	3.59	–1.25	0.33	1.05	–1.57
A2 KVV 114 / Avans	–2.41	5.52	2.16	2.40	5.88	1.47	15.1	3.46	4.56	–1.05	2.40	–0.06
A4 KP 70 / Volzhskoe 4	6.63	–4.29	4.97	1.11	–3.03	0.33	–2.34	11.79	5.09	9.62	–0.06	1.27
A4 KP 70 / Merkuriy	–1.50	5.85	1.67	–1.85	0.43	1.14	0.93	–9.47	3.79	6.32	0.71	–2.45
A1 O-Yang 1 / Volzhskoe 615	7.08	–8.38	0.53	–0.02	–3.19	2.40	–9.49	–5.86	5.31	4.68	–0.17	0.52
A2 Vostorg / Ogonek	–3.65	–0.17	1.30	1.49	–2.81	0.29	–6.10	4.27	4.55	4.03	–1.03	1.30
A3 Feterita 14 / Volzhskoe 4	0.33	–8.25	–3.47	–2.76	–3.91	–2.03	4.24	3.94	–3.62	–5.41	2.48	0.31
A1 O-Yang 1 / Topaz	–8.78	–1.78	1.11	3.41	–3.31	–0.02	–1.77	–1.27	0.16	–2.36	–0.17	2.57
A2 Vostorg / Merkuriy	4.98	–12.3	–0.76	2.57	1.18	0.73	2.25	15.26	0.45	0.99	–0.54	2.45

Table 4. Mean square deviations of the general and specific combination abilities for commercially valuable traits

Trait	Deviations of msGCA and msSCA		msGCA : msSCA ratio	
	2015	2016	2015	2016
		CMS lines		
Plant height	1177.8/83.6	1300.6/102.1	14.1	12.7
Inflorescence length	45.1/17.6	53.8/8.8	2.6	6.1
Inflorescence width	64.6/10.2	19.8/2.9	6.3	6.8
Grain weight per panicle	91.1/89.0	153.6/46.7	1.02	3.3
1000 grain weight	57.3/10.0	51.4/13.0	5.7	3.9
Grain yield	6.2/1.1	4.6/1.1	5.6	4.2
		Testers		
Plant height	625.1/83.6	204.8/102.1	7.5	2.0
Inflorescence length	49.7/17.6	24.1/8.8	2.8	2.7
Inflorescence width	37.3/10.2	4.4/2.9	3.7	1.5
Grain weight per panicle	257.4/89.0	136.5/46.7	2.9	2.9
1000 grain weight	37.8/10.0	23.7/13.0	3.7	1.8
Grain yield	3.4/1.1	1.5/1.1	3.1	1.4

Columns 2 and 3: numerator, msGCA; denominator, msSCA.

комбинаций скрещиваний отмечено 15 гибридов F_1 с высокими эффектами СКС: по высоте растений (A2 КВВ 114/Волжское 4, A2 Восторг/Пищевое 35, A1 О-Янг 1/Аванс); длине соцветий (A3 Фетерита 14/Топаз); ширине соцветий (A3 Фетерита 14/Огонек); массе зерна с одной метелки (A1 О-Янг 1/Волжское 4, A2 КВВ 114/Аванс); массе 1000 зерен (A1 О-Янг 1/Волжское 615, A4 КП 70/Волжское 4, A4 КП 70/Меркурий); урожайности зерна (A1 О-Янг 1/Топаз, A2 Восторг/Меркурий, A2 КВВ 114/Аванс, A3 Фетерита 14/Волжское 4).

В дальнейшее конкурсное сортоиспытание рекомендуется включить низкорослые и среднерослые гибриды (A1 О-Янг 1/Волжское 615, A2 Восторг/Меркурий, A2 КВВ 114/Аванс, A4 КП 70/Волжское 4), характеризующиеся крупным зерном и высокой урожайностью. Остальные 11 гибридов F_1 следует использовать в селекционных программах по созданию синтетических сортов-популяций с целью улучшения морфологических признаков и элементов структуры урожая.

Генетический контроль селекционно-ценных признаков

Отношение среднеквадратических отклонений общей и специфической комбинационной способности указывает на преобладание аддитивных эффектов над неаддитивными ($ms_{ОКС}/ms_{СКС} > 1$) в генетическом контроле всех изученных признаков: материнских линий 1.8–13.3, сортов (тестеров) – 2.3–4.5. Высокие показатели отношения среднеквадратических отклонений ОКС и СКС отмечены по высоте растений. Показатели отношения $ms_{ОКС}/ms_{СКС}$ по признакам у материнских (длина соцветий, масса зерна с одной метелки и 1000 зерен) и отцовских (высота растений, ширина соцветия, масса 1000 зерен и урожайность) форм изменялись по годам (табл. 4). При этом по высоте растений, ширине соцветий и урожайности зерна у ЦМС-линий, а также по длине соцветия и массе зерна с одной метелки у сортов величина отношения $ms_{ОКС}/ms_{СКС}$ оставалась относительно стабильной.

Таким образом, оценка комбинационной способности ЦМС-линий на основе разных типов стерильности и сортов зернового сорго позволила выделить перспективные комбинации скрещиваний для дальнейшего конкурсного сортоиспытания, а также создания синтетических сортов-популяций. Для получения высокопродуктивных гибридов с улучшенным комплексом селекционно-ценных признаков в программу скрещиваний рекомендуется включать в качестве материнских форм – A1 О-Янг 1, A2 КВВ 114, A3 Фетерита 14 и A4 КП 70; отцовских – Волжское 4, Аванс и Топаз. Установлено, что в генетическом контроле признаков сорго (высота растений, параметры соцветий, масса зерна с одной метелки и 1000 зерен, урожайность зерна) участвуют гены с аддитивным эффектом.

Acknowledgments

This work was supported by a state budgeted project (2015–2016).

The author is grateful to Dr. Zhuzhukin for help in the manuscript preparation.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

References

Alabushev A.V., Anipenko L.N., Gurskiy N.G., Kolomiets N.Ya., Kostylev P.I., Mangush P.A., Alabusheva O.I. Sorgo (selektsiya, semenovodstvo, tekhnologiya, ekonomika) [Sorghum: breeding, seed production, technology, and economy]. Rostov-on-Don: Kniga Publ., 2003. (in Russian)

Aruna C., Shrotria P.K., Pahujia S.K., Umakanth A.V., Venkatesh Bhat B., Vishala Devender A., Patil J.V. Fodder yield and quality in

forage sorghum: scope for improvement through diverse male sterile cytoplasms. Crop Pasture Sci. 2013;36(12):1114-1123.

Beseda N.A., Kostylev P.I., Gorpinichenko S.I. The combining ability of grain sorghum in the system of diallel crossings. Zernovoe khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2009;1:14-16. (in Russian)

Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezultatov isledovaniy) [Methods of Field Experiments (with Fundamentals of Statistical Processing of Study Results)]. Moscow: Al'yans Publ., 2011. (in Russian)

Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Nuclear-cytoplasmic interactions in fertility restoration in sorghum: alternative CMS-inducing cytoplasms. Int. Sorghum Millet Newslett. 1995;36:75-76.

Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Comparative analysis of restoration of male-sterile (CMS)-inducing cytoplasms A3 and M35-1. Int. Sorghum Millet Newslett. 1997;38:29-30.

Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Use of new types of CMS-inducing cytoplasm for the creation of early ripening sorghum lines with male sterility. Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 1997;2:7-9. (in Russian)

Fasahat P., Rajabi A., Rad J.M., Derera J. Principles and utilization of combining ability in plant breeding. Biom. Biostat. Int. J. 2016;4(1): 1-24. DOI 10.15406/bbij.2016.04.00085.

Garshin A.Y., Zhuzhukin V.I., Semin D.S. Determination of the combining ability of sweet sorghum genotypes for grain quality in test crosses. Kukuruza i sorgo = Maize and Sorghum. 2014;1:20-23. (in Russian)

Hundekar R., Kamatar M.Y., Brunda S.M., Pattar V. Combining ability analysis for yield and grain mold resistance in kharif sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Int. J. Plant Sci. 2014;9(1):252-256.

Justin R., Were B., Mgonja M., Santosh D., Abhishek R., Emmarold M., Agustino O., Samuel G. Combining ability of some sorghum lines for dry lands and sub-humid environments of East Africa. Afr. J. Agric. Res. 2015;10(19):2048-2060. DOI 10.5897/AJAR2014.8519.

Kenga R., Tenkouano A., Gupta S.C., Alabi S.O. Genetic and phenotypic association between yield components in hybrid sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) population. Euphytica. 2006;150(3): 319-326.

Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V., Shapturenko M.N. Theoretical aspect of heterosis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):482-492. DOI 10.18699/VJ16.174. (in Russian)

Kibalnik O.P. The combinational ability of grain sorghum CMS lines for yield components. Kukuruza i sorgo = Maize and Sorghum. 2016;3:23-27. (in Russian)

Kibalnik O.P., Elkonin L.A. The combining ability of new CMS lines and varieties of grain sorghum. Kukuruza i sorgo = Maize and Sorghum. 2014;2:25-28. (in Russian)

Kibalnik O.P., Elkonin L.A., Bychkova V.V. The combining ability of CMS lines of sorghum for fresh yield. Zernovoe khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2014;6:5-8. (in Russian)

Kovtunov V.V., Gorpinichenko S.I. Major applications of grain sorghum. Zernovoe khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2011;6:28-32. (in Russian)

Kovtunova N.A., Kovtunov V.V. The use of sorghum and the main areas of breeding work at the Kalinenko All-Russia Research Institute for Grain Crops. Tavricheskiy vestnik agrarnoy nauki = Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2016;3(7):60-70. (in Russian)

Kumar S., Kumar V., Chand P., Kumar N., Shrotria P.K. Genetic parameters for hydrocyanic acid content in forage sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Int. J. Biotechnol. Bioeng. Res. 2013;4(4): 395-400.

Mahdy E.E., Ali M.A., Mahmoud A.M. The effect of environment on combining ability and heterosis in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Asian J. Crop Sci. 2011;3(1):1-15. DOI 10.3923/ajcs.2011.1.15.

Metodika gosudarstvennogo sortoispytaniya selskokhozyaystvennykh kultur. Vyp. 2 [Methods of state variety testing of crops. Issue 2]. Moscow, 1989. (in Russian)

Mohammed M.I. Line × tester analysis across locations and year in Sudanese × exotic lines of forage sorghum. J. Plant Breed. Crop. Sci. 2009;1(9):311-319.

Mohammed R., Are R., Bhavanasi R., Munghate R.S., Kishor K.P.B., Sharma H.C. Quantitative genetic analysis of agronomic and morphological traits in sorghum, *Sorghum bicolor.* Front. Plant Sci. 2015;6:1-17. DOI 10.3389/fpls.2015.00945.

More A., Kalpande H.V., Aundhekar R.L., Chavan S.K., Patil V.S., Jangampalli S.S. Heterosis and line × tester analysis of combining ability in kharif sorghum with special reference tograin mold (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Agrotechnol. 2014;2:4. DOI. 10.4172/2168-9881.S1.012.

Nikitin I.A., Svechnikov A.Yu., Zots A.D., Alfimova A.D., Tatraev D.A., Miriev M.O. Analysis of the application of sorghum and its derivatives in bakery and pastry production. Tehnicheskie nauki – ot teorii k praktike [Technology sciences: from theory to practice]. Novosibirsk: SibAK Publ., 2016;12(30):123-129. (in Russian)

Patil V.R., Kute N.S. Combining ability studies in grain sorghum. J. Global Biosci. 2015;4(1):1902-1909.

Reddy B.V.S., Ramesh S., Ortiz R. Genetic and cytoplasmic-nuclear male sterility in Sorghum. Plant Breeding Reviews. Ed. J. Janik. Hoboken, New Jersy: Willey & Sons, Inc. 2005;25:139-169.

Reddy B.V.S., Ramesh S., Reddy P.S., Kumar A.A. Male-starility inducing cytoplasmic on combining ability in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Ind. J. Genet. 2009;69(3):199-204.

Reddy B.V.S., Ramesh S., Reddy P.S., Ramaiah B. Combining ability and heterosis as influenced by male-sterility inducing cytoplasms in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Euphytica. 2007;154(1): 153-164. DOI 10.1007/s10681-006-9281-6.

Savchenko V.K. Metod otcenki kombinatcionnoi sposobnosti geneticheski raznokachestvennykh naborov roditelskikh form [A method for evaluating the combining ability of genetically different sets of parental forms]. Metodiki genetiko-selektcionnogo i geneticheskogo eksperimentov [Methods of genetic–breeding and genetic experiments]. Minsk: Nauka i Tekhnika Publ., 1973;48-77. (in Russian)

Zhuzhukin V.I., Semin D.S., Garshin A.Y. Study of the combining ability of forage sorghum for economically valuable traits in test crosses. Kukuruza i sorgo = Maize and Sorghum. 2016;1:11-13. (in Russian)

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):657-662
DOI 10.18699/VJ17.283

AMMI и GGE biplot анализ взаимодействия генотип–среда линий ячменя ярового

П.Н. Солонечный

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

Стабильность урожайности зависит от устойчивости сортов и гибридов к стрессовым факторам окружающей среды. Оценка степени взаимодействия генотип–среда помогает селекционерам выбрать лучшие генотипы для передачи в Государственное сортоиспытание. В статье представлены результаты AMMI (additive main effect and multiplicative interaction) и GGE (genotype plus genotype-environment interaction) biplot анализа урожайности восьми перспективных линий ячменя ярового селекции Института растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН Украины и двух сортов-стандартов в 2012–2015 гг. Целью исследований было определить степень влияния генотипа, среды и их взаимодействия на урожайность и выделить стабильные и продуктивные генотипы. Опыт был заложен рандомизированно в четырех повторениях. Дисперсионный анализ данных урожайности позволил оценить влияние эффектов среды (85.8 %), генотипа (8.1 %) и взаимодействия генотип–среда (6.1 %) на вариабельность урожайности. Для оценки влияния эффекта генотип-средового взаимодействия на уровень урожайности данные были проанализированы с помощью AMMI и GGE biplot анализа. Модель AMMI оказалась более эффективной, сохраняя большую часть вариации в первых двух главных компонентах – 95.7 %, в то время как GGE biplot – 82.9 %. Обе модели указали на линии 09-837 (G8) и 08-1385 (G9) как наиболее урожайные и стабильные. Эти линии переданы в Государственное испытание под названием «Авгур» и «Велес». Результаты исследований показали информативность использования методов AMMI и GGE biplot для оценки стабильности и адаптивности генотипов в практической селекции и рекомендации сортов для Государственного сортоиспытания.

Ключевые слова: AMMI; GGE biplot; ячмень; урожайность; адаптивность; стабильность; метод главных компонент.

AMMI and GGE biplot analyses of genotype-environment interaction in spring barley lines

P.N. Solonechnyi

Plant Production Institute nd. a V.Ya. Yuryev, NAAS of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Yield stability depends on the resistance of varieties and hybrids to stressful environmental factors. Assessment of genotype-environment interaction helps breeders select the best genotypes for submission to the state variety trials. The article presents results of AMMI (Additive Main effects and Multiplicative Interaction) and GGE (Genotype plus Genotype-Environment interaction) biplot analyses of the grain yield data in eight promising spring barley lines bred at the Plant Production Institute nd. a V.Ya. Yuryev of NAAS and two standard varieties in 2012–2015. The objective of this study was to determine the effect of genotype, environment and their interaction for grain yield and identify stable and performance genotypes. The experimental layout was randomized complete block design with four replications. The analysis of variance on grain yield data showed that the mean squares of environments, genotypes and genotype-environment interaction (GEI) accounted for 85.8, 8.1 and 6.1 % of treatment combination sum of squares, respectively. To find out the effects of GEI on grain yield, the data were subjected to AMMI and GGE biplot analysis. The AMMI model presented greater efficiency by retaining most of the variation in the first two main components, 95.7 %, followed by the GGE biplot model, 82.9 %. Lines 09-837 (G8) and 08-1385 (G9) presented an elevated grain yield and stability as determined by the AMMI and GGE biplot methodologies. These lines named as "Avgur" and "Veles" were submitted to the state variety trial. The results finally indicated that AMMI and GGE biplot are informative methods to explore stability and adaptation pattern of genotypes in practical plant breeding and in subsequent variety recommendations.

Key words: AMMI; GGE biplot; barley; yield; adaptability; stability; principal component analysis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Солонечный П.Н. AMMI и GGE biplot анализ взаимодействия генотип–среда линий ячменя ярового. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):657-662. DOI 10.18699/VJ17.283

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Solonechnyi P.N. AMMI and GGE biplot analyses of genotype-environment interaction in spring barley lines. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):657-662. DOI 10.18699/VJ17.283 (in Russian)

Received 05.02.2017
Accepted for publication 16.08.2017
© AUTHOR, 2017

e-mail: pashabarley86@gmail.com

Наличие стабильной урожайности и экономической рентабельности – это важнейшая проблема для селекционеров и фермеров. Успешные сорта должны быть адаптированы к широкому диапазону условий окружающей среды для стабильной реализации своего генетического потенциала и эффективного использования технологий выращивания. Разница в реакции сортов на изменение почвенно-климатических условий обусловлена взаимодействием генотипа и среды. Взаимодействие генотип–среда (genotype-environment interaction – GEI) усложняет процесс отбора лучших генотипов, поэтому селекционерам важно постоянно вести скрининг исходного и селекционного материала для выделения и внедрения в производство сортов, адаптированных к различным условиям среды. Следовательно, информация о генотип-средовом взаимодействии перспективного селекционного материала имеет первостепенное значение для селекционеров.

Существует несколько статистических методов, с помощью которых определяют степень влияния GEI на урожайность и выделяют генотипы, в которых это влияние минимально и возможно прогнозировать их фенотипическую реакцию на изменение условий окружающей среды. К наиболее распространенным методам относятся линейный регрессионный анализ, нелинейный регрессионный анализ, многомерный анализ и непараметрическая статистика (Cornelius et al., 1996; Annicchiarico, 1997; Moreno-González et al., 2004). Одним из наиболее эффективных методов квантификации GEI и оценки стабильности урожайности являются модели AMMI и GGE biplot, базирующиеся на методе главных компонент (Kiliç, 2014; Mirosavljević et al., 2014; Mortazavian et al., 2014; Solonechnyi et al., 2015).

Дисперсионный анализ (ANOVA) – аддитивная модель, в которой GEI служит источником вариации, но его внутренние эффекты не анализируются. В отличие от него, метод главных компонент (principal component analysis – PCA) является мультипликативной моделью и, следовательно, не представляет аддитивные основные эффекты ни окружающей среды, ни генотипа (Oliveira et al., 2014). Модель AMMI (аддитивные основные эффекты и мультипликативное взаимодействие), объединяющая ANOVA и PCA в едином подходе, может применяться для оценки адаптивности генотипов (Zobel et al., 1988; Crossa et al., 1990; Gauch, Zobel, 1996). AMMI использует ANOVA для проверки основных эффектов генотипа и среды, а PCA – для анализа остаточного мультипликативного взаимодействия между генотипами и окружающей средой с целью определения суммы квадратов GEI с минимальным количеством степеней свободы. Поскольку ANOVA и PCA являются компонентами модели AMMI, она наиболее эффективна для характеристики GEI (Zobel et al., 1988).

W. Yan с коллегами (2000) предложили модификацию обычного анализа AMMI под названием GGE biplot (генотип (G) плюс генотип-средовое (GE) взаимодействие), которая была рекомендована для анализа GEI. GGE biplot была признана инновационной методологией графического анализа данных и стала активно применяться в селекции растений (Balestre et al., 2009). В отличие от модели AMMI, GGE biplot помогает в определении относительной продуктивности генотипов в конкретных экологических условиях (специфическая адаптивность генотипа), а также идентификации генотипов, подходящих для группы сред (широкая адаптивность). Для построения графиков GGE biplot можно воспользоваться специализированными функциями многих статистических пакетов или специально созданными для этого программами (Yan, 2001; Yan, Kang, 2003).

Целью данного исследования была оценка генотип-средового взаимодействия линий ячменя ярового с использованием AMMI и GGE biplot анализа и вспомогательных непараметрических статистик для отбора генотипов с высокой урожайностью и фенотипической стабильностью.

Материалы и методы

Исследования проведены в 2012–2015 гг. в лаборатории селекции и генетики ячменя Института растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН Украины. Исходным материалом для исследований служили восемь перспективных линий ячменя ярового и два сорта-стандарта Взирец и Командор. Площадь учетной делянки 10 м^2, повторность четырехкратная. Предшественник – горох на зерно. Результаты экологического испытания были проанализированы с помощью GGE biplot и AMMI анализа.

Базовая модель GGE biplot:

$$Y_{ij} - \mu - \beta_j = \lambda_1 \xi_{i1} \eta_{j1} + \lambda_2 \xi_{i2} \eta_{j2} + \varepsilon_{ij}, \quad (1)$$

где Y_{ij} – средняя урожайность генотипа i в окружающей среде j; μ – общее среднее; β_j – средняя урожайность всех генотипов в окружающей среде j; λ_1 и λ_2 – сингулярные значения (singular value (SV) первых двух главных компонент – PC1 и PC2); ξ_{i1} и ξ_{i2} – собственные скаляры генотипа i для PCl и PC2 соответственно; η_{j1} и η_{j2} – собственные скаляры окружающей среды j для PCl и PC2 соответственно; ε_{ij} – остаток, связанный с генотипом i в окружающей среде j.

Для построения биплота вышеприведенная формула (1) должна быть представлена как

$$Y_{ij} - \mu - \beta_j = g_{i1} e_{1j} + g_{i2} e_{2j} + \varepsilon_{ij}, \quad (2)$$

где $g_{i1}e_{1j}$ и $g_{i2}e_{2j}$ – индексы PCl и PC2 для генотипа i и окружающей среды j соответственно.

На биплоте генотип i изображается как точка, определенная всеми значениями g_i, а окружающая среда j – как точка, определенная всеми значениями e_j.

AMMI анализ проводили по (Zobel et al., 1988), используя следующую статистическую модель:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + e_j + \sum_{k=1}^{n} \lambda_k \alpha_{ik} \gamma_{jk} + \varepsilon_{ij}, \quad (3)$$

где Y_{ij} – средний эффект генотипа i в среде j; μ – общее среднее значение; g_i – эффект генотипа i; e_j – эффект среды j; λ_k – сингулярное значение k-й оси главного компонента взаимодействия (IPCA); α_{ik} – сингулярное значение для i генотипа k IPCA; γ_{jk} – сингулярное значение j среды k IPCA; ε_{ij} – средняя ошибка эксперимента.

Уровень фенотипической стабильности генотипов определяли по показателю ASV (AMMI stability value), рассчитанному по формуле из (Purchase et al., 2000):

$$\mathrm{ASV} = \sqrt{\left(\frac{SSIPC1}{SSIPC2}(IPC1score)^2\right) + (IPC2score)^2}, \quad (4)$$

где *SSIPC*1 и *SSIPC*2 – сумма квадратов первых двух главных компонент взаимодействия; *IPC*1*score* и *IPC*2*score* – значения первых двух главных компонент взаимодействия генотипа.

Индекс стабильности урожайности (YSI) рассчитан по формуле

$$\mathrm{YSI} = RASV + RY, \quad (5)$$

где *RASV* – ранг генотипа по уровню ASV; *RY* – ранг по урожайности (Y).

Математическую обработку данных урожайности и построение графиков GGE biplot осуществляли с использованием программы Genstat 12.

Результаты и обсуждение

Контрастные гидротермические условия лет исследований позволили достоверно оценить генотипы по стабильности и адаптивности. Средняя урожайность изученных сортов и линий колебалась от 2.79 т/га в 2013 г. до 6.55 т/га в 2014 г. (табл. 1). Для оценки влияния генотип-средового взаимодействия на урожай зерна, данные были подвергнуты AMMI и GGE biplot анализу.

GGE biplot является комплексной системой анализа, согласно которой большинство аспектов взаимодействия генотип–среда, представленные в виде таблицы, могут быть отображены графически (Yan et al., 2000; Yan, 2001; Yan, Kang, 2003; Yan, Tinker, 2006). При этом результаты экологического испытания отображаются таким образом, что визуальная оценка генотипов и идентификация «мега-сред» значительно упрощаются (Yan, 2002, 2014; Yan et al., 2007). GGE biplot анализ показал, что первые две главные компоненты объясняют 82.9 % от общей изменчивости, вызванной GEI. В модели сохраняются только две главные компоненты (PC1 и PC2), потому что такая модель является лучшей для выделения закономерностей и нивелирует ненужные данные. Кроме того, PC1 и PC2 можно легко изобразить на двухмерном графике, так что взаимодействие между каждым генотипом и определенной окружающей средой будет визуализировано.

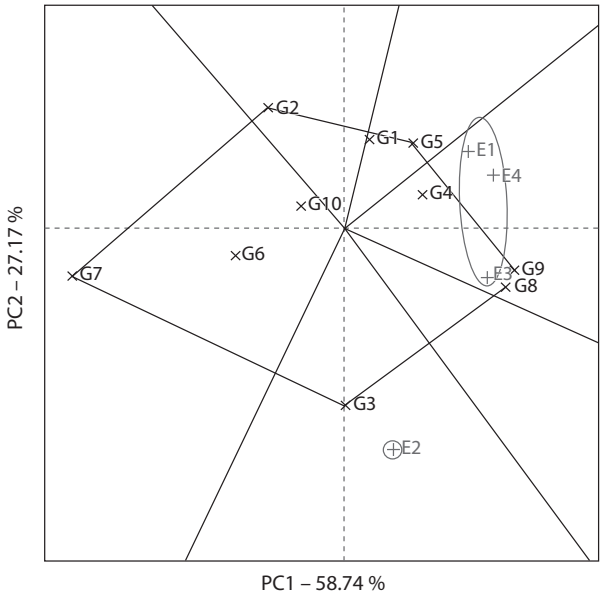


Fig. 1. Polygon views of the GGE biplot for the "which-won where" pattern and their related "mega-environments".

GGE biplot в виде многоугольника «which-won-where» (какой генотип где выигрывает) – это лучший способ визуализации закономерностей взаимодействия между генотипом и окружающей средой и эффективной интерпретации биплота (рис. 1).

Вершинами многоугольника являются маркеры генотипов, максимально удаленных от центра биплота так, что маркеры всех остальных генотипов попадают в многоугольник. Линии, делящие биплот на сектора, представляют собой набор гипотетических сред. Генотип, образующий угол многоугольника для каждого сектора, разделяющего биплот, – это тот, который дает максимальную урожайность в окружающих средах, попадающих в этот сектор. Вершинами углов многоугольника в наших исследованиях были генотипы G3, G7, G2, G5 и G9 (G8).

Table 1. Grain yield (metric tons/ha) from spring barley in 2012–2015

Genotype	Variety, line	2012	2013	2014	2015	Averaged over genotype
		E1	E2	E3	E4	
G1	Vzirets	4.60	2.23	6.71	4.73	4.57
G2	Komandor	4.60	2.10	6.24	4.42	4.34
G3	05-393	4.31	3.81	6.58	4.36	4.77
G4	06-652	4.48	2.65	6.73	5.20	4.77
G5	08-2455	5.12	2.59	6.40	5.06	4.79
G6	09-791a	3.43	2.60	6.52	4.47	4.26
G7	09-2162	3.69	2.78	5.89	3.43	3.95
G8	09-837	4.75	3.16	7.16	5.04	5.03
G9	08-1385	5.08	3.27	6.90	5.18	5.11
G10	09-409	4.63	2.70	6.34	4.37	4.37
Averaged over environment		4.47	2.79	6.55	4.63	4.61

Table 2. AMMI analysis of grain yield in spring wheat genotypes

Source of variation	df	SS	ms	Contribution to variability, %	
				yield	interaction
Overall	159	331.20	2.083		
Genotype (G)	9	24.87	2.763	8.1	
Environment (E)	3	263.10	87.701	85.8	
Interaction (GE)	27	18.66	0.691	6.1	
IPCA1	11	11.98	1.090		64.2
IPCA2	9	5.87	0.652		31.5
IPCA3	7	0.81	0.116		4.3
IPCA4	5	0.00	0.000		0.0
Error	108	16.95	0.157		

Table 3. Grain yield and statistical indices of the stability of spring barley genotypes

Genotype	Variety, line	Y, tons/ha	Rank	IPCA1	IPCA2	ASV	Rank	YSI
G1	Vzirets	4.57	5	0.424	0.114	0.378	6	11
G2	Komandor	4.34	7	0.382	–0.199	0.338	5	12
G3	05-393	4.77	4	–0.741	0.224	1.170	9	13
G4	06-652	4.77	4	0.316	0.238	0.260	4	8
G5	08-2455	4.79	3	0.395	–0.519	0.587	8	11
G6	09-791a	4.26	8	–0.065	0.661	0.446	7	15
G7	09-2162	3.95	9	–0.765	–0.432	1.381	10	19
G8	09-837	5.03	2	0.079	0.246	0.074	2	4
G9	08-1385	5.11	1	0.029	–0.019	0.002	1	2
G10	09-409	4.37	6	–0.056	–0.311	0.103	3	9
HCP_{05}		0.28						

Y, mean grain yield; IPCA1 and IPCA2, axes of the first and second principal components of the interaction; ASV, AMMI stability; YSI, yield stability index.

Соответственно генотипы G8 и G9 были лучшими в средах E1, E3 и E4 (образующих «мега-среду»), а генотип G3 – в низкопродуктивной (стрессовой) среде E2.

С помощью дисперсионного анализа сумма квадратов урожайности была разделена на эффекты генотипа, окружающей среды и взаимодействия генотип–среда (табл. 2). Самый высокий вклад в изменчивость урожайности вносил эффект окружающей среды (85.8 %), значительно меньший вносили генотип (8.1 %) и взаимодействие генотип–среда (6.1 %). Большой вклад фактора «среда» в общую дисперсию урожайности связан со значительной изменчивостью гидротермических условий в годы проведения исследований. Взаимодействие GE было дополнительно разделено с использованием метода главных компонент. Первые две оси IPCA объясняют 95.7 % вариабельности взаимодействия, что делает достоверной оценку стабильности генотипов по этим двум компонентам.

Модель AMMI не предусматривает количественной оценки степени стабильности, поэтому для количественной оценки и ранжирования генотипов по стабильности урожайности в работе (Purchase et al., 2000) предложено использовать показатель ASV (AMMI stability value). ASV представляет собой расстояние от центра (нуля) в двухмерной скаттерограмме с IPCA1 (осью первого главного компонента взаимодействия) и IPCA2 (осью второго главного компонента взаимодействия). Поскольку показатель IPCA1 вносит больший вклад в сумму квадратов взаимодействия генотип–среда (см. табл. 2), он должен иметь пропорционально больший вклад по сравнению с IPCA2, чтобы компенсировать часть относительного вклада IPCA1 и IPCA2 в общее взаимодействие GE. В модели ASV генотипы с наименьшим уровнем ASV являются наиболее стабильными. Соответственно, среди изучаемых генотипов линии G9, G8 и G10 были наиболее стабильными, а линии G3 и G7 характеризовались значительным варьированием урожайности (табл. 3).

GGE biplot дает возможность визуально ранжировать генотипы по их продуктивности и стабильности в ряде сред. На рис. 2 ось *x*, или линия продуктивности, средней тестерной координаты (average tester coordinate – ATC) проходит через начало координат биплота со стрелкой, обозначающей положительный конец оси. Ось *y* ATC (ось стабильности) проходит через начало координат биплота перпендикулярно оси *x*. Таким образом, средняя урожайность генотипов оценивается по проекции их маркеров на ось *x*, а стабильность – по проекции на ось *y*.

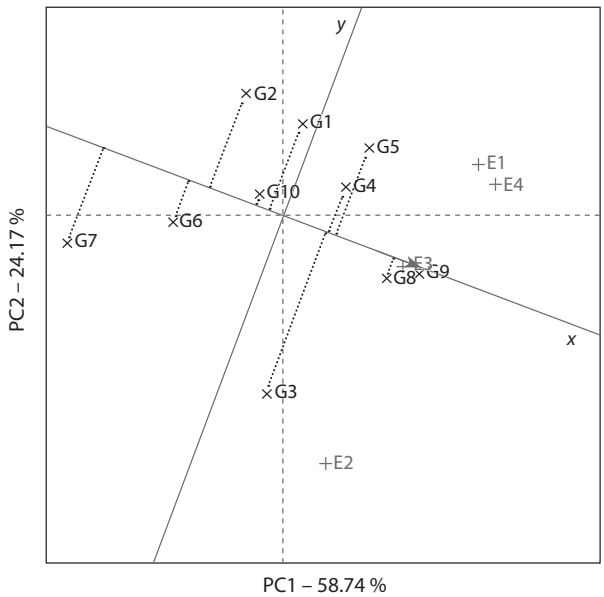


Fig. 2. GGE biplot for the mean performance and stability of genotypes.

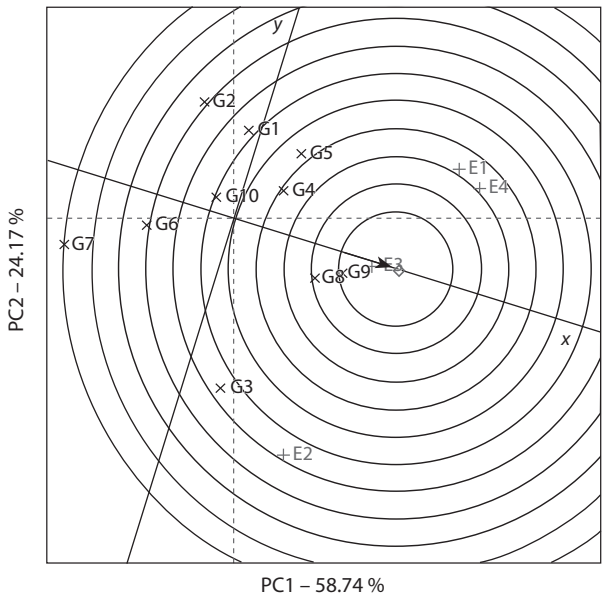


Fig. 3. GGE biplot based on genotype-focused scaling for comparing the genotypes with the "ideal" genotype.

Линии 08-1385 (G9) и 09-837 (G8) имели самую высокую среднюю урожайность, а линия 09-2162 (G7) – самую низкую. Урожайность генотипов 05-393 (G3), Командор (G2) и 09-2162 (G7) была наиболее вариабельной, тогда как линии 08-1385 (G9), 09-837 (G8) и 09-409 (G10) отличались высокой стабильностью.

Стабильность, однако, не единственный параметр при оценке генотипов, так как стабильные генотипы нередко бывают низкопродуктивны (Mohammadi et al., 2007; Mohammadi, Amri, 2008). Таким образом, необходимы подходы, включающие интегральную оценку по средней урожайности и стабильности в единый индекс, что побудило разных исследователей предложить различные критерии для одновременного отбора по урожайности и стабильности (Eskridge, 1990; Kang, 1993; Dashiell et al., 1994; Bajpai, Prabhakaran, 2000; Rao, Prabhakaran, 2005; Farshadfar, 2008). Поскольку ASV учитывает IPCA1 и IPCA2, которые включают большую часть вариации GEI, ранг ASV служит достоверной оценкой стабильности генотипов. Сумма рангов ASV и урожайности (Y) дает комплексную оценку генотипов по стабильности и урожайности – так называемый индекс стабильности урожайности (yield stability index – YSI). Генотип с наименьшим YSI считается наиболее стабильным и урожайным (см. табл. 3). В наших исследованиях такими генотипами были линии 08-1385 (G9) и 09-837 (G8).

Путем графического анализа GGE biplot позволяет также выделить генотипы, объединяющие высокую урожайность и стабильность. Центр концентрических кругов (рис. 3) представляет положение «идеального» генотипа, который определяется проекцией на ось среднеокружающей среды, равной самому длинному вектору генотипов с урожайностью выше среднего, и по нулевой проекции на перпендикулярную линию (нулевая вариабельность во всех окружающих средах). Генотип более желателен, если он ближе к «идеальному» генотипу. Хотя такой идеальный генотип может и не существовать в реальности, его можно использовать в качестве эталона для оценки генотипов. Следовательно, в нашем случае линии 09-837 (G8) и 08-1385 (G9), максимально приближенные к центру концентрических кругов, были идеальными генотипами с точки зрения величины и вариабельности урожайности по сравнению с остальными генотипами, что подтверждают результаты, полученные с помощью AMMI анализа.

По результатам исследований с помощью GGE biplot и AMMI анализа были выделены линии 08-1385 (G9) и 09-837 (G8) как наиболее перспективный селекционный материал. Эти линии переданы в Государственное сортоиспытание Украины под названием «Велес» и «Авгур». Проведенные исследования показали, что AMMI и GGE biplot анализ являются информативными методами оценки адаптивных особенностей перспективного селекционного материала на завершающем этапе селекционного процесса.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

References

Annicchiarico P. Joint regression vs AMMI analysis of genotype-environment interactions for cereals in Italy. Euphytica. 1997;94:53-62. DOI 10.1023/A:1002954824178.

Bajpai P.K., Prabhakaran V.T. A new procedure of simultaneous selection for high yielding and stable crop genotypes. Indian J. Genet. Pl. Br. 2000;60:141-146.

Balestre M., Von Pinho R.G., Souza J.C., Oliveira R.L. Genotypic stability and adaptability in tropical maize based on AMMI and GGE biplot analysis. Genet. Mol. Res. 2009;8(4):1311-1322. DOI 10.4238/vol8-4gmr658.

Cornelius P.L., Crossa J., Seyedsadr M.S. Statistical tests and estimators of multiplicative models for genotype-by-environment interaction. In: M.S. Kang, H.G. Gauch (Eds.). Genotype-by-Environment Interaction. FL, USA: CRC Press, Boca Raton, 1996;199-234.

Crossa J., Gauch H.G., Zobel R.W. Additive main effects and multiplicative analysis of two international maize cultivar trials. Crop Sci. 1990;30:493-500.

Dashiell K.E., Ariyo O.J., Bello L. Genotype × environment interaction and simultaneous selection for high yield and stability in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). Ann. Appl. Biol. 1994;124:133-139.

Eskridge K.M. Selection of stable cultivars using a safety-first rule. Crop Sci. 1990;30:369-374.

Farshadfar E. Incorporation of AMMI stability value and grain yield in a single non-parametric index (GSI) in bread wheat. Pak. J. Biol. Sci. 2008;11(14):1791-1796.

Gauch H.G., Zobel R.W. AMMI analysis of yield trials. Ch. 4. In: M.S. Kang, H.G. Gauch (Eds.). Genotype-by-Environment Interaction. FL, USA: CRC Press, Boca Raton, 1996:85-122.

Kang M.S. Simultaneous selection for yield and stability in crop performance trials: Consequences for growers. Agron. J. 1993;85:754-757. DOI 10.2134/agronj1993.00021962008500030042x.

Kiliç H. Additive main effects and multiplicative interactions (AMMI) analysis of grain yield in barley genotypes across environments. Tarım Bilimleri Dergisi = J. Agric. Sci. 2014;20:337-344.

Mirosavljević M., Pržulj N., Čanak P. Analysis of new experimental barley genotype performance for grain yield using AMMI biplots. Selekcija i Semenarstvo. 2014;XX(1):27-36.

Mohammadi R., Abdulahi A., Haghparast R., Armion M. Interpreting genotype-environment interactions for durum wheat grain yields using non-parametric methods. Euphytica. 2007;57:239-251. DOI 10.1007/s10681-007-9417-3.

Mohammadi R., Amri A. Comparison of parametric and non-parametric methods for selecting stable and adapted durum wheat genotypes in variable environments. Euphytica. 2008;159:419-432. DOI 10.1007/s10681-007-9600-6.

Moreno-González J., Crossa J., Cornelius P.L. Genotype × environment interaction in multi-environment trials using shrinkage factors for AMMI models. Euphytica. 2004;137:119-127.

Mortazavian S.M.M., Nikkhah H.R., Hassani F.A., Sharif-al-Hosseini M., Taheri M., Mahlooji M. GGE biplot and AMMI analysis of yield performance of barley genotypes across different environments in Iran. J. Agr. Sci. Tech. 2014;16:609-622.

Oliveira E.J., Freitas J.P.X., Jesus O.N. AMMI analysis of the adaptability and yield stability of yellow passion fruit varieties. Sci. Agric. 2014;71(2):139-145.

Purchase J.L., Hatting H., van Deventer C.S. Genotype × environment interaction of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in South Africa: Stability analysis of yield performance. South Afric. J. Plant Soil. 2000;17:101-107. DOI 10.1080/02571862.2000.10634878.

Rao A.R., Prabhakaran V.T. Use of AMMI in simultaneous selection of genotypes for yield and stability. Ind. Soc. Agric. Statist. 2005; 59(1):76-82.

Solonechnyi P., Vasko N., Naumov O., Solonechnaya O., Vazhenina O., Bondareva O., Logvinenko Yu. GGE biplot analysis of genotype by environment interaction of spring barley varieties. Zemdirbyste-Agriculture. 2015;102(4):431-436. DOI 10.13080/z-a.2015.102.055.

Yan W. GGEbiplot – a Windows application for graphical analysis of multienvironment trial data and other types of two-way data. Agron. J. 2001;93:1111-1118. DOI 10.2134/agronj2001.9351111x.

Yan W. Singular-value partitioning in biplot analysis of multi-environment trial data. Agron. J. 2002;94:990-996. DOI 10.2134/agronj 2002.9900.

Yan W. Crop Variety Trials: Data Management and Analysis. John Wiley and Sons, 2014. DOI 10.1002/9781118688571.

Yan W., Hunt L.A., Sheny Q., Szlavnics Z. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. Crop Sci. 2000;40:597-605. DOI: 10.2135/cropsci2000.403597x.

Yan W., Kang M.S. GGE Biplot Analysis: A Graphical Tool for Breeders, Geneticists and Agronomists. Boca Raton, USA: CRC Press, 2003.

Yan W., Kang M.S., Ma B., Woods S., Cornelius P.L. GGE biplot vs. AMMI analysis of genotype-by-environment data. Crop Sci. 2007; 47:643-655. DOI 10.2135/cropsci2006.06.0374.

Yan W., Tinker N.A. Biplot analysis of multi-environment trial data: principles and applications. Can. J. Plant Sci. 2006;86:623-645. DOI 10.4141/P05-169.

Zobel R.W., Wright A.J., Gauch H.G. Statistical analysis of a yield trial. Agron. J. 1988;80:388-393.

Вавиловский журнал генетики и селекции 2017;21(6):663-670
DOI 10.18699/VJ17.284

Использование синтетической формы Авродес для передачи устойчивости к листовой ржавчине от *Aegilops speltoides* мягкой пшенице

Р.О. Давоян[1] ✉, И.В. Бебякина[1], Э.Р. Давоян[1], Д.С. Миков[1], Е.Д. Бадаева[2], И.Г. Адонина[3], Е.А. Салина[3], А.С. Зинченко[1], Ю.С. Зубанова[1]

[1] Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия
[2] Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия
[3] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Диплоидный сородич мягкой пшеницы *Aegilops speltoides* является ценным источником генов устойчивости к болезням. Для передачи от этого вида мягкой пшенице устойчивости к листовой ржавчине в качестве «мостика» была использована синтетическая форма Авродес (BBAASS). Оценка 115 *Triticum aestivum*/Авродес интрогрессивных линий выявила их различие по устойчивости к листовой ржавчине – от среднеустойчивых до высокоустойчивых. Тестирование интрогрессивных линий с помощью молекулярных маркеров показало, что отдельные линии имеют гены устойчивости *Lr28* и *Lr35*, наследуемые от синтетической формы Авродес. В то же время у большей части устойчивых линий их присутствие не было выявлено. Анализ мейотической конъюгации хромосом F_1 гибридов показал, что генетический материал от синтетической формы Авродес передается в основном посредством транслокаций. С использованием методов С-окрашивания и FISH идентифицированы линии с транслокациями на хромосомах 2D и 5D. Ни один из переданных ранее генов устойчивости от *Ae. speltoides* не имеет локализацию на хромосомах 2D и 5D. Таким образом, можно предположить передачу новых генов устойчивости к листовой ржавчине от *Ae. speltoides* мягкой пшенице. Проведено изучение интрогрессивных линий по продуктивности и технологическим характеристикам зерна. Линии AA60n9 и D37n10 сочетают высокую устойчивость к листовой ржавчине с хорошими характеристиками по продуктивности и технологическими показателями зерна. Полученные результаты свидетельствуют о генетическом разнообразии и ценности исследуемых интрогрессивных линий для селекции мягкой пшеницы на устойчивость к листовой ржавчине.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*; *Aegilops speltoides*; интрогрессивные линии; устойчивость к листовой ржавчине; цитологический анализ; молекулярные маркеры; продуктивность и технологические качества зерна.

Use of a synthetic form Avrodes for transfer of leaf rust resistance from *Aegilops speltoides* to common wheat

R.O. Davoyan[1] ✉, I.V. Bebyakina[1], E.R. Davoyan[1], D.S. Mikov[1], E.D. Badaeva[2], I.G. Adonina[3], E.A. Salina[3], A.N. Zinchenco[1], Y.S. Zubanova[1]

[1] Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia
[2] Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia
[3] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Diploid wild relative of wheat – *Aegilops speltoides* – is a valuable source of genes for resistance to diseases. The synthetic form Avrodes (BBAASS) was used as a bridge to transfer leaf rust resistance genes from *Ae. speltoides* to common wheat. Introgression lines obtained from crosses of Avrodes and susceptible common wheat cultivars were evaluated in a field leaf rust nursery. Resistance levels varied from high to moderate. Testing of lines with the use of molecular markers has shown that some lines have the *Lr28* and *Lr35* genes inherited from synthetic form Avrodes. The majority of resistance lines have not been found to carry these genes. The *Lr47* and *Lr51* genes were not identified in the Avrodes and introgression lines. The analysis of chromosome pairing in F_1 hybrids showed that the transfer of a genetic material from Avrodes to common wheat basically occurs through translocations. Lines with translocations on chromosomes 2D and 5D were identified by C-banding and FISH. The translocations differed in chromosomal location from known leaf resistance genes transferred to common wheat from *Ae. speltoides*. Hence it was assumed that new genes were introduced into the common wheat genome from *Ae. speltoides*. Introgression lines have been studied for productivity and technological qualities of grain. Lines AA60n9 and D37n10 combine high resistance to leaf rust with good characteristics of productivity and technological qualities of grain. The received results demonstrate a genetic diversity and a value of the investigated introgression lines for breeding of common wheat.

Key words: *Triticum aestivum*; *Aegilops speltoides*; introgression lines; resistance to leaf rust; cytological analysis; molecular markers; productivity and technological qualities of grain.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.С., Зубанова Ю.С. Использование синтетической формы Авродес для передачи устойчивости к листовой ржавчине от *Aegilops speltoides* мягкой пшенице. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):663-670. DOI 10.18699/VJ17.284

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenco A.N., Zubanova Y.S. Use of a synthetic form Avrodes for transfer of leaf rust resistance from *Aegilops speltoides* to common wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):663-670. DOI 10.18699/VJ17.284 (in Russian)

Received 02.02.2017
Accepted for publication 22.06.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: davoyanro@mail.ru

В связи с постоянно растущей потребностью повышения производства одной из главных зерновых культур – мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), наряду с ростом продуктивности существенное значение имеет устойчивость возделываемых сортов к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам внешней среды. Генетического запаса самой мягкой пшеницы недостаточно для решения этой проблемы. К тому же он был в значительной степени обеднен вследствие широкого распространения однотипных сортов с перекрывающимися родословными. В особенности это касается генов устойчивости к болезням, ограничение разнообразия которых является одним из основных лимитирующих факторов селекции.

Значительный резерв генетического разнообразия сосредоточен в генофонде дикорастущих сородичей пшеницы. Многие из них были с успехом использованы для передачи полезных признаков в мягкую пшеницу. Так, в настоящее время большинство эффективных генов устойчивости к болезням пшеницы происходит из этого генофонда (McIntosh et al., 2005).

Листовая ржавчина (*Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. tritici Erikss. et Henn) относится к числу самых распространенных и вредоносных болезней пшеницы. Наиболее эффективный и экономичный путь решения этой проблемы – создание устойчивых сортов. Эта работа, ориентированная на длительную устойчивость, основывается на наличии достаточного разнообразия генов устойчивости.

Большой интерес в качестве источников устойчивости к болезням представляют различные виды эгилопсов и, в частности, *Aegilops speltoides* Tausch. (Мигушова, Григорьева, 1973; Manisterski et al., 1988; Kerber, Dyck, 1990; Jiang et al., 1994). Кроме того, этот вид обладает способностью подавлять активность гена(ов) *Ph* и стимулировать гомеологичную конъюгацию хромосом (Dvorak, 1972; Kimber, Athwal, 1972).

Для того чтобы облегчить передачу генетического материала от *Ae. speltoides* в мягкую пшеницу, была использована геномно-замещенная форма Авродес (BBAASS). Эта форма проявляет устойчивость к листовой и желтой ржавчинам, мучнистой росе, а также отличается высоким содержанием белка. С ее участием к настоящему времени получен большой набор интрогрессивных линий (Давоян Р.О. и др., 2012). Предположительно, полученные линии могут нести новые гены устойчивости к листовой ржавчине, переданные от *Ae. speltoides*.

В представленной работе приведены результаты оценки интрогрессивных линий мягкой пшеницы *Triticum aestivum*/Авродес по устойчивости к листовой ржавчине, наличию у них транслокаций и известных генов устойчивости от *Ae. speltoides*, по продуктивности и технологическим характеристикам зерна.

Материалы и методы

Исходным материалом служили 115 интрогрессивных линий мягкой пшеницы ($BC_4F_6 – BC_2F_{22}$), полученные от скрещивания синтетической формы Авродес с восприимчивыми к листовой ржавчине сортами селекции Краснодарского НИИ сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко (КНИИСХ). Для цитологического, молекулярного анализов и оценки технологических качеств зерна отбирались наиболее интересные по фенотипическим признакам линии.

Изучение конъюгации хромосом в метафазе I мейоза проводилось на давленых препаратах, окрашенных уксуснокислым гематоксилином. В мейозе подсчитывали число бивалентов, унивалентов и мультивалентов.

Дифференциальное окрашивание хромосом (С-бэндинг) выполняли в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова по методике, разработанной в лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Badaeva et al., 1994).

Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) проводили в Институте цитологии и генетики СО РАН по ранее опубликованной методике (Salina et al., 2006) с использованием зондов pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980) и pAs1 (Rayburn, Gill, 1986) для идентификации хромосом (Schneider et al., 2003).

Заражение и оценку по устойчивости к листовой ржавчине осуществляли во взрослой стадии в полевых условиях. Популяцию линий заражали в фазе выхода в трубку смесью уредоспор ржавчины, собранных с разных сортов пшеницы. Устойчивость определяли по международной шкале Майнса и Джексона (Mains, Jakson, 1926). К устойчивым относили растения с типом реакции 0 (иммунные), 1 (высокоустойчивые) и 2 (умеренно устойчивые). Растения с промежуточным типом реакции (от 0 до 1) обозначали «1–». К восприимчивым относили растения с типом реакции 3–4.

ДНК пшеницы выделяли из 5–7-дневных этиолированных проростков по методу Плашке с соавторами (Plaschke et al., 1995). Гены *Lr* идентифицировали с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, маркирующими гены *Lr28* и *Lr35*. Праймеры отбирали на основании литературных данных, их нуклеотидные последовательности представлены в табл. 1.

Условия амплификации были незначительно модифицированы: для гена *Lr28* – 95 °C в течение 2 мин; 40 циклов (94 °C 1 мин, 60 °C 1 мин, 72 °C 1 мин); 72 °C 7 мин; для гена *Lr35* – 94 °C 3 мин; 30 циклов (94 °C 45 с, 59 ° 45 с, 72 ° 60 с); 72 ° 5 мин.

Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1.8 % агарозном геле с 0.5× буфером TBE. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью фотобокса Infiniti 1000. В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК-маркер М 24 100 п. н. «СибЭнзим».

В качестве положительных контролей для определения известных генов были использованы почти изогенные линии сорта Thatcher с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr28* (TcLr28) и *Lr35* (TcLr35), в качестве отрицательного контроля – восприимчивый к листовой ржавчине сорт Аврора.

Технологические качества зерна изучали в отделе технологии и биохимии зерна КНИИСХ по методикам Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (1988).

Статистический анализ полученных результатов проводили методом дисперсионного анализа с использованием программы AGROS-2.10.

Table 1. Markers employed in the identification of *Lr* genes

Gene	Primer		Reference
	Designation	Nucleotide sequence	
Lr28	SCS421-F	ACAAGGTAAGTCTCCAACCA	Cherukuri et al., 2005
	SCS421-R	AGTCGACCGAGATTTTAACC	
Lr35	BCD260F1	GAAGTTAAAGAGGTCTTGAC	Seyfarth et al., 1999
	35R2	TTTTGAGAATCAGTCATCAC	

Результаты

Изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы по геномному составу и устойчивости к листовой ржавчине

Для передачи устойчивости к листовой ржавчине в качестве реципиентов использовались восприимчивые сорта мягкой пшеницы. На первом этапе это был сорт Аврора, на втором – Скифянка, Лад, на третьем – сорта Краснодарская 99, Гром.

Оценка линий выявила их различия по устойчивости к листовой ржавчине по всем комбинациям (табл. 2). Были идентифицированы высокоустойчивые линии с типом реакции растений 1– и 1; среднеустойчивые (тип реакции 2); средне- (3) и сильновосприимчивые (4). В целом из 115 линий высокую устойчивость к листовой ржавчине проявили 67 линий (см. табл. 2). Большое разнообразие линий по устойчивости к листовой ржавчине может свидетельствовать о различных интрогрессиях генетического материала *Ae. speltoides* в геном мягкой пшеницы.

Одним из основных условий применения интрогрессивных линий в качестве доноров является их цитологическая стабильность, поскольку она тесно связана с нормальным онтогенезом растений. Очень важно также, в каком виде генетический материал с необходимыми признаками от дикого вида привнесен в геном мягкой пшеницы (дополненные хромосомы, замещенные хромосомы, транслокации или рекомбинации).

Исходя из того, что анализируемые линии получены посредством беккроссов и большого числа самоопыляющихся поколений, можно с большой долей вероятности предположить, что они обладают мейотической стабильностью.

Для того чтобы выяснить природу переданного материала от синтетической формы Авродес, 38 предварительно отобранных устойчивых к листовой ржавчине цитологически стабильных линий (21^{II}) были скрещены с одним из наиболее мейотически стабильных сортов мягкой пшеницы Краснодарская 99, и изучен мейоз у гибридов F_1. Предполагалось, что если у взятых в анализ линий генетический материал синтетиков представлен в виде целой хромосомы, то, как правило, ассоциация хромосом будет иметь вид $20^{II}+2^{I}$ (рис. 1, *а*). Если же он представлен в виде транслокации (сегмента хромосомы), то в мейозе MI можно будет наблюдать биваленты и мультиваленты (см. рис. 1, *б*).

В результате проведенной работы было установлено, что генетический материал от синтетической формы Авродес передается в основном посредством транслокаций (34 линии), реже – через замещение целых хромосом (табл. 3).

Table 2. The resistance to leaf rust in populations of *T. aestivum*/ Avrodes lines

Recipient variety	Total	Numbers of lines with various leaf rust damage scores			
		1–	1	2	3–4
Avrora	33	13	11	7	2
Skifyanka, Lad	30	10	7	7	6
Krasnodarskaya 99, Grom	52	15	11	14	12
Total	115	38	29	28	20

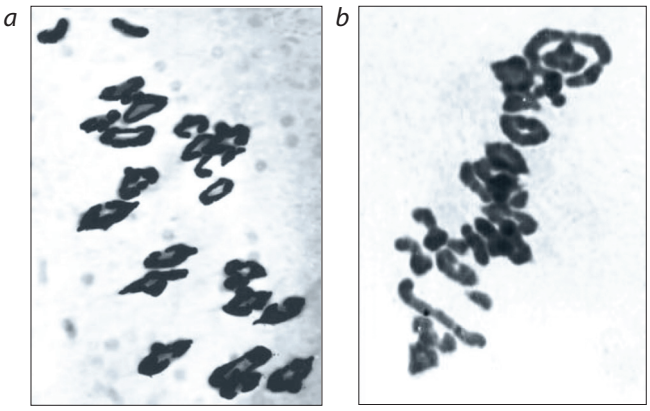


Fig. 1. Chromosome association in meiosis metaphase I in F1 hybrids. *a*, Krasnodarskaya 99×2506n14, $20^{II}+2^{I}$; *b*, Krasnodarskaya 99× D37n10, $19^{II}+1^{IV}$.

Чтобы определить селекционную ценность интрогрессивных линий, необходимо также наличие информации об идентификации в них чужеродного генетического материала и генов устойчивости к болезням, об оценке их по компонентам урожайности и технологическим свойствам зерна.

Для идентификации генетического материала *Ae. speltoides* в интрогрессивных линиях, использовали методы С-окрашивания и FISH. Всего в анализ было включено 17 линий, полученных с участием сорта-реципиента Аврора. Данный подход позволил выявить у пяти интрогрессивных линий чужеродные транслокации (табл. 4). В остальных линиях используемыми методами крупных транслокаций не обнаружено.

В то же время результаты исследования подтвердили предположение о различии интрогрессий генетического

Table 3. Analysis of meiotically stable (21^{II}) *T. aestivum*/Avrodes lines for the presence of translocations and substitutions

Recipient variety	Number of lines		
	total	with translocations	with substituted chromosomes
Avrora	17	16	1
Skifyanka, Lad	9	9	–
Krasnodarskaya 99, Grom	12	9	3
Total	38	34	4

Table 4. *Triticum aestivum*/Avrodes introgression lines with identified translocations

Variety/line	Origin	Translocation
Avrora	*Secale cereale*	T1BL.1RS
989n9	*Ae. speltoides* *S. cereale*	T2D, T5D, T6DL T1BL.1RS
AA60n9	*Ae. speltoides* *S. cereale*	T2D, T5D T1BL.1RS
3193/2n5	*Ae. speltoides*	T2A, T1D, T2D, T5D
D37n10	*Ae. speltoides* *S. cereale*	T2D, T5D T1BL.1RS
M323n9	*T. miguschovae* *Ae. speltoides* *S. cereale*	T5BS.5BL-5GL T6BS.6BL-5GL T2D, T5D T1BL.1RS

материала *Ae. speltoides* в полученных нами линиях. Интрогрессии затронули в основном хромосомы генома D, при этом большинство изученных линий одновременно несут транслокации на хромосомах 2D и 5D (рис. 2, см. табл. 4). Дополнительно к этим транслокациям у линии 989n9 выявлена транслокация на хромосоме 6D, у линии 3193/2n5 – на хромосомах 2A и 1D. Линия M323 вместе с транслокациями на хромосомах 2D и 5D от *Ae. speltoides* имеет также две транслокации от *Triticum miguschovae*. Вероятно, произошла спонтанная гибридизация между линиями, полученными с участием синтетических форм Авродес и *T. miguschovae*. Транслокация T1BL.1RS получена от сорта Аврора. Наличие транслокаций на хромосомах 2D (транслокация в коротком плече) и 5D (транслокация в длинном плече) от *Ae. speltoides* у линий D37n10 и M323n9 подтверждено также методом FISH (рис. 3).

Для определения генетического разнообразия полученных нами линий по устойчивости к листовой ржавчине ранее использовались фитопатологический тест, гибридологический и моносомный анализы. В результате выполненных работ было выявлено, что гены устойчивости исследуемых линий различаются между собой, отличаются от используемых известных эффективных генов, переданных от *Ae. speltoides* (Давоян, Жиров, 1995; Давоян, 1999).

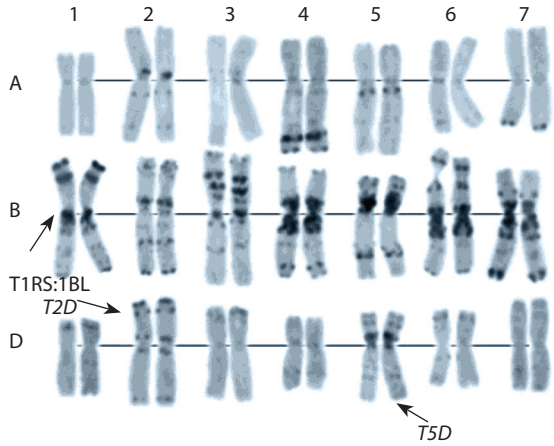


Fig. 2. C-banded karyotype of common wheat introgression line AA60n9.

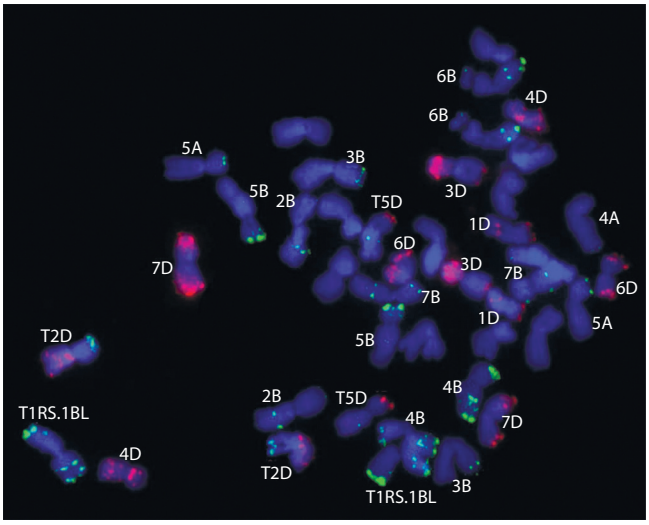


Fig. 3. FISH with probes pAs1 (red) and pSc119.2 (green) on metaphase chromosomes of line D37n10.

Существенно ускорить и облегчить эту работу позволяет использование ДНК-маркеров. Для идентификации генов устойчивости в интрогрессивных линиях предварительно был проведен анализ синтетической формы Авродес на присутствие ранее переданных от *Ae. speltoides* генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr28*, *Lr35*, *Lr47* и *Lr51*. Установлено, что синтетическая форма содержит только два из перечисленных генов – *Lr28* и *Lr35* (Давоян Э.Р., 2012). В работе (Marais et al., 2010) был идентифицирован ген устойчивости *LrS13*. Этот ген – единственный из известных генов, переданных в 3A хромосому пшеницы, в дальнейшем получил название *Lr66*. Для идентификации гена *Lr66* предложен молекулярный маркер *16-S13*, однако на данном этапе работы его присутствие в анализируемых линиях не изучалось. Ген устойчивости *Lr36* в анализ не был включен в связи с отсутствием к нему эффективного молекулярного маркера. Исходя из этого, полученные интрогрессивные линии

анализировались только на наличие у них эффективных генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr28* и *Lr35*.

При использовании маркера *SCS421* у образцов с геном *Lr28* амплифицируется маркерный фрагмент длиной 570 п. н. Данный фрагмент был выявлен в линии AD771 (рис. 4). Присутствие молекулярного маркера *BCD260F1/35R2*, сцепленного с геном *Lr35*, установлено в линиях AD771 и 2506n14 (рис. 5).

Таким образом, у большей части устойчивых линий наличие генов *Lr28* и *Lr35* не выявлено.

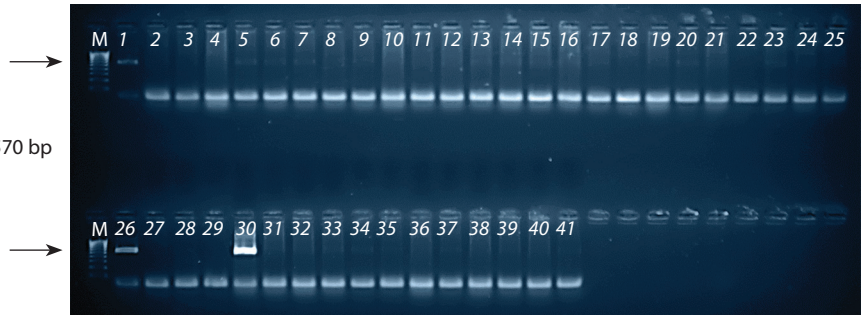


Fig. 4. Amplification products obtained with the primer to the *Lr28* leaf rust resistance gene.
Lanes: *1*, line TcLr28; *26*, Avrodes; *2–25*, *27–41*, introgression lines; *30*, line AD771.

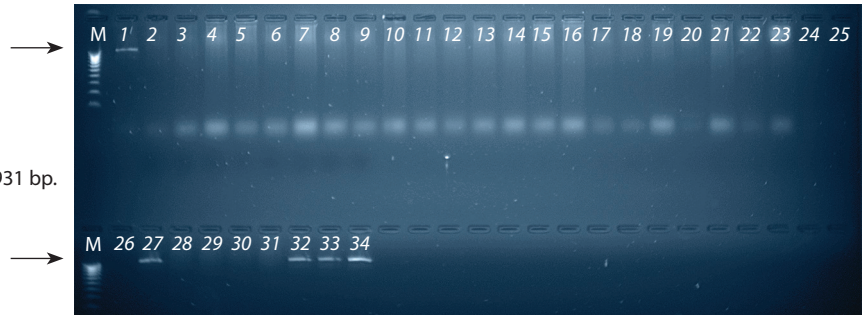


Fig. 5. Amplification products obtained with the primer to the *Lr35* leaf rust resistance gene.
Lanes: *1*, line TcLr35; *2–26*, *28–32*, introgression lines; *27*, line 2506n14; *32*, line AD771; *33*, *34*, Avrodes.

Оценка интрогрессивных линий по компонентам продуктивности и технологическим качествам зерна

При межвидовых и, особенно, межродовых скрещиваниях нередко наблюдается связь переданного положительного признака с отрицательными, такими как удлинение вегетационного периода, ухудшение хлебопекарных качеств, склонность к полеганию, понижение урожайности и др. (Knott, 1989; Brevis et al., 2008). Количество нежелательных признаков зависит от формы передачи и характера их проявления. В то же время передаваемый от природных сородичей генетический материал может либо не иметь негативного эффекта, либо быть сцепленным с другими положительными признаками (Zeller, Fuchs, 1983; Тимонова и др., 2012; Леонова, Будашкина, 2016).

Чтобы определить перспективы вовлечения полученных нами линий в селекционную практику, проводится их оценка по компонентам продуктивности и технологическим качествам зерна. В настоящей работе представлены результаты оценки пяти линий, которые по ряду показателей продуктивности и технологическому качеству зерна превышали сорт-реципиент Аврора.

Для изучения продуктивности использовали следующие показатели: масса 1000 зерен, масса зерна и количество колосьев на 1 м^2.

Масса 1000 зерен у линий варьировала от 29.6 (D129n10) до 42.2 г у линии D15n10 при среднем значении у сорта Аврора 38.1 г (табл. 5). Кроме линии D15n10, достоверно превышают по этому показателю сорт Аврора линии AA60n9, D37n10 и D39n10.

Table 5. Performance indices of Avrora/Avrodes introgression lines

Line	1000 kernel weight, g	Number of spikes, m^2	Grain weight, g/m^2
D15n10	42.2	362.0	426.5
AA60n9	40.7	345.2	435.4
D37n10	41.3	331.7	448.2
D39n10	41.5	357.2	431.0
D129n10	29.6	341.5	338.7
Avrora	38.1	357.0	364.1
HCP_{05}	1.9	56.3	28.9

По количеству колосьев на 1 м^2 различия между показателями линий и сорта Аврора оказались несущественными.

По массе зерна с 1 м^2 линии D15n10, AA60n9, D37n10 и D39n10 тоже достоверно превышали аналогичный показатель у сорта Аврора (364.1 г). Наибольшее значение имела линия D37n10 – 448.2 г.

Одними из наиболее важных агрономических признаков, в особенности для линий, несущих чужеродный генетический материал, являются технологические характеристики зерна и муки. Чужеродные интрогрессии могут существенно влиять на технологические качества зерна и муки (Bochev, 1983; Ухинова и др., 2009; Лайкова и др., 2013).

Содержание белка и клейковины у линий в значительной степени зависит от условий вегетационного периода. По этим показателям все исследуемые

Table 6. Bread-making qualities of Avrora/Avrodes common wheat introgression lines

Line	Content, %		Gluten deformation, IDK-1 units	Volume, ml	Overall score
	protein	gluten			
D15n10	17.1	34.4	85	780	4.4
AA60n9	15.0	30.8	74	745	4.5
D37n10	16.2	31.4	72	650	4.5
D39n10	15.8	31.0	78	645	4.1
D129n10	17.9	39.2	94	660	3.5
Avrora	14.0	28.2	75	640	4.4
HCP_{05}	0.4	0.9	3	8	–

линии превосходили сорт-реципиент Аврора. Наивысшие значения имели линии D15n10 и D129n10 – 17.1 и 17.9 % белка, 34.4 и 39.2 % клейковины соответственно. Содержание белка и клейковины у сорта Аврора составило 14 и 28.2 % соответственно (табл. 6).

Технологические характеристики зерна определяются не только содержанием белка и клейковины. Важное значение имеет также качество клейковины. Это особенно актуально для интрогрессивных линий пшеницы с генетическим материалом дикорастущих сородичей. В основном высокое содержание белка и клейковины связано с ухудшением качества клейковины. В нашем анализе лучшие по содержанию белка линии D15n10 и D129n10 характеризуются наиболее высокими показателями ИДК клейковины, соответствующими по ГОСТ второй группе. У двух линий – AA60n9 и D37n10 – при относительно высоком содержании белка и клейковины ее качество соответствует первой группе. По объемному выходу хлеба полученные значения варьировали от 645 (D39n10) до 780 мл (D15n10) при 640 мл у сорта Аврора.

В итоге исследуемые линии различались между собой по общей хлебопекарной оценке. Линии D39n10 и D129n10 имели более низкую хлебопекарную оценку по сравнению с сортом Аврора, у которого она составила 4.4 балла. У трех линий – D15n10, AA60n9 и D37n10 – общая хлебопекарная оценка была на уровне сорта Аврора. В целом из изученных линий наибольший интерес по комплексу агрономических показателей представляют линии D15n10, AA60n9 и D37n10.

Обсуждение

Использование дикорастущих сородичей мягкой пшеницы в качестве источников новых генов устойчивости остается актуальной задачей современной селекции. Одной из основных задач при создании и использовании синтетической формы Авродес являлась передача от *Ae. speltoides* мягкой пшенице устойчивости к болезням и, в частности, к наиболее распространенной и вредоносной – листовой ржавчине. В настоящее время в каталог генных символов пшеницы внесено шесть генов устойчивости, переданных от этого вида: *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51* и *Lr66* (McIntosh et al., 2013). Эти гены были перенесены в хромосомы мягкой пшеницы 4A, 2B, 6B, 7A, 1B и 3A (Friebe et al., 1996). Кроме этого, в работе (Адонина и др., 2012) была охарактеризована новая транслокация T5BS·5BL-5SL от *Ae. speltoides* с эффективным геном, обозначенным как *Lr ASP5*.

Несмотря на большое количество переданных генов, не исключено, что у *Ae. speltoides* могут присутствовать другие гены устойчивости к листовой ржавчине, о чем также свидетельствуют полученные нами результаты.

Оценка устойчивости исследуемых линий к листовой ржавчине выявила значительное варьирование данного признака. Это может быть связано с различными интрогрессиями генетического материала *Ae. speltoides* у линий и возможной передачей нового гена(ов) устойчивости. На основе гибридологического анализа (Давоян, 1999) ранее было выявлено различие по генам устойчивости к листовой ржавчине у линий Аврора/Авродес.

С использованием молекулярных маркеров проведен анализ синтетической формы Авродес и созданных на ее основе линий на наличие ранее переданных от *Ae. speltoides* генов устойчивости *Lr28*, *Lr35*, *Lr47* и *Lr51*. Установлено, что синтетическая форма несет в себе только два из перечисленных генов – *Lr28* и *Lr35*. Ген *Lr28* был идентифицирован только в линии AD771, *Lr35* – в линиях AD771 и 2506n14. В то же время у большей части устойчивых линий присутствие этих генов не выявлено. Эти результаты свидетельствуют о том, что полученные нами линии могут нести другие, отличные от них (возможно, новые) эффективные гены устойчивости.

Цитологическим анализом было установлено, что генетический материал от синтетической формы Авродес передается преимущественно посредством транслокаций, при этом интрогрессии затронули в основном хромосомы генома D. Полученные результаты вполне ожидаемы, учитывая то, что в синтетической форме Авродес (BBAASS) геном D мягкой пшеницы замещен на геном S *Ae. speltoides*, а также объясняются способностью синтетика стимулировать гомеологичную конъюгацию хромосом (Tsatsenco et al., 1993).

Большинство линий, изученных с помощью дифференциальной окраски хромосом, несут одновременно транслокации на хромосомах 2D и 5D. По данным А.С. Сибикеева и др. (2015), транслокацию 2D/2S несут полученные ими линии Л195 и Л200, устойчивые к листовой и стеблевой ржавчине. Однако ни один из переданных ранее генов устойчивости от *Ae. speltoides* не имеет локализацию на

хромосоме 5D. Таким образом, можно сделать предположение о передаче нового гена(ов) от *Ae. speltoides* мягкой пшенице посредством транслокации 5D/5S. Чтобы более точно ответить на этот вопрос, необходимо провести дополнительные исследования.

Для практического использования в селекции интрогрессивные линии наряду с устойчивостью к болезням должны иметь относительно неплохие характеристики по продуктивности и технологическим качествам зерна. Оценка линий по таким компонентам продуктивности, как масса 1000 зерен, масса зерна и количество колосьев на 1 м^2, выявила достоверное превышение показателей по сравнению с сортом-реципиентом Аврора по массе 1000 зерен и массе зерна с 1 м^2 у линий D15n10, AA60n9, D37n10 и D39n10.

Исследуемые линии различаются по содержанию белка и клейковины, качеству клейковины и общей хлебопекарной оценке. Все анализируемые в данной работе пять линий превышали сорт-реципиент Аврора по содержанию белка и клейковины, при этом у двух линий (AA60n9 и D37n10) качество клейковины соответствует первой группе. Хлебопекарная оценка у трех линий (D15n10, AA60n9 и D37n10) была на уровне сорта Аврора.

Линии AA60n9 и D37n10 несут транслокацию от ржи T1BL.1RS и две транслокации на хромосомах 2D и 5D от *Ae. speltoides*. Они сочетают высокую устойчивость к листовой ржавчине с хорошими характеристиками по продуктивности и технологическим показателями зерна. Следует также отметить, что молекулярный анализ не выявил у них ранее переданных, известных генов устойчивости к листовой ржавчине.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о генетическом разнообразии и ценности исследуемых интрогрессивных линий для селекции мягкой пшеницы на устойчивость к листовой ржавчине.

Acknowledgments

This study was supported by the RAS Presidium program "Methodology and molecular methods of using uncommon cereal crops in breeding in order to raise varieties of a new species with unique adaptive properties and grain quality". Salina E.A. and Adonina I.G. acknowledge the support from State Budgeted Project 0324-2016-0001.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Adonina I.G., Petrash N.V., Timonova E.M., Khristov Yu.A., Salina E.A. Construction and study of leaf rust-resistant common wheat lines with translocations of *Aegilops speltoides* Tausch. Genetika = Genetics (Moscow). 2012;48(4):488-494. (in Russian)

Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Interspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum*. Plant Syst. Evol. 1994;192(1):117-145.

Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M., Thompson R.D., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. Cell. 1980;19:545-560. DOI 10.1016/0092-8674(80)90529-2.

Bochev B. The genus *Aegilops* – possibilities and perspectives of utilization the breeding of high quality wheat cultivar. Proceed. of 7th World Cereal Genet. and Breed. Congress. Prague, 1983;237-242.

Brevis J.C., Chicaiza O., Khan I.A., Jackson L., Morris C.F., Dubcovsky J. Agronomic and quality evaluation of common wheat near-isogenic lines carrying the leaf rust resistance gene *LR47*. Crop Sci. 2008;48:1441-1451.

Cherukuri D.P., Gupta S.K., Charpe A., Koul S., Prabhu K.V., Singh R.B., Rizwanul Haq Q.M. Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. Euphytica. 2005;143:19-26.

Davoyan R.O. Identification and localization of leaf rust resistance genes in common wheat lines with genetic material from *Aegilops speltoides*. Nauchnye trudy KNIISKh [Proceedings of the Luk'yanenko Research Institute of Agriculture]. Krasnodar, 1999;91-95. (in Russian)

Davoyan R.O., Zhirov E.G. The genome-substituted form Avrodes as a source of common wheat resistance to leaf rust and mildew. Selskokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural Biology. 1995;1:98-101. (in Russian)

Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zinchenko A.N., Davoyan E.R., Kravchenko A.M., Zubanova Y.S. Use of synthetic forms in the preservation and exploitation of the gene pool of wild common wheat relatives. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(1):44-51. (in Russian)

Davoyan E.R., Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zubanova Y.S., Kravchenko A.M., Zinchenko A.N. Identification of leaf rust resistance genes in species of *Aegilops* L., synthetic forms and introgression lines of common wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(1): 116-122. (in Russian)

Dvorak J. Genetic variability in *Aegilops speltoides* affecting on homoelogous pairing in wheat. Can. J. Genet. Cytol. 1972;(19):133-141.

Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. Euphytica. 1996;91:59-87.

Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Recent advances in alien gene transfer in wheat. Euphytica. 1994;73:199-212.

Kerber E.R., Dyck P.L. Transfer to hexaploid wheat of linked genes for adult-plant leaf rust and seedling stem rust resistance from an amphiploid of *Aegilops speltoides* × *Triticum monococcum*. Genome. 1990;33:530-537.

Kimber G., Athwal R. A reassessment of the course of evolution of wheat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972;69:912-915.

Knott D.R. The effect of transfers of alien genes for leaf rust resistance on the agronomic and quality characteristics of wheat. Euphytica. 1989;44(1-2):65-72.

Laikova L.I., Belan I.A., Badaeva E.D., Rosseva L.P., Shepelev S.S., Shumny V.K., Pershina L.A. Development and study of spring bread wheat variety Pamyati Maystrenko with introgression of genetic material from synthetic hexaploid *Triticum timopheevii* Zhuk. × *Aegilops tauschii* Coss. Genetika = Genetics (Moscow). 2013;49(1):103-112. (in Russian)

Leonova I.N., Budashkina E.B. The study of agronomical traits determining productivity of *Triticum aestivum/Triticum timopheevii* introgression lines with resistance to fungal diseases. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(3):311-319. (in Russian)

Mains E.B., Jakson H.S. Physiologic specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticiana* Erikss. Phytopatology. 1926;16:89-120.

Manisterski A., Segal A., Lev A.A., Feldman M. Evolution of Israel *Aegilops* and *Agropyron* species for resistance to wheat leaf rust. Plant Disease. 1988;72:941-944.

Marais G.F., Bekker T.A., Eksteen A., McCallum B., Fetch T., Marais A.S. Attempts to remove gametocidal genes co-transferred to common wheat with rust resistance from *Aegilops speltoides*. Euphytica. 2010;171:71-85.

McIntosh R.A., Devos K.M., Dubovsky J., Rogers W.J., Morris C.F., Appels R., Anderson O.D. Catalogue of gene symbols for wheat: 2005 supplement. Ann. Wheat Newslet. 2005;51:272-285.

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. 2013. Available at: http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes

Metodika Gosudarstvennogo sortoispytaniya selskokhozyaystvennykh kultur [Methods of State Variety Testing of Crops]. Moscow, 1988.

Migushova E.F., Grigoreva O.G. Resistance of *Aegilops* to brown rust. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1973;50(1):227-243. (in Russian)

Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 1995;91:1001-1007.

Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa.* Plant. Mol. Biol. Rep. 1986;4:102-109. DOI 10.1007/BF02732107.

Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Yu., Zoshchuk S.A., Leitch A.A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. Genome. 2006;49:1023-1035. DOI 10.1139/G06-050.

Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. Plant Breeding. 2003;122:396-400. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00891.x.

Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayer G., Winzeler M., Keller B. Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat. Theor. Appl. Genet. 1999;99:554-560.

Sibikeev S.N., Voronina S.A., Badaeva E.D., Druzhin A.E. Study of resistance to leaf and stem rusts in *Triticum aestivum–Aegilops speltoides* lines. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(2):165-170. (in Russian)

Timonova E.M., Leonova I.N., Belan I.A., Rosseeva L.P., Salina E.A. Effect of certain chromosome regions of *Triticum timopheevii* on the formation of pest resistance and quantitative traits in common wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(1):142-159. (in Russian)

Tsatsenco L.V., Zhirov E.G., Davoyan R.O. Hybrids between wheat and genome-substituted form Avrodes. Cytogenetics and agronomy investigations. Cereal Res. Commun. 1993;21(1):45-50.

Uhinova E.P., Pylnev V.V., Rubets V.S. Cytogenetic analysis of soft wheat hybrids (*Triticum aestivum* L.) with Timopheev's wheat (*Triticum timopheevii* Zhuk). Izvestiya Timiryazevskoy selskokhozyaystvennoy akademii = Proceedings of the Timiryazev Agricultural Academy. 2009;2:131-137. (in Russian)

Zeller F.J., Fuchs E. Cytologie und Krankheitsresistenz einer 1A/1R und mehrerer 1B/1R-Weizen-Roggen-Translokatiossorten. Z. Pflanzenzucht. 1983;90(4):285-296.

Вавиловский журнал генетики и селекции 2017;21(6):671-676
DOI 10.18699/VJ17.28-o

Внутривидовая изменчивость *Puccinia triticina* на гексаплоидных видах *Triticum* и *Aegilops trivialis*

Е.И. Гультяева ✉, Е.Л. Шайдаюк, И.А. Казарцев

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

Анализ внутривидовой дифференциации патогена – необходимый этап при разработке стратегии селекции пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине. Для характеристики популяций *Puccinia triticina* Erikss. могут быть использованы разные признаки, включая вирулентность к линиям серии Thatcher с генами устойчивости к бурой ржавчине (Tc*Lr*) и молекулярные маркеры. Цель работы – изучение внутривидовой изменчивости гриба *P. triticina* на гексаплоидных видах *Triticum* L. и *Aegilops trivialis* (Zhuk.) Migusch. et Chak. с помощью SSR-маркеров. Листья образцов гексаплоидных видов *Triticum aestivum* L., *T. compactum* Host., *T. macha* Dekapr. et Menabde, *T. petropavlovskyi* Udacz. et Migusch., *T. spelta* L., *T. sphaerococcum* Perc., *T. vavilovii* Jakubz. (геном BBA^uA^uDD), *Ae. trivialis* (геном D^cD^cDDMM) с урединиопустулами собирали на Дагестанской опытной станции ВИР (г. Дербент) в 2014 г. Для SSR-анализа использовали 109 монопустульных изолятов гриба, ранее охарактеризованных по вирулентности к 20 Tc*Lr*-линиям. Изучение полиморфизма 18 микросателлитных локусов позволило выявить 16 SSR-генотипов. Генетическое сходство между коллекциями изолятов с гексаплоидных видов пшеницы по молекулярным маркерам было существенно выше, чем по признаку вирулентности. Показано высокое генетическое сходство между дербентскими изолятами *P. triticina*, полученными с гексаплоидных видов родов *Triticum* (в том числе и мягкой пшеницы) и *Ae. trivialis*.

Ключевые слова: генетическая структура популяции; *Puccinia triticina*; *Aegilops trivialis*; *Triticum* spp.; SSR-маркеры.

Intraspecific variability of *Puccinia triticina* on hexaploid *Triticum* species and *Aegilops trivialis*

E.I. Gultyaeva ✉, E.L. Shaydayuk, I.A. Kazartsev

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

The analysis of pathogen intraspecific differentiation is a necessary stage for the development of a strategy of wheat leaf rust resistance breeding. To characterize the structure of the populations, virulence to Thatcher lines with leaf rust resistance genes (Tc*Lr*) and microsatellite markers may be used. The purpose of the present research is to study the intraspecific variability of the fungus *Puccinia triticina* Erikss. on *Triticum* L. hexaploid species and *Aegilops trivialis* (Zhuk.) Migusch. et Chak. using SSR-markers. Leaves of *Triticum aestivum* L., *T. compactum* Host., *T. macha* Dekapr. et Menabde, *T. petropavlovskyi* Udacz. et Migusch., *T. spelta* L., *T. sphaerococcum* Perc., *T. vavilovii* Jakubz. and *Ae. trivialis* with uredinia were collected on the experimental field of the Dagestan experiment station of VIR (Derbent) in 2014. For SSR-analysis 109, monopustule isolates previously characterized for virulence to 20 Tc*Lr*-lines were used. As a result of 18 microsatellite loci polymorphism analysis, 16 genotypes were identified. Genetic similarity between collections of isolates from the hexaploid types of wheat was significantly higher based on microsatellite markers than based on virulence. Microsatellite analysis confirmed a high similarity between Derbent isolates of *P. triticina* coming from the hexaploid *Triticum* species (including isolates from common wheat) and *Aegilops trivialis*.

Key words: genetic structure of population; *Puccinia triticina*; *Aegilops trivialis*; *Triticum* spp.; SSR-markers.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Гультяева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Казарцев И.А. Внутривидовая изменчивость *Puccinia triticina* на гексаплоидных видах *Triticum* и *Aegilops trivialis*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):671-676. DOI 10.18699/VJ17.28-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Gultyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Kazartsev I.A. Intraspecific variability of *Puccinia triticina* on hexaploid *Triticum* species and *Aegilops trivialis*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):671-676. DOI 10.18699/VJ17.28-o (in Russian)

Received 10.05.2017
Accepted for publication 09.07.2017
Online 02.10.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: eigultyaeva@gmail.com

Создание устойчивых к болезням сортов – актуальное направление селекции. Для расширения генетического разнообразия современных сортов мягкой пшеницы применяют метод межвидовой гибридизации с привлечением диких родичей. Гексаплоидные виды с геномом BA^uD имеют высокую совместимость с *Triticum aestivum* L. и широко используются в селекции. Многие современные сорта мягкой пшеницы получены с участием *T. compactum* Host., *T. spelta* L., *T. sphaerococcum* Perc. и других гексаплоидных видов (Дорофеев и др., 1987).

Бурая ржавчина (возбудитель *Puccinia triticina* Erikss., синоним *P. recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*) – распространенное и вредоносное заболевание пшеницы в Российской Федерации (Михайлова, 2008). Научно обоснованная селекция мягкой пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине в России проводится более полувека и базируется на положениях теории иммунитета растений к инфекционным заболеваниям, сформулированных Н.И. Вавиловым (1935). Наряду с необходимостью изучения генетического разнообразия растения-хозяина, географических закономерностей распределения устойчивых форм и генетики их устойчивости, Н.И. Вавилов отводил особую значимость исследованиям взаимодействия растений и патогена, а также внутривидовой дифференциации и специализации патогена.

В вегетативной фазе развития (урединиостадии) гриб поражает не только *T. aestivum* L., но и другие культурные и дикие злаки из родов *Triticum* L., *Aegilops* L., *Elymus* L., *Bromus* L. (Bolton et al., 2008). До недавнего времени вирулентность была единственным признаком для характеристики генетического разнообразия и структуры популяций *P. triticina* (Михайлова, Васильев, 1985; Михайлова, 2006; Kolmer et al., 2007). Однако селективное действие растения-хозяина приводит к отбору определенных патотипов, что отражается на результатах анализа структуры популяции по признаку вирулентности. В связи с этим фенотипический состав патогена может существенно варьировать на генетически разнородных сортах, выращиваемых в одинаковых условиях (Берлянд-Кожевников и др., 1978).

Селективно-нейтральные молекулярные маркеры (RAPD, AFLP и SSR) начали применять для популяционных исследований *P. triticina* с середины 1990-х гг. (Kolmer et al., 1995; Kolmer, Liu, 2000; Park et al., 2000; Duan et al., 2003; Szabo, Kolmer, 2007). С использованием SSR-маркеров (simple sequence repeats) показаны существенные различия между популяциями гриба, обитающими на видах *T. aestivum*, *T. durum* Desf. и *Ae. speltoides* Tausch. (Ordoñez, Kolmer, 2007). С помощью метода секвенирования интрон-содержащих участков конститутивных генов *RPB2* и информативных для рода *Puccinia* SSR-локусов доказана независимая дивергенция гриба на диплоидном виде *Ae. speltoides*, тетраплоидных формах твердой пшеницы из Эфиопии (*T. durum*) и гексаплоидной мягкой пшенице (*T. aestivum*) (Liu et al., 2014). Подобная информация об изолятах гриба, обитающих на других видах родов *Triticum* и *Aegilops*, в литературе отсутствует.

Дагестан, где наблюдается совместная эволюция растений-хозяев с возбудителем бурой ржавчины, относится к переднеазиатскому генетическому центру видообразования пшениц. В естественных ценозах произрастают *Ae. tauschii* (Coss.) Schmalh., *Ae. cylindrica*, *Ae. triuncialis* L., *Ae. biuncialis* Viz., *Ae. triaristata* Willd., *T. persicum* Vav. ex Zhuk., *T. dicoccum* (Schrank) Schubl. (Берлянд-Кожевников и др., 1978; Дорофеев и др., 1987; Богуславский, Голик, 2004). На коллекционном поле Дагестанской опытной станции ВИР (ДОС ВИР) ежегодно изучают образцы мягкой пшеницы и других видов родов *Triticum* и *Aegilops*. Гетерогенность растений-хозяев на экспериментальных посевах и в естественных ценозах обеспечивает высокое разнообразие популяции *P. triticina* (Дмитриев и др., 1976). Л.А. Михайлова на основании многолетних исследований (1972–1990) внутривидовой изменчивости *P. triticina* по вирулентности на мягкой пшенице показала, что дербентская популяция не зависима от европейских и других северокавказских популяций, например краснодарской. Она сходна с грузинскими, азербайджанскими, осетинскими и другими кавказскими популяциями и на основании этого отнесена к кавказской группе (Михайлова, 2006). Отличия дербентской популяции *P. triticina* от других российских сохранялись и в 2000–2015 гг. (Гультяева и др., 2009, 2015). Эти отличия подтверждены и при использовании микросателлитных маркеров (Гультяева и др., 2017а).

Разнообразие изучаемых на ДОС ВИР образцов пшеницы предопределяет высокий полиморфизм популяции. Показаны существенные различия по вирулентности между дербентскими изолятами, обитающими на мягкой и других видах пшеницы. Например, изоляты с тетраплоидных видов *T. durum* Desf., *T. diccocoides* (Körn. ex Asch. & Graebner) Schweinf., *T. dicoccum* имели меньшее число аллелей вирулентности по сравнению с изолятами, обитающими на *T. aestivum* (Дмитриев и др., 1976; Берлянд-Кожевников и др., 1978; Михайлова, Метревели, 1986; Gultyaeva et al., 2016). В.М. Берлянд-Кожевников с коллегами (1978) показали различную вирулентность для пшеницы урединиоспорового материала, собранного на *Aegilops* spp. Чем выше плоидность видов *Aegilops*, тем шире спектр вирулентности изолятов *P. triticina*. Сходные результаты получены нами для изолятов, выделенных с *Triticum* spp. (Gultyaeva et al., 2016). С использованием 20 почти изогенных линий сорта Thatcher с известными генами *Lr* (линии Tc*Lr*) выявлено, что изоляты, полученные с образцов тетраплоидных видов *T. aethiopicum* Jakubz., *T. turanicum* Jakubz. и *T. dicoccum* (Shrank) Schübl.), существенно отличаются от изолятов с гексаплоидных видов *Ae. juvenalis* (Thell.). Eig., *Ae. trivialis* (Zhuk.) Migusch. et Chak., *T. compactum*, *T. macha* Dekapr. et Menabde, *T. petropavlovskyi* Udacz. et Migusch., *T. spelta*, *T. sphaerococcum*, *T. vavilovii* Jakubz. (Gultyaeva et al., 2016). С помощью микросателлитных маркеров подтверждены сходство изолятов, полученных с тетраплоидных видов, имеющих геном BBA^uA^u (*T. aethiopicum*, *T. turanicum* и *T. dicoccum*), и их отличие от изолятов с тетраплоидного вида *Ae. crassa* (геном D^cD^cMM) и мягкой пшеницы (геном BBA^uA^uDD) (Гультяева и др., 2017б). Полиморфизм дербентских изолятов, обитающих на гексаплоидных видах *Triticum* и *Aegilops*, по микросателлитным локусам до настоящего времени не исследован. Цель работы – изучение внутривидовой изменчивости гриба *P. triticina* на гексаплоидных видах *Triticum* L. и *Aegilops trivialis* (Zhuk.) Migusch. et Chak. с помощью SSR-маркеров.

Материалы и методы

Листья с урединиопустулами были собраны в 2014 г. на коллекционном поле ДОС ВИР (г. Дербент) с образцов гексаплоидных видов пшеницы *T. compactum* (к-35211, Турция; к-49138, Афганистан; к-41308, Монголия), *T. macha* (к-28168, Грузия), *T. petropavlovskyi* (к-64828, Мексика), *T. spelta* (к-619609, Афганистан; к-19385, Украина; к-56569, к-52469, Таджикистан), *T. sphaerococcum* (и-619564, Ирак), *T. vavilovii* (к-29533, к-51765, Армения), *T. aestivum* (смесь листьев восприимчивых сортов) с геномом BBA^uA^uDD и с *Ae. trivialis* (к-658, и-1349, Узбекистан) с геномом D^cD^cDDMM.

Изученные изоляты ранее были охарактеризованы по признаку вирулентности (Gultyaeva et al., 2016). Для обозначения фенотипов использована буквенная номенклатура (Long, Kolmer, 1989), основанная на определении вирулентности к пяти группам из двадцати *Lr*-линий: 1 – *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3a*; 2 – *Lr9*, *Lr16*, *Lr24*, *Lr26*; 3 – *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr17*, *Lr30*; 4 – *Lr2b*, *Lr3bg*, *Lr14a Lr14b*; 5 – *Lr15*, *Lr18*, *Lr19*, *Lr20*.

Для микросателлитного анализа отобрано 109 монопустульных изолятов гриба (табл. 1). Размножение спорового материала выполнено с использованием метода лабораторного культивирования патогена (Михайлова и др., 2000).

Выделение ДНК гриба проводили по методике (Justesen et al., 2002). Для SSR-анализа использовали 18 микросателлитных маркеров (PtSSR13, PtSSR50, PtSSR55, PtSSR61, PtSSR76, PtSSR91, PtSSR92, PtSSR151, PtSSR152, PtSSR158, PtSSR161, PtSSR164, PtSSR173, PtSSR186, PtSSR68, RB8, RB26, RB35). Данные маркеры широко применяются для изучения полиморфизма гриба *P. triticina* по SSR-локусам (Duan et al., 2003; Kolmer, Ordoñez, 2007; Ordoñez, Kolmer, 2007; Szabo, Kolmer, 2007). Условия ПЦР и последовательности праймеров представлены в оригинальных работах (Duan et al., 2003; Szabo, Kolmer, 2007). Для амплификации использовали термоциклер C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD). Микросателлитный анализ выполняли на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (ABI-Hitachi, Япония). Определение размеров SSR-аллелей осуществляли в программе GeneMapper v4.1.

Статистическую обработку данных SSR-анализа проводили с использованием пакета программ GenAlEx 6.5 (Genetic analysis in Excel, 6.5 http://biology.anu.edu.au/GenAlEx). Для характеристики внутрипопуляционной генетической изменчивости по микросателлитным локусам использовали следующие показатели: среднее число аллелей на локус (Na), число эффективных аллелей (Ne), % полиморфных локусов, ожидаемая (H_e) и наблюдаемая (H_o) гетерозиготность, индекс фиксации (F) и индекс Шеннона (I). Генетическую дифференциацию между популяциями определяли по индексам F_{st} и Нея (Nei D, Nei genetic distance), которые были рассчитаны с использованием алгоритма AMOVA (GenAlEx) (для 999 пермутаций). Дендрограмма генетического сходства между популяциями построена в пакете программ NTSYSpc 2.21 по индексу Нея. Аналогичная дендрограмма для этих же коллекций изолятов построена по признаку вирулентности на основании ранее проведенного анализа (Gultyaeva et al., 2016).

Показатели дифференциации популяций, полученные с помощью двух методических подходов (SSR-анализа и вирулентности), сравнивали с использованием теста Мантеля на основании оценки расстояний между соответствующими матрицами (по индексам F_{st} и Nei D).

Результаты и обсуждение

При анализе полиморфизма 18 микросателлитных локусов у изолятов *P. triticina* с гексаплоидных видов *Triticum* и *Ae. trivialis* выявлено 16 генотипов (табл. 2). Доминировали два генотипа: F (51 %) и H (14 %). Генотип F идентифицирован у 56 изученных изолятов (15 – *T. compactum*, 8 – *Ae. trivialis*, 2 – *T. macha*, 3 – *T. petropavlovskyi*, 11 – *T. vavilovii*, 3 – *T. sphaerococcum*, 14 – *T. spelta*), а генотип H – у 15 (6 – *T. aestivum*, 2 – *T. sphaerococcum*, 7 – *T. spelta*). Восемь SSR-генотипов были оригинальными и отмечены только на одном из изученных видов (*T. spelta* – E, P (к-619609), J (к-19385), *T. compactum* – N (к- 35211), G (к-49138), *Ae. trivialis* – M (к-658), *T. vavilovii* – L (к-51765), *T. aestivum* – O).

Существенные различия в генотипическом составе у изолятов, полученных с разных образцов *T. compactum* (к-35211, к-49138, к-41308), *T. spelta* (к-619609, к-19385, к-56569, к-52469), *T. vavilovii* (к-29533, к-51765) и *Ae. trivialis* (к-658, и-1349), не выявлены. В табл. 2 и 3 представлены сводные данные для этих видов.

Table 1. The origin of *P. triticina* isolates and their virulence phenotypes

Host plant	Number of isolates	Number of phenotypes	Phenotypes*
Ae. trivialis	10	1	PGTKB
T. spelta	34	5	CHTKG KHTTL KHTTQ PHTKB **PHTKG**
T. sphaerococcum	6	3	**PGTKG** NBTDG NGTFG
T. vavilovii	15	4	MGTKG TGTTQ BTKG MGTKB
T. petropavlovskyi	6	1	**PHTKG**
T. macha	7	2	**PGTKG PGTJG**
T. compactum	21	2	**PGTKG PGTJG**
T. aestivum	10	5	PGTKH **PHTKG** THTTQ PCTKG PCTKH

* Phenotypes found on several species are shown in bold.

Table 2. Parameters of the genetic variability of *P. triticina* isolates on wheat and *Aegilops* species according to SSR loci

Genetic variability parameters	*Ae. trivialis*	*T. spelta*	*T. sphaerococcum*	*T. vavilovii*	*T. petropavlovskyi*	*T. macha*	*T. compactum*	*T. aestivum*
Number of genotypes	3 (A, F, M)	9 (A, C, D, E, F, H, I, J, P)	3 (B, H, F)	3 (B, F, L)	4 (A, D, I, F)	2 (C, F)	5 (A, F, G, K, N)	4 (D, H, K, O)
Mean number of alleles per SSR locus (Na)	1.17 ± 0.09*	1.67 ± 0.16	1.50 ± 0.17	1.50 ± 0.17	1.17 ± 0.09	1.17 ± 0.09	1.39 ± 0.12	1.33 ± 0.11
Number of effective alleles (Ne)	1.12 ± 0.07	1.16 ± 0.07	1.21 ± 0.09	0.12 ± 0.09	1.22 ± 0.07	1.16 ± 0.07	1.15 ± 0.07	1.17 ± 0.08
Observed heterozygosity (H_o)	0.11 ± 0.07	0.13 ± 0.07	0.16 ± 0.08	0.14 ± 0.07	0.10 ± 0.06	0.15 ± 0.08	0.13 ± 0.07	0.14 ± 0.07
Expected heterozygosity (H_e)	0.06 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.06 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.10 ± 0.04
Fixation index (F)	–0.62 ± 0.12	–0.12 ± 0.11	–0.1 ± 0.16	–0.08 ± 0.16	–0.51 ± 0.08	–0.85 ± 0.06	–0.26 ± 0.19	–0.19 ± 0.16
Shannon index (I)	0.09 ± 0.05	0.16 ± 0.07	0.2 ± 0.07	0.18 ± 0.06	0.09 ± 0.05	0.11 ± 0.06	0.15 ± 0.16	0.16 ± 0.06

* Error of the mean.

Table 3. Genetic distances between collections of *P. triticina* isolates according to SSR loci (F_{st})

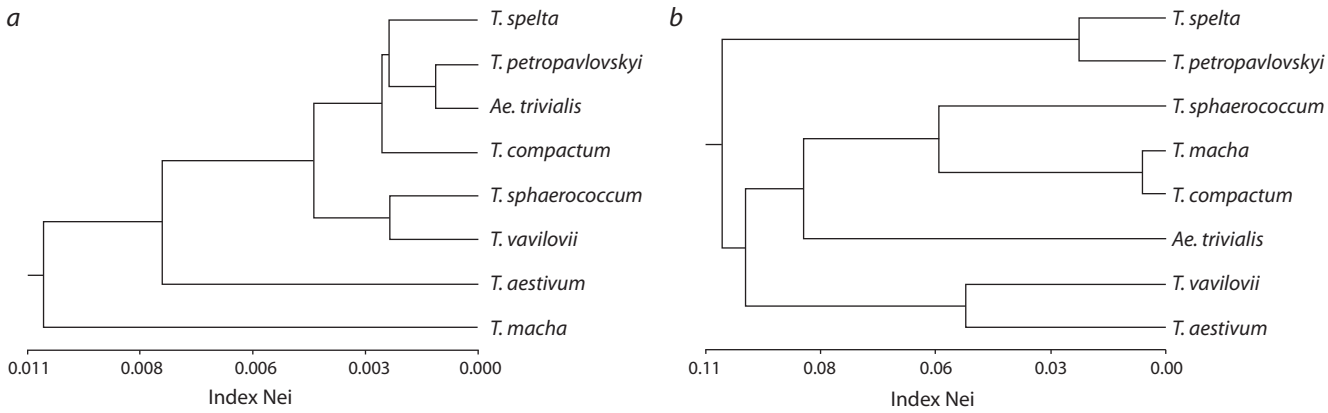
Wheat and *Aegilops* species	*Ae. trivialis*	*T. spelta*	*T. sphaerococcum*	*T. vavilovii*	*T. petropavlovskyi*	*T. macha*	*T. compactum*	*T. aestivum*
Ae. trivialis	0	0.28	0.19	0.27	0.32	0.09	0.28	0.09
T. spelta	0.01	0	0.33	0.26	0.35	0.07	0.14	0.11
T. sphaerococcum	0.03	0.01	0	0.38	0.34	0.1	0.23	0.23
T. vavilovii	0.01	0.01	0.03	0	0.35	0.09	0.15	0.06
T. petropavlovskyi	0.003	0.01	0.002	0.004	0	0.11	0.33	0.17
T. macha	0.09	0.06	0.07	0.06	0.08	0	0.05	006
T. compactum	0.004	0.01	0.02	0.02	0.001	0.07	0	0.11
T. aestivum	0.07	0.03	0.02	0.06	0.04	0.09	0.35	0

Numerator, significance level *p* obtained by 999 permutations (significant at $p < 0.05$); denominator, index F_{st}.

Идентифицировали 36 полиморфных аллелей. Число полиморфных аллелей варьировало от 2 до 3, за исключением локусов PtSSR76, PtSSR151, PtSSR173, RB8 и RB26, которые оказались мономорфными. Показатели генетической изменчивости изолятов *P. triticina* по микросателлитным локусам представлены в табл. 2. Уровень наблюдаемой гетерозиготности (H_o) был выше уровня ожидаемой (H_e) для всех популяций, что подтверждается отрицательными значениями индекса фиксации (F). Данный факт указывает на клоновую репродукцию гриба (Balloux et al., 2003; Halkett et al., 2005; Kolmer, Ordoñez, 2007).

В.М. Берлянд-Кожевников с коллегами (1978) показали, что в уредиальной стадии возбудитель бурой ржавчины в окрестностях ДОС ВИР в течение всего года паразитирует на *Cynodon dactylon* L. и *Agropyron repens* (L.) Beauv. Ранней весной, а иногда и с осени болезнь появляется и на различных однолетних злаках. Распространение популяции возбудителя болезни с многолетних злаков на посевы пшеницы начинается с развития клонов, которые могут паразитировать на соответствующих растениях-хозяевах. В конце марта урединиопустулы отмечали на образцах вида *Aegilops* (преимущественно на *Ae. cilindrica*), и лишь с конца апреля–начала мая первые симптомы ржавчины появлялись на мягкой пшенице и других видах *Triticum*, изучаемых на ДОС ВИР. Промежуточные растения-хозяева (*Thalictrum* spp., *Anchuga* spp.) также произрастают в условиях Дагестана, и на них наблюдали эцидиальную стадию гриба. При этом эции на растениях-промежуточниках появлялись, когда на растениях пшеницы, эгилопсов и пырея уже наблюдали урединиопустулы. Искусственное заражение проростков различных видов пшеницы в лабораторных условиях не было успешным, в связи с чем предположили, что половая стадия в жизненном цикле гриба в условиях Дагестана не имеет большого значения (Берлянд-Кожевников и др., 1978). Наши сведения о высокой гетерозиготности изолятов по SSR-маркерам в дагестанской популяции согласуются с данным предположением.

Анализ полиморфизма микросателлитных локусов у дербентских изолятов возбудителя бурой ржавчины пше-



Genetic distances between isolates from hexaploid *Triticum* and *Aegilops* species according to (*a*) markers and (*b*) virulence.

ницы, полученных с гексаплоидных видов родов *Triticum* и *Ae. trivialis*, не выявил различий между ними, на что указывают значения индексов генетических расстояний F_{st} (табл. 3) и Nei D (рисунок, *а*). Сходство между коллекциями изолятов с гексаплоидных видов по микросателлитным маркерам было существенно выше, чем по вирулентности. Согласно индексу Nei D (рисунок, *б*) и индексу Φ_{pt} (аналог F_{st} для бинарных матриц в AMOVA, GeneAlex), высоким сходством по вирулентности характеризовались изоляты, обитающие на видах *T. petropavlovskyi* и *T. spelta* ($F_{st} = 0.06$; $p = 0.32$), *T. sphaerococcum* и *T. macha* ($F_{st} = 0.1$; $p = 0.31$), *T. sphaerococcum* и *T. compactum* ($F_{st} = 0.23$; $p = 0.06$), *T. compactum* и *T. macha* ($F_{st} = 0.08$; $p = 0.38$). Большинство образцов этих видов, за исключением *T. spelta*, характеризуются высокой восприимчивостью к бурой ржавчине (Дорофеев и др., 1987).

С помощью двух разных методических подходов выявлено достаточно высокое генетическое разнообразие дербентской популяции *P. triticina*: 16 SSR-генотипов и 18 фенотипов вирулентности. По результатам анализа вирулентности практически на каждом виде (за исключением *T. macha* и *T. compactum*) наблюдали оригинальные фенотипы (см. табл. 1). При SSR-анализе их было значительно меньше (15 и 8 соответственно). Существенный полиморфизм по признаку вирулентности выявлен между изолятами, полученными с нескольких образцов одного вида, например с *T. spelta* (Gultyaeva et al., 2016). SSR-маркеры оказались более нейтральными, на что указывает высокое сходство генотипического состава по SSR-маркерам на разных образцах одного вида и в целом на гексаплоидных видах пшеницы и *Ae. trivialis*. Можно предположить, что это обусловлено генетической близостью видов-хозяев гриба (Митрофанова и др., 2009; Гончаров, 2012).

Более заметные различия между субпопуляциями гриба с гексаплоидных видов пшеницы и *Ae. trivialis* по признаку вирулентности по сравнению с SSR-анализом предопределили слабую корреляцию (коэффициент корреляции $r = 0.17$ по индексу F_{st}; $r = 0.21$ по индексу Nei D) (Gultyaeva et al., 2016).

Использование молекулярных маркеров в исследованиях дербентской популяции *P. triticina*, развивающейся на мягкой пшенице и диких родичах, дополнило имеющиеся сведения о генетической изменчивости гриба. SSR-маркеры и вирулентность в равной степени показали информативность для характеристики внутривидовой изменчивости гриба. Более высокое сходство между изолятами по микросателлитным локусам по сравнению с анализом вирулентности указывает на то, что для мониторинга появления новых агрессивных рас и изучения эффективности *Lr*-генов устойчивости основная информация может быть получена только с использованием признака вирулентности. Молекулярные маркеры актуальны в фундаментальных исследованиях микроэволюции популяций и при оценке коэволюции патогена и хозяина-биотрофа.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Science Foundation, project 14-26-00067.

The authors are grateful to Dr. Abdullaev, Dagestan experimental station of the Vavilov Institute of Plant Breeding for kindly provided brown rust inoculation material.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Balloux F., Lehmann L., de Meeus T. The population genetics of clonal and partially clonal diploids. Genetics. 2003;164:1635-1644.

Berlyand-Kozhevnikov V.M., Dmitriev A.P., Budashkina E.B., Shitova I.T., Reiter V.G. Ustoychivost pshenitsy k buroy rzhavchine (geneticheskoe raznoobrazie populyatsiy griba i rasteniya-khozyaina) [Wheat resistance to leaf rust: The genetic diversity in populations of the fungus and host plant]. Novosibirsk: Nauka Publ., 1978. (in Russian)

Boguslavskiy R.L., Golik O.V. Rod *Aegilops* L. kak geneticheskiy resurs selektsii [The genus *Aegilops* as a genetic resource for breeding]. Kharkov, 2004. (in Russian)

Bolton M.D., Kolmer J.A., Garvin D.F. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. Mol. Plant Pathol. 2008;9(5):563-575. DOI 10.1007/s10681-011-0361-x.

Dmitriev A.P., Mikhailova L.A., Shelomova K.F., Derevyankin A.I. Investigation of the ranges of races and genotypes in the Derbent population of *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. in 1972–1973. Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 1976; 10(4):302-306. (in Russian)

Dorofeev V.F., Udachin R.A., Semenova L.V., Novikova M.V., Gradchaninova O.D., Shitova I.P., Merezhko A.F., Filatenko A.A. Pshenitsy mira [Wheat of the world]. Leningrad: Kolos Publ., 1987. (in Russian)

Duan X., Enjalbert J., Vautrin D., Solignac C., Giraut T. Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia triticina.* Mol. Ecol. Notes. 2003;3:65-67. DOI 10.1046/j.1471-8286.2003.00350.x.

Goncharov N.P. Sravnitelnaya genetika pshenits i ikh sorodichey [Comparative genetics of wheats and related species]. Novosibirsk: Geo Publ., 2012. (in Russian)

Gultyaeva E.I., Aristova M.K., Shaydayuk E.L., Mironenko N.V., Kazartsev I.A., Ahmetova A., Kosman E. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* Erikss. in Russia. Genetika = Genetics (Moscow). 2017a;53(9):1053-1060. DOI 10.7868\S0016675817070037. (in Russian)

Gultyaeva E.I., Baranova O.A., Dmitriev A.P. Virulence and population structure of *Puccinia triticina* in the Russian Federation in 2007. Vestnik zashchity rasteniy = Plant Protection News. 2009;4:333-338. (in Russian)

Gultyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Goncharov N.P., Akhmetova A., Abdullaev K.M., Belousova M.H., Kosman E. Virulence of *Puccinia triticina* on *Triticum* and *Aegilops* species. Australas. Plant Pathol. 2016;45(2):155-163. DOI 10.1007/s13313-016-0395-6.

Gultyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Kazartsev I.A. Population structure of *Puccinia triticina* on tetraploid wheat species. Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 2017б;51(5):299-304. (in Russian)

Gultyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Kazartsev I.A., Aristova M.K. Structure of Russian populations of *Puccinia triticina* Eriks. Vestnik zashchity rasteniy = Plant Protection News. 2015;3(85):5-10. (in Russian)

Halkett F., Simon J.C., Balloux F. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. Trends Ecol. Evol. 2005;20: 194-201. DOI 10.1016/j.tree.2005.01.001.

Justesen A.F., Ridout C.J., Hovmøller M.S. The recent history of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Denmark as revealed by disease incidence and AFLP markers. Plant Pathol. 2002;51:13-23. DOI 10.1046/j.0032-0862.2001.00651.x.

Kolmer J.A., Jin Y., Long D.L. Wheat leaf and stem rust in the United States. Aust. J. Agric. Res. 2007;58:631-638.

Kolmer J.A., Liu J.Q. Virulence and molecular polymorphism in international collections of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina*. Phytopathology. 2000;90(4):427-436. DOI 10.1094/PHYTO.2000.90.4.427.

Kolmer J.A., Liu J.Q., Siem M. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in Canada. Phytopathology. 1995; 85:276-285.

Kolmer J.A., Ordoñez M.E. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central Asia and the Caucasus. Phytopathology. 2007;97:1141-1149. DOI 10.1094/PHYTO-97-9-1141.

Liu M., Rodrigue N., Kolmer J. Population divergence in the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* is correlated with wheat evolution. Heredity. 2014;112:443-453. DOI 10.1038/hdy.2013.123.

Long D.L., Kolmer J.A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Phytopathology. 1989;79:525-529.

Mikhailova L.A. Genetika vzaimootnosheniy vozbuditelya buroy rzhavchiny i pshenitsy. Pod red. akad. RASKhN M.M. Levitina [M.M. Levitin (Ed.). The genetics of the relationships between the brown rust causative agent and wheat]. St.-Petersburg: VIZR Publ., 2006. (in Russian)

Mikhailova L.A. *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* – Wheat leaf (brown) rust. A.N. Afonin, S.L. Greene, N.I. Dzyubenko, A.N. Frolov (Eds.). Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries: Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds. 2008. Available at http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Tritici/index.html. (in Russian)

Mikhailova L.A., Gultyaeva E.I., Mironenko N.V. Methods of study of the population structure of the wheat leaf rust causative agent *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*. Immuno-geneticheskie metody sozdaniya ustoychivykh k vrednym organizmam sortov [Immunogenetic methods of the development of pest-resistant varieties]. St.-Petersburg, 2000. (in Russian)

Mikhaylova L.A., Metreveli T.G. Population structure of *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* on different wheat species. Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 1986; 20:138-142. (in Russian)

Mitrofanova O.P., Strelchenko P.P., Konarev A.V., Balfourier F. Genetic differentiation of hexaploid wheat inferred from analysis of microsatellite loci. Russian Journal of Genetics. 2009;45(11):1351-1559. DOI 10.1134/S102279540911009X. (in Russian)

Mikhaylova L.A., Vasil'ev S.V. Geographic ranges of populations of the wheat leaf rust agent. Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 1985;19(2):158-163. (in Russian)

Ordoñez M.E., Kolmer J.A. Simple sequence repeat diversity of a worldwide collection of *Puccinia triticina* from durum wheat. Phytopathology. 2007;97:574-583. DOI 10.1094/PHYTO-97-5-0574.

Park R.F., Jahoor A., Felsenstein F.G. Population structure of *Puccinia recondita* in Western Europe during 1995 as assessed by variability in pathogenicity and molecular markers. Phytopathology. 2000;148: 169-179. DOI 10.1046/j.1439-0434.2000.00458.x.

Szabo L.S., Kolmer J.A. Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus *Puccinia triticina*. Mol. Ecol. 2007;7:708-710. DOI 10.1111/j.1471-8286.2007.01686.x.

Vavilov N.I. Nauchnye osnovy selektsii pshenitsy [Scientific bases of wheat breeding]. Moscow–Leningrad: Selkhozgiz Publ., 1935. (in Russian)

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):677-685
DOI 10.18699/VJ17.285

Скрининг сортов и гибридов огурца для выявления источников устойчивости к пероноспорозу

Н.Т. Амирханова, А.С. Рсалиев

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Жамбылская область, Казахстан

Пероноспороз (возбудитель – *Pseudoperonospora cubensis* Rostowz) относится к наиболее вредоносным болезням огурца в Казахстане. Одна из причин возрастающей вредоносности *P. cubensis* – высокая изменчивость гриба, приводящая к возникновению новых агрессивных патотипов и, соответственно, к потере устойчивости ряда сортов огурца. Цель исследований – провести иммунологическую оценку сортов и гибридов огурца из 18 стран мира к казахстанской популяции гриба и определить уровень их устойчивости на фоне искусственного заражения, а также выделить стабильные источники устойчивости огурца к болезни. В открытом грунте изучали устойчивость к пероноспорозу 80 образцов огурца казахстанского, узбекистанского, таджикистанского, турецкого, индийского, сербского, российского, украинского, американского, молдавского, германского, нидерландского, итальянского, французского, израильского, китайского, тайваньского и южнокорейского происхождения. Для заражения была использована синтетическая популяция возбудителя пероноспороза огурца. В результате исследований в 2015–2016 гг. среди изученных образцов выделено 29 (36.2 %) сортов и гибридов огурца, проявляющих высокую степень полевой устойчивости к данному патогену. Устойчивыми оказались 9 (11.2 %), среднеустойчивыми – 3 (3.8 %), восприимчивыми – 3 (3.8 %), высоковосприимчивыми – 36 (45.0 %) образцов различного происхождения. Устойчивые образцы сравнительно часто встречались среди материалов Казахстана и Нидерландов. Внедрение и возделывание устойчивых сортов огурца в производстве позволит сократить применение химических средств защиты, получать экологически чистую сельхозпродукцию и избежать загрязнения экосистем.

Ключевые слова: огурцы; пероноспороз; *Pseudoperonospora cubensis*; сорт; гибрид; устойчивость; восприимчивость.

Screening of cucumber varieties and hybrids for selection of downy mildew resistance sources

N.T. Amirkhanova, A.S. Rsaliyev

Research Institute for Biological Safety Problems, Zhambyl region, Kazakhstan

Cucumber downy mildew (causative agent – *Pseudoperonospora cubensis* Rostowz) is one of the most harmful diseases of cucumbers in Kazakhstan. High variability of the fungus leading to the emergence of new aggressive pathotypes and consequently to loss of resistance by some crop cultivars causes ever-growing harmfulness of *P. cubensis*. The goal of the research is to carry out immunological evaluation of cucumber varieties and hybrids from 18 countries to Kazakhstanean population of the fungus and to assess their resistance against the background of artificial inoculation as well as to find stable sources of crop resistance to the disease. Eighty cucumber cultivars from Kazakhstan, Uzbekistan, Tajikistan, Turkey, India, Serbia, Russia, Ukraine, USA, Moldova, Germany, Netherlands, Italy, France, Israel, China, Taiwan and South Korea were tested for their resistance to the downy mildew in the field. Synthetic population of the cucumber downy mildew agent was used for inoculation. The studies in 2015–2016 resulted in the detection of 29 (36.2 %) cucumber varieties and hybrids that demonstrated a high rate of field resistance to the pathogen. Nine (11.2 %) varieties and hybrids appeared to be resistant, three (3.8 %) were moderately resistant, three (3.8 %) were susceptible, and 36 (45.0 %) cultivars of different origin appeared to be highly susceptible. Resistant cultivars were rather frequent among materials from Kazakhstan and Netherlands. Adoption and cultivation of resistant cucumber varieties will allow reducing application of chemical protection means, producing ecologically safe farm produce and avoiding pollution of ecosystems.

Key words: cucumber; downy mildew; *Pseudoperonospora cubensis*; variety; hybrid; resistance; susceptibility.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Амирханова Н.Т., Рсалиев А.С. Скрининг сортов и гибридов огурца для выяления источников устойчивости к пероноспорозу. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):677-685. DOI 10.18699/VJ17.285

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Amirkhanova N.T., Rsaliyev A.S. Screening of cucumber varieties and hybrids for selection of downy mildew resistance sources. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):677-685. DOI 10.18699/VJ17.285 (in Russian)

Received 01.08.2017
Accepted for publication 05.10.2017
© AUTHORS, 2017

e-mail: n.amirkhanova@mail.ru, aralbek@mail.ru

Пероноспороз, или ложная мучнистая роса огурца (возбудитель *Pseudoperonospora cubensis*), – экономически значимое заболевание во всем мире. В настоящее время данный патоген относится к числу опасных, быстро прогрессирующих в основных районах возделывания огурцов. При этом ежегодно эпифитотия пероноспороза угрожает производству огурца более чем в 80 странах мира (Lebeda, Urban, 2004; Colucci et al., 2006; Lebeda, Cohen, 2011). Особенностью болезни является короткий латентный период, высокая частота вторичной инфекции, быстрое распространение (Cohen, 1981). Возбудитель *P. cubensis* обладает высокой агрессивностью и широкой адаптивностью, непрерывно расширяет круг растений-хозяев и паразитирует на широком наборе культурных и диких видов семейства Cucurbitaceae (Lebeda, Urban, 2004; Colucci et al., 2006; Lebeda, Cohen, 2011).

В Казахстане пероноспороз на огурцах впервые был зарегистрирован в июле 1959 г. (Казенас, 1974), но доминирующее положение среди возбудителей болезней огурца патоген занял в республике сравнительно недавно. Начиная с 2000-х гг. наметилась устойчивая тенденция массового развития патогена на огуречных плантациях страны (Кабирова, Нусупова, 2002). Очаги с сильным проявлением болезни отмечены на производственных посевах огурца в 2006–2007 гг. в Алматинской, Жамбылской и Южно-Казахстанской областях, где распространение болезни доходило до 80–90 %, а потери урожая – соответственно до 30 % (Джаймурзина, Амирханова, 2007; Амирханова, 2009). В последние годы эпифитотии болезни часто отмечаются в южных и юго-восточных регионах республики, что говорит о заметном расширении ареала и усилении вредоносности патогена (Кабирова, Нусупова, 2002; Амирханова, 2009; Амирханова и др., 2016).

В Республике Казахстан допущено к использованию 30 сортов огурца для открытого грунта и 32 сорта для защищенного грунта. Большинство из них не обладает достаточной устойчивостью к пероноспорозу, что делает это заболевание особенно опасным в нашей климатической зоне (Кабирова, Нусупова, 2002; Амирханова и др., 2016). Слабо поражаемыми являются всего лишь три сорта (Азат, Мейрам-20, Самал) и несколько гибридов, таких как гибриды первого поколения Альянс Бейо 2640, Соната РЗ, Октопус и Циркон. Характерная особенность этих образцов – не фактическая их устойчивость, а практическая выносливость. Листья их поражаются пероноспорозом, как и у других восприимчивых сортов, но перечисленные сорта отличаются способностью интенсивно наращивать новую молодую листву, удлиняя тем самым вегетацию и период плодоношения (Кабирова, 2005; Айтбаев, 2011). Трудность создания устойчивых сортов и гибридов огурца обусловлена высокой внутрипопуляционной изменчивостью *P. cubensis*, его способностью быстро преодолевать достигаемый селекцией уровень резистентности исходного материала (Lebeda, Cohen, 2011). По этой причине селекционеры подбирают доноров устойчивости к патотипам патогена и создают серию линий какого-либо высокоурожайного сорта, различающихся между собой только по устойчивости к патотипам. Такие сорта обладают достаточно высокой и стабильной устойчивостью (Медведев, 2008; Гринько, 2012; Call et al., 2012).

Меры борьбы с пероноспорозом ограничены, следовательно, применение различных агроприемов, в том числе севооборотов, малоэффективно (Кабирова, 2005; Москвитина и др., 2012). Кроме агротехнических, рекомендации для борьбы с болезнями огурца сводятся в основном к обработке семян протравителями и фунгицидами. Однако при частых дождях резко снижается эффективность фунгицидов контактного действия, что вызывает необходимость повторных опрыскиваний растений, снижает рентабельность культур и дестабилизирует агроценотическую экосистему (Ковбасенко, 1999). Из-за многократного применения фунгицидов в кожуре зеленцов аккумулируются их остаточные количества, вредные для человека (Кабирова, 2005; Москвитина и др., 2012).

Наиболее практичный и экономичный подход в борьбе с пероноспорозом огурца – это использование сортов культуры, устойчивых к болезни. К сожалению, до настоящего времени в Казахстане и других странах Центральной Азии не проводились научные работы по выявлению источников устойчивости огурца к пероноспорозу, несмотря на то что в этих странах существует потенциал для увеличения круглогодичного рыночно-ориентированного производства бахчевых культур и улучшения их потребления для повышения благосостояния людей в регионе (Mavlyanova, 2014). В связи с этим отсутствует генофонд семян болезнеустойчивых сортов огурца, а также слабо организована исследовательская работа по обеспечению биологической безопасности этой важной сельскохозяйственной культуры.

Цель исследований – провести иммунологическую оценку сортов и гибридов огурца из 18 стран мира к казахстанской популяции гриба и определить уровень их устойчивости на фоне искусственного заражения, а также выделить стабильные источники устойчивости огурца к болезни.

Материалы и методы

Материалом для исследований были коммерческие, коллекционные сорта и гибриды огурца различного географического происхождения, полученные из генофонда овощных культур Казахского НИИ картофелеводства и овощеводства. В общей сложности изучено 80 сортов и гибридов данной культуры, в том числе 17 образцов казахстанского происхождения, 3 узбекистанского, 1 таджикистанского, 3 турецкого, 1 индийского, 1 сербского, 22 российского, 1 украинского, 4 американского, 1 молдавского, 1 германского, 14 нидерландского, 1 итальянского, 1 французского, 2 израильского, 3 китайского, 2 тайваньского и 2 южнокорейского.

Для заражения растений использовали синтетическую популяцию патогена, представляющую собой смесь из пяти патотипов возбудителя *P. cubensis* (11.15.14, 15.13.12, 11.18.10, 13.13.4 и 5.0.0). Использованные патотипы *P. cubensis* различаются между собой по вирулентности к сортам-дифференциаторам тыквенных культур (Lebeda, Widrlechner, 2003) и часто встречаются в районах Жамбылской области. Характеристика патотипов *P. cubensis* приведена в табл. 1.

Исследования проводили на опытном поле НИИ проблем биологической безопасности (Жамбылская область) в 2015–2016 гг. Высевали по одному погонному метру и по

Table 1. Virulence of *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes

Pathotype	Compatibility reaction on differential cucurbits												VF
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
11.15.14	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	10
15.13.12	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	9
11.18.10	+	+	–	+	–	+	+	+	–	+	–	+	8
13.13.4	+	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	–	7
5.0.0	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2

Cucurbits: 1, *Cucumis sativus*; 2, *Cucumis melo* subsp. *melo*; 3, *Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *conomon*; 4, *Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*; 5, *Cucurbita pepo* subsp. *pepo*; 6, *Cucurbita pepo* subsp. *texana*; 7, *Cucurbita fraternal*; 8, *Cucurbita maxima*; 9, *Citrullus lanatus*; 10, *Benincasa hispida*; 11, *Luffa cylindrical*; 12, *Lagenaria siceraria*. Compatibility reactions: +, compatibility/virulence; –, imcompatibility/avirulence of *P. cubensis* accessions on differential cucurbit genotypes; VF, virulence factor, reflecting the number of compatibility reactions with the panel of differential host genotypes.

Table 2. Scoring of cucumber response to infection with the downy mildew agent according to (Jenkins, Wehner, 1983)

Score	Percentage of damage	Symptoms
0	0	No damage
1	0–3	Occasional small chlorotic spots
2	3–6	Occasional small spots on the leaf surface
3	6–12	Few small spots on leaves
4	12–25	Several medium-size spots covering up to 25 % of the leaf surface
5	25–50	Several distinct spots covering 26–50 % of the leaf surface
6	50–75	Multiple necrotic spots cover 51 to 75 % of the leaf surface
7	75–87	Large coalescent spots cover over 75 % of the leaf surface
8	87–100	Large coalescent spots cover the entire leaf surface showing pronounced sporulation
9	100	Death of the plant

три повторности каждого изучаемого образца. Для инокуляции использовали споровый материал, полученный из отобранных патотипов *P. cubensis*, инкубированных в климатической камере (Weisstechnik, Германия) по методу (Lebeda, Urban, 2010). Инокуляцию изучаемых сортов и гибридов огурца суспензией с концентрацией 10^5 конидий/мл с добавлением ПАВ Твин 80 осуществляли в фазе начала цветения растений. Для создания условий высокой влажности (95–100 %) растения после заражения на 48 ч закрывали пленкой и слегка открывали в дневное время (Литвинов, 2011).

После проявления болезни в течение вегетации растений проводили иммунологическую оценку степени и типа устойчивости растений (в динамике, не менее четырех учетов) по общепринятой в фитопатологии методике (Lebeda, Urban, 2010; Литвинов, 2011). Устойчивость оценивали по 10-балльной шкале (Jenkins, Wehner, 1983), отмечая тип поражения в баллах (табл. 2).

В полевых условиях основным критерием оценки устойчивости сортов и гибридов огурца к пероноспорозу является площадь под кривой развития болезни (ПКРБ). Ее расчет проводили по методу (Wilcoxson et al., 1975):

$$\text{ПКРБ} = \sum_{i=1}^{n}[(Y_{i+1}+Y_i)/2][X_{i+1}-X_i],$$

где ПКРБ – площадь под кривой развития болезни, усл. ед.; Y_{i+1} – интенсивность развития болезни на момент первого учета, %; Y_i – интенсивность развития болезни на момент последнего учета, %; X_{i+1} – количество дней между вторым и первым учетом; X_i – количество дней между последним и предпоследним учетом; n – количество учетов.

Table 3. Grades of cucumber accession resistance according to the resistance index

Mean RI	Resistance grade
0.2–0.4	Highly resistant (HR)
0.5–0.9	Resistant (R)
1.0–1.3	Medium-resistant (MR)
1.4–1.9	Susceptible (S)
2.0–7.0	Highly susceptible (HS)

Зная значения площади под кривой развития болезни образцов, находили относительные значения индекса устойчивости к болезни (ИУ) (табл. 3)

$$\text{ИУ} = \frac{\text{ПКРБ изучаемого сорта}}{\text{общее кол-во изученных сортов}} \times 100.$$

Анализ данных проводили с помощью пакетов программы GraphPadPrism 6 (GraphPad Software, Inc., США).

Table 4. Characterization of highly resistant (HR) cucumber varieties and hybrids in the field (averaged over 2015–2016)

Accession	Origin	DP, %	IS	AUDPC	RI	RG
Azat	Kazakhstan	3.0	1.0	105.0	0.2	HR
Altay	Russia	3.0	1.0	135.0	0.3	HR
Anushka F4	Kazakhstan	5.0	1.0	110.0	0.2	HR
Anushka F5	»	5.0	1.0	145.0	0.3	HR
Anushka F6	»	4.0	1.0	120.0	0.3	HR
Zhiger	»	4.0	1.0	145.0	0.3	HR
Rosinka	Russia	2.0	1.0	135.0	0.3	HR
Meyram 20	Kazakhstan	3.0	1.0	130.0	0.3	HR
Semirechenskiy	»	4.0	1.0	110.0	0.2	HR
Medeu	»	3.0	1.0	110.0	0.2	HR
Parad	Russia	5.0	1.0	195.0	0.4	HR
Nimbus H-1262	Moldova	4.0	2.0	160.0	0.4	HR
Libella F1	Germany	3.0	2.0	110.0	0.2	HR
Dolibor F1	Netherlands	3.0	7.0	100.0	0.2	HR
Donja F1	»	2.0	7.0	120.0	0.3	HR
Claudia F1	»	3.0	6.0	145.0	0.3	HR
Nadine F1	»	4.0	9.0	170.0	0.4	HR
Santana F1	»	2.0	1.0	120.0	0.3	HR
Atlantis F1	»	3.0	1.0	135.0	0.3	HR
Alert F1	»	3.0	1.0	115.0	0.2	HR
Alvin F1	»	2.0	1.0	105.0	0.2	HR
Alstar F1	»	5.0	1.0	140.0	0.3	HR
Danish pickling	»	4.0	1.0	120.0	0.3	HR
Bush champion	United States	2.0	1.0	85.0	0.2	HR
Calypso F1	»	1.0	1.0	85.0	0.2	HR
Camanon Wahaslihe	»	5.0	1.0	145.0	0.3	HR
Parker	»	5.0	1.0	145.0	0.3	HR
607 F1	Turkey	5.0	1.0	140.0	0.3	HR
Natsufushinari	China	4.0	1.0	135.0	0.3	HR

Hereafter: DP, disease progress; IS, infection score; AUDPC, area under disease progress curve; RI, resistance index; RG, resistance grade.

Table 5. Characterization of resistant (R) and medium-resistant (MR) cucumber varieties and hybrids in the field (averaged over 2015–2016)

Accession	Origin	DP, %	IS	AUDPC	RI	RG
Anka	Russia	11.0	2.0	260.0	0.6	R
Vektor	»	14.0	2.0	295.0	0.7	R
Serpantin	»	17.0	3.0	360.0	0.9	R
Darina F4	Kazakhstan	31.0	5.0	525.0	1.3	MR
Levina F4	»	14.0	2.0	245.0	0.6	R
Kobus	Russia	15.0	3.0	300.0	0.7	R
Dekan	»	18.0	3.0	300.0	0.7	R
Feniks	»	20.0	3.0	375.0	0.9	R
Ajax	Netherlands	10.0	2.0	225.0	0.5	R
Darina F1	»	33.0	5.0	550.0	1.3	MR
Dinzosn	China	15.0	3.0	300.0	0.7	R
Seoul-1	South Korea	25.0	4.0	500.0	1.2	MR

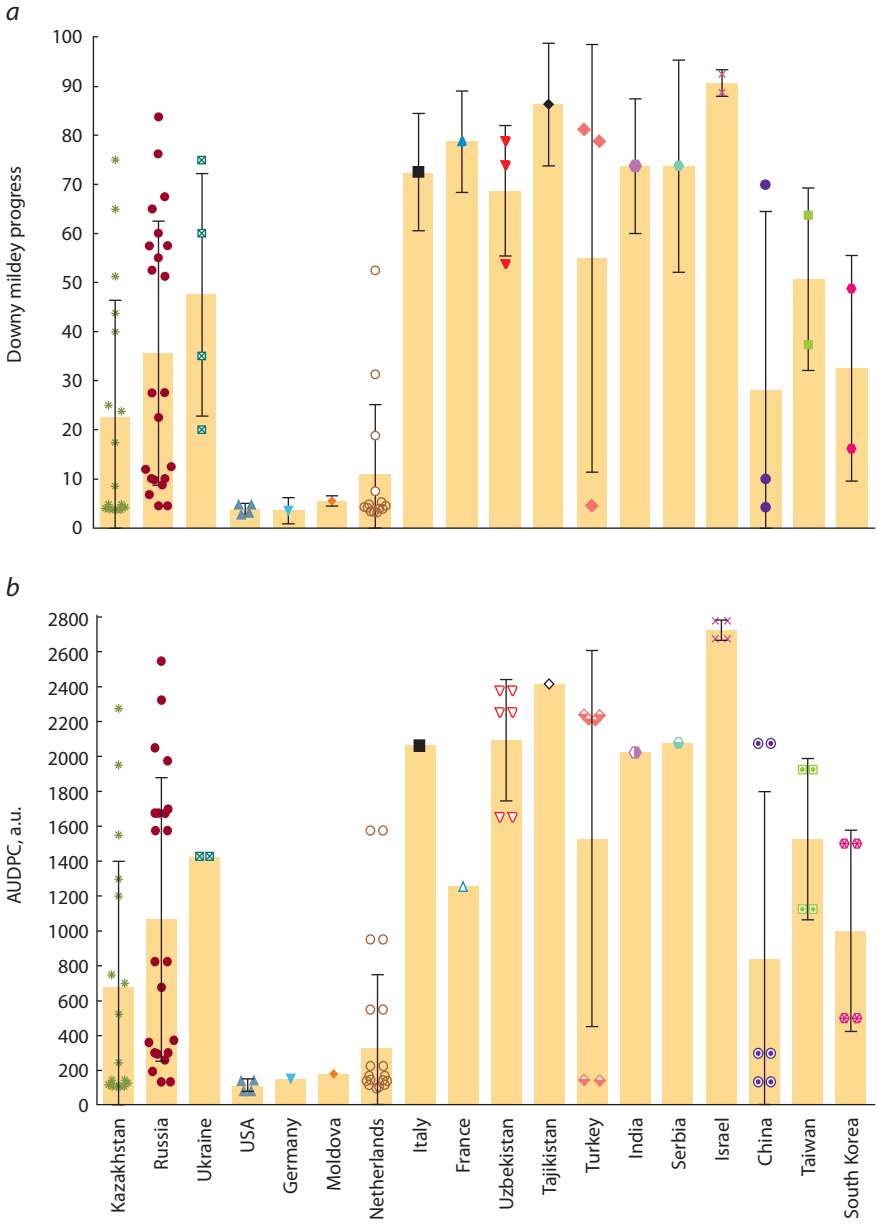
Результаты

Проведенный нами в 2015–2016 гг. скрининг 80 образцов огурца из 18 стран мира по устойчивости к возбудителю *P. cubensis* не выявил образцов, иммунных к данному патогену. Одним из показателей, позволяющих классифицировать сорта по уровню устойчивости к болезни, является индекс устойчивости. Между исследованными образцами наблюдался значительный полиморфизм по индексу устойчивости, который варьировал от 0.2 до 6.9 (табл. 4–7).

В ходе исследований были выделены 29 образцов огурца, которые на фоне искусственного заражения воз-

Table 6. Characterization of susceptible (S) and highly susceptible (HS) cucumber varieties and hybrids in the field (averaged over 2015–2016)

Accession	Origin	DP, %	IS	AUDPC	RI	RG
Egalite	Kazakhstan	55.0	6.0	700.0	1.7	S
Kapel'ka	Russia	70.0	7.0	825.0	2.0	HS
Kudesnik	»	50.0	6.0	675.0	1.6	S
Volgodonskiy	»	70.0	7.0	825.0	2.0	HS
Kalisto	Kazakhstan	86.0	8.0	1300.0	3.2	HS
Shil'de	»	82.0	8.0	1200.0	3.0	HS
Saylau	»	85.0	8.0	1550.0	3.8	HS
Manul F4	»	58.0	6.0	750.0	1.8	S
Tanik F1	Russia	85.0	8.0	1675.0	4.1	HS
Svetlyachok	»	80.0	8.0	1575.0	3.9	HS
Orken	Kazakhstan	95.0	9.0	2275.0	5.6	HS
Nezhinhskiy local	Ukraine	82.0	8.0	1425.0	3.5	HS
Krepysh F1	Russia	85.0	8.0	1675.0	4.1	HS
L-138	»	83.0	8.0	1575.0	3.9	HS
Germes	Kazakhstan	90.0	8.0	1950.0	4.8	HS
Konkurent	Russia	100.0	9.0	2050.0	5.1	HS
Kustovoy	»	100.0	9.0	2325.0	5.8	HS
Nadezhnyy	»	88.0	8.0	1700.0	4.2	HS
Aprel'skiy F1	»	100.0	9.0	2550.0	6.3	HS
Sentyabr'skiy	»	86.0	8.0	1675.0	4.1	HS
Dalnevostochnyy 27	»	90.0	8.0	1975.0	4.9	HS
Merenga	Netherlands	75.0	7.0	950.0	2.3	HS
Masha	»	85.0	8.0	1575.0	3.9	HS
Piccolo di Parigi	Italy	90.0	9.0	2175.0	5.4	HS
Paris cornet	France	95.0	9.0	2250.0	5.8	HS
Margelanskiy 822	Uzbekistan	100.0	9.0	2375.0	5.9	HS
Zilyal	»	87.0	8.0	1650.0	4.1	HS
Navruz	»	98.0	9.0	2250.0	5.6	HS
Tadzhikskiy early	Tajikistan	100.0	9.0	2600.0	6.5	HS
Girdap F1	Turkey	100.0	9.0	2625.0	6.5	HS
Nefes F1	»	100.0	9.0	2575.0	6.4	HS
Indian local	India	95.0	9.0	2200.0	5.5	HS
Dugi zeleni	Serbia	96.0	9.0	2250.0	5.6	HS
Gurail 213-33	Israel	100.0	9.0	2775.0	6.9	HS
ЗБ-33 F1	»	100.0	9.0	2675.0	6.6	HS
Chinese local	China	95.0	9.0	2075.0	5.1	HS
C-01	Taiwan	90.0	8.0	1925.0	4.8	HS
C-02	»	78.0	7.0	1125.0	2.8	HS
Seoul-2	South Korea	82.0	8.0	1500.0	3.7	HS



Mean values of *Pseudoperonospora cubensis* progress (*a*) and AUDPC (*b*) on cucumbers from 18 countries.

будителем пероноспороза демонстрировали высокую устойчивость. У этих образцов поражение варьировало от 3 до 5 % с типом поражения 1 балл. Индекс устойчивости (ИУ) не превышал 0.2–0.4 и был в 8 раз ниже, чем у высоковосприимчивых образцов. К ним относятся образцы казахстанского происхождения Азат, Анушка F4, Анушка F5, Анушка F6, Жигер, Мейрам 20, Семиреченский, Медеу и образцы зарубежного происхождения: Алтай, Росинка, Парад (Россия); Bush champion, Calypso F1, Camanon Wahaslihe, Parker (США); 607 F1 (Турция); Nimbus H-1262 (Молдова); Libella F1 (Германия); Dolibor F1, Donja F1, Claudia F1, Nadine F1, Santana F1, Atlantis F1, Alert F1, Alvin F1, Alstar F1, Danish pickling (Нидерланды) и Natsufushinari (Китай). Характеристика этих сортов и гибридов представлена в табл. 4.

Иммунологической реакцией «устойчивость» (У) обладали образцы, у которых развитие болезни не превышало 6–8 %, тип инфекции составлял 2–3 балла, а индекс устойчивости был в пределах 0.6–0.9 ед. К таким образцам относятся: Левина F4 (Казахстан); Анка, Вектор, Серпантин, Кобус, Декан и Феникс (Россия); Ajax (Нидерланды) и Dinzosn (Китай).

Средняя устойчивость (СУ) характерна только для трех образцов: Дарина F4 (Казахстан), Darina F1 (Нидерланды) и Seoul-1 (Южная Корея). Их индекс устойчивости не превышает 1.2–1.3 ед., развитие болезни в период вегетации доходило до 33.0 %, а тип инфекции составил 4–5 баллов (табл. 5).

Восприимчивыми (В) оказались образцы Эгалите, Кудесник, Манул F4 казахстанского и российского происхождения. Развитие болезни на них варьировало от 50 до 58 % с типом инфекции 6 баллов, индекс устойчивости был в пределах 1.6–1.8.

Среди изученных образцов огурца значительное количество проявляло высокую степень восприимчивости к патогену. Тип инфекции в основном составлял 7–9 баллов, степень поражения менялась от 70 до 100 %, соответственно индекс устойчивости был от 2.0 до 6.9 ед. К таким высоковосприимчивым (ВВ) образцам относятся: Калисто, Шильде, Сайлау, Оркен, Гермес (Казахстан); Капелька, Волгодонский, Таник F1, Светлячок, Крепыш F1, Л-138, Конкурент, Кустовой, Надежный, Апрельский F1 Сентябрьский, Дальневосточный 27 (Россия); Нежинский местный (Украина); Merenga и Masha (Нидерланды); Piccolo di Parigi (Италия); Paris cornet (Франция); Маргеланский 822, Зилял, Навруз (Узбекистан); Таджикский ранний (Таджикистан); Girdap F1 и Nefes F1 (Турция); Indian local (Индия); Dugi zeleni (Сербия); Gurail 213-33 и ЗБ-33 F1 (Израиль); Chinese local (Китай); С-01 и С-02 (Тайвань) и Seoul-2 (Южная Корея) (табл. 6).

Скрининг 80 сортов и гибридов огурца из разных стран показал, что между изучаемыми образцами существуют значимые различия по поражаемости пероноспорозом и ПКРБ (см. рисунок).

У большинства сортов и гибридов огурца российского происхождения отмечена высокая восприимчивость (54.6 %) к болезни (табл. 7). Высокую и умеренную устойчивость проявили 13.6 и 27.3 % образцов, а восприимчивость – 4.5 % соответственно. В значительной степени поражались пероноспорозом казахстанские сорта и гибриды (29.5 %); высокую и уме-

Table 7. Prevalence of downy mildew-resistant and susceptible cucumber genotypes of various origins in Kazakhstan

Origin	Number of accessions	Percentages of cucumber accessions with certain resistance/susceptibility grades				
		HR	R	MR	S	HS
Kazakhstan	17	47.0	5.9	5.9	11.7	29.5
Russia	22	13.6	27.3	0.0	4.5	54.6
Ukraine	1	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
Moldova	1	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Germany	1	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Netherlands	14	69.2	7.7	7.7	0.0	15.4
Italy	1	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
France	1	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
United States	4	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Uzbekistan	3	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
Tajikistan	1	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
Turkey	3	33.4	0.0	0.0	0.0	66.6
India	1	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
Serbia	1	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
Israel	2	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
China	3	33.3	33.3	0.0	0.0	33.4
Taiwan	2	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
South Korea	2	0.0	0.0	50.0	0.0	50.0
Total	80	36.2	11.2	3.8	3.8	45.0

ренную устойчивость демонстрировали 47.0 и 5.9 % образцов из Казахстана. Среди образцов огурца из Турции и Китая высокой устойчивостью обладали 33.4 и 33.3 % сортов и гибридов соответственно. Высоковосприимчивыми в условиях Казахстана были 66.6 и 33.4 % генотипов огурца.

Также выделены образцы огурцов с высоким уровнем устойчивости и восприимчивости (100 %) к казахстанским патотипам *P. cubensis*. Устойчивыми оказались образцы из Молдовы, Германии, США, а высокой восприимчивостью обладали образцы из Украины, Италии, Франции, Узбекистана, Таджикистана, Индии, Сербии, Израиля и Тайваня (см. табл. 7).

Среди изученных образцов выделено 29 (36.2 %) сортов и гибридов огурца различного происхождения, проявляющих высокую степень полевой устойчивости к данному патогену. Устойчивыми оказались 9 (11.2 %), среднеустойчивыми – 3 (3.8 %), восприимчивыми – 3 (3.8 %), высоковосприимчивыми – 45.0 % образцов, т. е. 36 сортов и гибридов.

Обсуждение

Результаты двухлетнего изучения 80 сортов и гибридов огурца по степени устойчивости к пероноспорозу в условиях Казахстана показали, что сорта и гибриды огурца из 18 стран мира характеризовались от высокой устойчивости до высокой восприимчивости. В тестируемой нами коллекции иммунные к патогену образцы не выявлены. Аналогичные результаты были получены при изучении 260 генотипов огурца из мировой коллекции огурца ВИР в условиях малообъемной гидропоники (Гринько, 2012). Отсутствие в тестируемой коллекции иммунных к *P. cubensis* генотипов соответствует данным об усилении формообразовательных процессов и появлении новых вирулентных патотипов в популяциях патогена (Lebeda, Cohen, 2011; Гринько, 2012).

При изучении сортов и гибридов огурца нами выявлено 29 высокоустойчивых образцов разного происхождения (см. табл. 4). Отдельные сорта и гибриды характеризовались устойчивостью к болезни: Левина F4 (Казахстан); Анка, Вектор, Серпантин, Кобус, Декан и Феникс (Россия); Ajax (Нидерланды) и Dinzosn (Китай). Кроме того, в предыдущих исследованиях нами установлено, что многие казахстанские физиологические расы *P. cubensis* авирулентны к отдельным изученным генотипам огурца, таким как Феникс, Natsufushinari, Calypso F1, Азат, Медеу и Мейрам 20 (Rsaliyev et al., 2017). Сорт Феникс проявляет устойчивость не только в Казахстане, но и в России (Витченко, Рыбалко, 1996) и Молдове (Берлин и др., 2008). Ранее было отмечено, что на Крымской опытно-селекционной станции относительной устойчивостью к пероноспорозу характеризуются российские сорта Конкурент, Парад, и Дальневосточный 27 (Медведев, Медведева, 1985). В наших экспериментах сорта Конкурент и Дальневосточный 27 оказались высоковосприимчивыми к болезни. Эти данные свидетельствуют о том, что вирулентность возбудителя ложной мучнистой росы огурца в различных эколого-географических регионах сильно различается. При этом в работе (Shetty et al., 2002) установлено, что европейские и североамериканские патотипы

P. cubensis близкородственны, но сильно отличаются от азиатских патотипов. Согласно рекомендации авторов, перед допуском к производству в Азии новых устойчивых к пероноспорозу сортов и гибридов огурца, выведенных в Европе и Америке, необходимо проводить испытание на устойчивость к азиатским расам возбудителя. Европейские патотипы (Lebeda, Gadasova, 2002; Lebeda, Urban, 2010) существенно отличаются от патотипов *P. cubensis,* выявленных ранее в Японии, Израиле и США (Thomas et al., 1987; Cohen et al., 2003).

Выявление и создание сортов и гибридов огурца с устойчивостью к пероноспорозу является актуальным во всем мире (Обручков и др., 2016) и проводится в США (Staub et al., 2008; Call et al., 2012), Японии (Ezuka, Komada, 1974), Польше (Doruchowski, Lakowska-Ryk, 2000), Белоруссии (Налобова, Хлебородов, 2011) и других странах мира, где возделывается данная культура. Устойчивость растений формируется в районах, где условия наиболее благоприятны для развития соответствующих патогенов. По литературным данным, высокоустойчивые сортообразцы в основном встречаются среди сортов Китая, Японии и США. Максимальное развитие болезни на этих образцах отмечается в пределах 5–20 %. Достаточно высокую устойчивость демонстрируют и сорта из Голландии (Берлин и др., 2008). В наших исследованиях высокая устойчивость наблюдалась у большинства казахстанских и голландских (Нидерланды) сортов и гибридов. Образцы из США и Китая также показали высокую устойчивость к нашим популяциям гриба, что подтверждается литературными данными (Берлин и др., 2008). Эти сорта и гибриды можно рекомендовать для совершенствования сортимента огурца в производственных и фермерских хозяйствах юго-востока Казахстана.

Среди изученных образцов высокой восприимчивостью отличались 36 сортов и гибридов огурца. Максимальное развитие болезни доходило до 100 % с типом инфекции 7–9 баллов. К этой группе относятся в основном сорта и гибриды Казахстана: Калисто, Шильде, Сайлау, Оркен, Гермес; некоторые сорта и гибриды зарубежного происхождения: Капелька, Волгодонский, Таник F1, Светлячок, Крепыш F1, Л-138, Конкурент, Кустовой, Надежный, Апрельский F1, Сентябрьский, Дальневосточный 27 (Россия); Нежинский местный (Украина); Merenga и Masha (Нидерланды); Piccolo di Parigi (Италия); Paris cornet (Франция); Маргеланский 822, Зилял и Навруз (Узбекистан); Таджикский ранний (Таджикистан); Girdap F1 и Nefes F1 (Турция); Indian local (Индия); Dugi zeleni (Сербия); Gurail 213-33 и ЗБ-33 F1 (Израиль); Chinese local (Китай); С-01 и С-02 (Тайвань) и Seoul-2 (Южная Корея). Следовательно, эти сорта и гибриды не могут быть использованы в селекционных работах и в производстве.

Таким образом, на основании проведенных исследований для практической селекции на устойчивость к пероноспорозу в условиях Казахстана и в соседних регионах рекомендуются следующие сорта и гибриды огурца: Азат, Анушка F4, Анушка F5, Анушка F6, Жигер, Мейрам 20, Медеу, Семиреченский (Казахстан); Алтай, Росинка, Парад (Россия); Bush champion, Calypso F1, Camanon Wahaslihe, Parker (США); 607 F1 (Турция); Nimbus H-1262 (Молдова); Libella F1 (Германия); Dolibor F1, Donja F1, Claudia F1, Nadine F1, Santana F1, Atlantis F1, Alert F1, Alvin F1, Alstar F1, Danish pickling (Нидерланды) и Natsufushinari (Китай).

Acknowledgments

This study was supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Kazakhstan, project 1134/GF4, 2015–2017. The authors are grateful to M. Baigutov and A. Asrubaeva, Research Institute for Biological Safety Problems, for assistance in studies.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Aitbayev T.Ye. Vrediteli i bolezni ogurtsa v zashchishchennom grunte i mery bor'by s nimi [Pests and diseases of indoor-grown cucumber and their control]. Astana: AgroInform Publ., 2011;10:2-4. (in Russian)

Amirkhanova N.T. Progress dynamics of cucumber downy mildew. Issledovaniya, rezultaty = Research, Results. 2009;1:96-99. (in Russian)

Amirkhanova N.T., Nusupova A.O., Rsaliyev A.S. The phytosanitary situation in cucumber plantations in southeastern Kazakhstan. Izvestiya NAN RK. Seriya Biologiya i meditsina = News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biological and medical. 2016;4(316):29-34. (in Russian)

Berlin O.S., Nalobova V.L., Gorokhovskiy V.F. The combination ability of promising field cucumber lines with regard to downy mildew resistance. Ovoshchevodstvo = Vegetable Growing. 2008;13:119-124. (in Russian)

Call A.D., Criswell A.D., Wehner T.C., Klosinska U., Kozik E.U. Screening cucumber for resistance to downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. and Curt.) Rostov. Crop Sci. 2012;52:577-592.

Cohen Y. Downy mildew of cucurbits. The Downy Mildews. L.: Acad. Press, 1981;341-354.

Cohen Y., Meron I., Mor N., Zuriel S. A new pathotype of *Pseudoperonospora cubensis* causing downy mildew in cucurbits in Israel. Phytoparasitica. 2003;31:458-466.

Colucci S.J., Wehner T.C., Holmes G.J. The downy mildew epidemic of 2004 and 2005 in the eastern United States. Cucurbitaceae 2006. Asheville, North Carolina, USA, 17–21 Sept. 2006;403-411.

Djaimurzina A.A., Amirkhanova N.T. Cucumber downy mildew and fungicide effectiveness in the Almaty region. Materialy konferentsii "Povyshenie konkurentosposobnosti sel'skokhozyaystvennogo proizvodstva Kazakhstana: problemy, puti resheniya" [Proc. of the Conf. on Improving the Competitiveness of Farm Production in Kazakhstan: Problems and Ways to their Solutions]. Almaty, 2007;58-59. (in Russian)

Doruchowski R.W., Lakowska-Ryk E. F1 hybrid pickling cucumbers developed for increased yield, earliness and resistance to downy mildew. Acta Horticulturae. 2000;510:45-46.

Ezuka A., Komada H. Varietal difference in resistance of cucumber to downy mildew. Bull. Tokai-Kinki Nat. Agric. Exp. Stat. 1974;27: 42-45.

Grin'ko N.N. Screening of the World Genetic Resources Collection at the Vavilov All-Russia Plant-Breeding Institute aimed at the selection of cucumber genotypes resistant to *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostowz. Ovoshchi Rossii = Vegetables of Russia. 2012;1:50-53. (in Russian)

Jenkins S.F., Wehner T.C. A system for the measurement of foliar diseases of Cucumber. Cucurbit Genetics Cooperative Rep. 1983; 6(10-12):5.

Kabirova L.V. The genetic view of cucumber breeding. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Sovremen-

nye problemy zashchity i karantina rasteniy" [Materials of Int. Research & Practice Conf. "Current Problems in Plant Protection and Quarantine"]. Almaty: Aleyron Publ., 2005;308-313. (in Russian)

Kabirova L.V., Nusupova A.O. Cucumber breeding for early ripeness and downy mildew resistance under field conditions. Vestnik selskokhozyaystvennoy nauki Kazakhstana = Herald of the Agricultural Science of Kazakhstan. 2002;3:6-18. (in Russian)

Kazenas L.D. Bolezni selskokhozyaystvennykh rasteniy Kazakhstana [Diseases of farm plants in Kazakhstan]. Almaty: Kaynar Publ., 1974;241-244. (in Russian)

Kovbasenko V.M. Systemic preparations for protection of vegetable crops against diseases. Ukraine. Zakhist roslin = Plant Protection. 1999;10:26. (in Russian)

Lebeda A., Cohen Y. Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) – biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. Eur. J. Plant Pathol. 2011;129:157-192.

Lebeda A., Gadasova V. Pathogenic variation of *Pseudoperonospora cubensis* in the Czech Republic and some other European countries. Acta Horticulturae. 2002;588:137-141.

Lebeda A., Urban J. Disease impact and pathogenicity variation in Czech populations of *Pseudoperonospora cubensis.* Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Olomouc, Czech Republic, 2004;267-273.

Lebeda A., Urban J. Screening for resistance to cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*). Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Disease. Vienna, Austria, 2010;285-294.

Lebeda A., Widrlechner M.P. A set of Cucurbitaceae taxa for differentiation of *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes. J. Plant Dis. Prot. 2003;110:337-349.

Litvinov S.S. Metodika polevogo opyta v ovoshchevodstve [Methods of field experiments in vegetable growing]. Moscow: Vserossiyskiy NII Ovoshchevodstva Publ., 2011;6-614. (in Russian)

Mavlyanova R. Vegetable research in Central Asia and the Caucasus to enhance nutritional security and livelihoods. Acta Horticulturae. 2014;1033:39-45.

Medvedev A.V. Results and prospects of cucumber breeding in the Southern Federal District of Russia. Sbornik statey mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Sovremennye tendentsii v selektsii i semenovodstve ovoshchnykh kultur. Traditsii i perspektivy" [Proceedings of the international conference "Current trends in vegetable breeding and seed production: traditions and prospects"]. Moscow, 2008;2:194-197. (in Russian)

Medvedev A.V., Medvedeva N.I. Sources of cucumber resistance to downy mildew and their use in cucumber breeding. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1985;97:36-39. (in Russian)

Moskvitina K.K., Shakhmedov Sh.Sh., Arslanova R.A. Bioecological characteristics of cucumber downy mildew manifestation under indoor conditions in the Astrakhan region. Estestvennye nauki = Natural Sciences. 2012;2(39):93-97. (in Russian)

Nalobova V.L., Khleborodov A.Ya. Cucumber varieties and hybrids of Belarusian breeding for outdoor growing. Vestnik ovoshchevoda = Vegetable Growers' Reporter. 2011;2:6-8. (in Russian)

Obruchkov A.Yu., Mokryanskaya T.I., Gorokhovskiy V.F. Breeding of coarse cucumber hybrids for downy mildew resistance. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii [Proceedings of the International Scientific and Practical Conference]. Kiev, 2016;73-75.

Rsaliyev A., Amirkhanova N., Pakhratdinova Z. Virulence of Kazakhstan races *Pseudoperonospora cubensis* Rostowz on cucumber varieties and hybrids. III Int. Conf. "Genofond and Plant Breeding" dedicated to the 130th anniversary of N.I. Vavilov. Novosibirsk, 2017;57-58.

Shetty N.V., Wehner T.C., Thomas C.E., Doruchowski R.W., Shetty V.K.P. Evidence for downy mildew races in cucumber tested in Asia, Europe, and North America. Scientia Horticulturae. 2002;94:231-239.

Staub J.E., Robbins M.D., Wehner T.C. Cucumber. In: J. Prohens, F. Nuez (Eds.). Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae. N. Y.: Springer, 2008;241-282.

Thomas C.E., Inaba T., Cohen Y. Physiological specialization in *Pseudoperonospora cubensis.* Phytopathology. 1987;77:1621-1624.

Vitchenko E.F., Rybalko A.A. Resistance of the original cucumber material to downy mildew and its usage in cucumber breeding. Selektsiya i semenovodstvo selskokhozyaistvennykh kultur [Crop Breeding and Seed Industry]. Novosibirsk, 1996;62-64. (in Russian)

Wilcoxson R.D., Skovmand B., Atif A.H. Evaluation of wheat cultivars for ability to retard development of stem rust. Annu. Appl. Biol. 1975;275-281.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):686-693
DOI 10.18699/VJ17.286

Влияние лигнификации и минерализации тканей листа на устойчивость к бурой ржавчине растений мягкой пшеницы

А.А. Коновалов[1] ✉, И.К. Шундрина[2, 4], Е.В. Карпова[2, 4], И.В. Ельцов[4], Е.А. Орлова[3], Н.П. Гончаров[1, 5]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[3] Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирская область, Новосибирский район, пос. Краснообск, Россия
[4] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[5] Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

Один из ключевых ферментов ароматического обмена растений, CAD (cinnamil alcoholdehydrogenase – дегидрогеназа коричного спирта; EC 1.1.1.195), у ряда видов растений оказывает влияние на содержание ароматических веществ и на защитные свойства тканей от грибных инфекций. При изучении коллекции сортообразцов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., полиморфных по спектрам CAD, обнаружены различия по степени поражения листовой ржавчиной (возбудитель *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*). Целью работы было изучение особенностей структуры и химического состава тканей листа, способствующих повышенной устойчивости. На фитопатологическом участке СибНИИРС на фоне искусственного заражения спорами бурой листовой ржавчины два образца яровой мягкой пшеницы 3-13-15-4 и 3-4-14-3 поражались соответственно на 1–5 и на 30 %. У этих контрастных по устойчивости образцов был проведен анализ содержания различных веществ в тканях листьев. На поверхности листа более устойчивого образца наблюдаются крупные бляшки, состоящие из минеральных веществ. В золе листьев и золе лигнина также обнаружены отличия по содержанию ряда минеральных элементов. Общее содержание лигнина на сухую массу листа различалось незначительно (14.2 и 12.3 % соответственно), однако есть различия по химическому составу лигнина. Можно предположить, что выявленные различия имеют отношение к разной степени поражения растений листовой ржавчиной. Следовательно, эти показатели можно использовать для диагностики потенциальной устойчивости сортообразцов пшеницы к грибной инфекции.

Ключевые слова: мягкая пшеница; бурая ржавчина; лигнификация; минерализация; спектроскопия; двумерный магнитный резонанс.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Коновалов А.А., Шундрина И.К., Карпова Е.В., Ельцов И.В., Орлова Е.А., Гончаров Н.П. Влияние лигнификации и минерализации тканей листа на устойчивость к бурой ржавчине растений мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):686-693. DOI 10.18699/VJ17.286

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Konovalov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V., Eltsov I.V., Orlova E.A., Goncharov N.P. Influence of a lignification and mineralization of leaf tissues on resistance to a brown rust in common wheat plants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):686-693. DOI 10.18699/VJ17.286 (in Russian)

Received 14.01.2017
Accepted for publication 05.10.2017
© AUTHORS, 2017

Influence of a lignification and mineralization of leaf tissues on resistance to a brown rust in common wheat plants

A.A. Konovalov[1] ✉, I.K. Shundrina[2, 4], E.V. Karpova[2, 4], I.V. Eltsov[4], E.A. Orlova[3], N.P. Goncharov[1, 5]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia
[3] Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia
[4] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[5] Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Aromatic substances in plant tissues can have protective effect against fungal diseases. One of the key enzymes in aromatic metabolism of plants, CAD (cinnamyl-alcohol dehydrogenase, dehydrogenase of cinnamyl alcohol; EC 1.1.1.195), at a number of species of plants exerts impact on the content of aromatic substances and on protective properties of tissues from fungal infections. When studying a collection of cultivars of bread wheat *Triticum aestivum* L., polymorphic on CAD, distinctions on extent of defeat are found by brown rust (with *Puccinia recondita* f. sp. *Tritici* as a causative agent). The purpose of the work was studying of features of structure and chemical composition of the tissues of a leaf promoting increased resistance. On a phytopathologic plot, against artificial infection with spores of a brown rust, two samples of spring bread wheat 3-13-15-4 and 3-4-14-3 were affected 1–5 % and 30 %, respectively. An analysis of various substances content in the leaf tissue at the contrast samples was conducted. Large plaques and spot consisting of mineral compounds were observed on the leaf surface of the more resistant plant. In ashes of leaves and ashes of a lignin differences in the maintenance of a number of mineral elements were also found. Lignin content on the dry mass of a leaf differed slightly (14.2 % vs 12.3 %), however there are differences in chemical composition. It is possible that the observed differences lead to afflict the plants with leaf rust to such different degrees. In that case these characteristics can be used for diagnostics of potential resistance of cultivars to fungal infection.

Key words: common wheat; brown rust; lignification; mineralization; spectroscopy; two-dimensional magnetic resonance.

✉ e-mail: konov@bionet.nsc.ru

Еще в начале 1960-х гг. было установлено, что лигнификация тканей растений является фактором устойчивости к грибным патогенам (Hijwegen, 1963). Защитный эффект может выражаться в механической преграде распространению гифов гриба, а также в токсическом действии ароматических метаболитов на патоген.

Синтез лигнина и его отложение во вторичных клеточных стенках происходят в результате шикиматного (фенилпропаноидного) пути метаболизма. Данный путь начинается с дезаминирования ароматических аминокислот (фенилаланина и триптофана) и приводит к образованию фенилпропаноидов – ароматических кислот, альдегидов и спиртов, и их многочисленных производных – лигнина, лигнанов и ароматических гликозидов, многие из которых обладают биологической активностью (Запромётов, 1993). Ферменты фенилпропаноидного пути метаболизма у растений участвуют в целом ряде защитных механизмов, таких как заживление механических повреждений, индукция многофункционального регуляторного и защитного вещества MeJA (метилжасмонат) и защита от патогенных атак (Belhadj et al., 2006; Simons et al., 2008; Tronchet et al., 2010; Li et al., 2012; и др.).

Терминальная реакция фенилпропаноидного пути – образование монолигнолов (ароматических спиртов) – контролируется семейством ферментов CAD (cinnamil alcohol dehydrogenase – дегидрогеназа коричного спирта; EC 1.1.1.195); иногда выделяют подсемейство SAD (sinapyl alcohol dehydrogenase – дегидрогеназа синапового спирта). У многих видов растений обнаружен полиморфизм по генам, кодирующим CAD (Коновалов и др., 2015). Полиморфные варианты нередко оказывают влияние на свойства и признаки растений, некоторые из которых имеют отношение к защитным реакциям.

Фенилпропаноидные предшественники лигнина обладают антимикробной и фунгицидной активностью (Barber et al., 2000). Однако результаты были получены с использованием растворов этих веществ (т. е. в мономерном состоянии), и неизвестно, в какой степени их свойства сохраняются в составе полимерных молекул лигнина.

Попадание спор гриба на поврежденные ткани пшеницы вызывает увеличение активности ФАЛ (фенилаланин-аммиак-лиаза; PAL – phenylalanine ammonia_lyase, EC 4.3.1.24) и ароматических дегидрогеназ (в особенности SAD-активность), а также пероксидазы, участвующей в процессе полимеризации монолигнолов (Mitchell et al., 1994).

Инфекция тополя паразитическим грибом *Phanerochaete chrysosporium* вызывала изменения в химическом составе лигнина, в частности усиление синтеза сирингильных мономеров лигнина (Gaskell et al., 2014). Пять из шестнадцати генов *CAD* тополя индуцировались патогенами, в том числе два гена, *Pop-trCAD11* и *Pop-trCAD15*, задействованы в защитных реакциях тканей листа от всех трех использованных грибных инфекций (*Rhizoctoniasolani*, *Fusarium oxysporum* и *Cytospora* sp.), т. е. являются специализированными защитными факторами. Защитная реакция сопровождается изменением автофлюоресценции срезов ткани листа. Однако изменение химического состава тканей не изучалось (Bagniewska-Zadworna et al., 2014). В этой же работе проведен филогенетический анализ 134 генов *CAD* у растений (Bagniewska-Zadworna et al., 2014). Авторы полагают, что существует основная филетическая линия *CAD*-генов, общая для цветковых растений. Эти гены называются *bona fide CAD* (т. е. настоящие, истинные *CAD*) и *CAD-like* (т. е. *CAD*-подобные). Первые, по мнению авторов, обеспечивают базовую лигнификацию стеблей, вторые – принимают участие в защитных реакциях.

Грибные инфекции в суспензионных культурах клеток льна (возбудители *Botrytiscinerea*, *Phomaexigua* и *Fusarium oxysporum* f. ssp. *lini*) активировали фенилпропаноидный путь, причем активность CAD менялась субстрат-специфично: с конифериловым альдегидом иначе, чем с синаповым. При этом происходило изменение химической структуры лигнина и накопление других производных фенилпропаноидного пути (Hano et al., 2006).

Защитный белок ELI3, выделенный из петрушки и контролирующий устойчивость к возбудителю *Phytophthora sojae*, оказался ферментом CAD (Somssich et al., 1996), субстратами для которого является ряд ароматических альдегидов, в частности салициловый альдегид. Производные салициловой кислоты – как известно, один из наиболее распространенных факторов устойчивости растений к патогенам.

В ряде случаев защитной реакцией растения может быть понижение активности ферментов. Подобный механизм описан для огурца (Varbanova et al., 2011). Грибную инфекцию имитировали обработкой пектиназой. При этом понижалась активность HCT (hydroxycinnamoyl coenzyme A-quinate transferase; полное название – p-hydroxycinnamoyl_CoA: shikimate/quinatep-hydroxycinnamoyltransferase, EC 2.3.1.99), а ферменты CAD огурца имеют низкое сродство к *n*-кумаровому альдегиду. В результате *n*-кумаровый альдегид накапливается в тканях и выполняет функцию фитоалексина (вещества защитного действия).

К настоящему времени у мягкой пшеницы известно несколько десятков генов *Lr* (leaf rust), контролирующих устойчивость к листовой ржавчине. Некоторые из них локализованы в хромосомах 5-й гомеологической группы (McIntosh et al., 2005). В хромосоме 5B локализован ген *Lr18* (Hart et al., 1993). Другой ген, *QLr.icg-5B*, неаллельный *Lr18*, также расположен в хромосоме 5B (Леонова и др., 2008). Пятна на листьях пшеницы, обусловленные поражением корневой гнилью, связаны с двумя генами, локализованными в длинном плече хромосомы 5B (Kumar et al., 2016).

При изучении полиморфизма и генетического контроля CAD у мягкой пшеницы были получены гибриды различных образцов, в том числе с использованием нуллитетрасомных линий сорта Chinese Spring (Коновалов и др., 2016). По литературным данным, полиморфные варианты этого семейства ферментов оказывают влияние на содержание ароматических веществ и в некоторых случаях – на защитные свойства тканей растений.

Цель данной работы – выяснить, различаются ли образцы с различными типами спектров CAD по степени поражения бурой ржавчиной, и изучить ткани их листьев по микроморфологическим и химическим показателям.

Материалы и методы

В работе изучали растения F_3 гибридов озимого сорта Новосибирская 9 с нулли-тетрасомными линиями сорта Chinese Spring и их родительские формы. Гибридные растения и родительские формы выращивали на инфекционном поле СибНИИРС и в гидропонной теплице ИЦиГ СО РАН. Первые использовали для оценки степени поражения, вторые – для анализов. Для выращивания растений использовали семена одного урожая. Несколько десятков растений каждого генотипа объединяли в две выборки, по одному листу среднего яруса для каждого генотипа. В этой смеси анализировали содержание веществ. Для микроскопии были взяты типичные растения каждого генотипа.

Анализировали признаки и свойства тканей, не подвергавшихся влиянию инфекции. Изучение влияния инфекции на изменения в инфицированных тканях – это отдельная задача, в настоящей работе такие исследования не проводились.

Интенсивность поражения листьев пшеницы бурой ржавчиной оценивали по шкале Петерсона (Изучение…, 2008).

Изоферментный спектр CAD1 определяли с помощью электрофореза в крахмальном геле (Генетика изоферментов, 1977).

Изучение поверхности листьев проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) TM-1000 (Hitachi, Токио, Япония), оснащенного энергодисперсионным рентгеновским спектрометром EDS (SwiftED, Оксфорд, Великобритания). Параметры работы СЭМ – ускоряющее напряжение 15 кэВ, режим низкого вакуума. Образец без предварительной обработки фиксировался на предметном столике с помощью токопроводящего скотча. Детектор позволяет определять химические элементы с массой от 23 до 238 Да.

Для изучения содержания антоциановых пигментов использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). В исследуемом материале такие пигменты отсутствовали.

Химические показатели оценивали по стандартным методикам (Химический сервисный центр СО РАН). Образцы лигнинов получали, экстрагируя растительное сырье смесью диоксан–вода 9 : 1 в присутствии HCl (0.7 %) при температуре кипения в течение 50 мин. Полученный раствор лигнина отфильтровывали от остатка сырья, упаривали в вакууме и высаживали в десятикратный объем горячей воды. Для очистки лигнин растворяли в диоксане и высаживали в диэтиловый эфир. Регистрация спектров ЯМР диоксан-лигнинов проводилась на приборе Bruker Avance III 500 при рабочих частотах 500.03 (^{1}H) и 125.75 (^{13}C) МГц. Исследуемые образцы готовили путем растворения 25 мг лигнина в 650 мг DMSO-d6 при нагревании на водяной бане при температуре 80 °C и интенсивном перемешивании. Съемка спектров проводилась в 5 мм ампулах при температуре 50 °C. Для съемки спектров на ядрах ^{1}H использовали в качестве стандарта сигналы остаточных протонов растворителя ($\delta = 2.5$ м.д.), релаксационная задержка – 10 с, развертка – 20 м.д., количество накоплений – 256. Для съемки спектров на ядрах ^{13}C в качестве стандарта был выбран сигнал растворителя ($\delta = 39.5$ м.д.), релаксационная задержка – 3 с, развертка – 240 м.д., количество накоплений – 71 680. Двумерные гетероядерные CH-корреляции HMBC (heteronuclear multibond correlation – гетероядерная многосвязная корреляция) и HSQC (heteronuclear single quantum correlation – гетероядерная одноквантовая корреляция) снимались с разверткой от 0 до 16 м.д. по каналу ^{1}H и от 0 до 200 м.д. по каналу ^{13}C. Количество накоплений соответствует 60 сканам для обоих экспериментов в случае диоксан-лигнина образца 3-4-14-3 и 80 и 360 сканам соответственно для экспериментов HMBC и HSQC в случае диоксан-лигнина образца 3-13-15-4. Отнесение кросс-сигналов ^{1}H/^{13}C в HSQC-спектрах лигнинов проводилось по (Белый и др., 2012).

Относительное содержание основных типов связей в макромолекуле лигнина, концевых групп, молярное соотношение мономерных звеньев (гидроксифенильных, гваяцильных и сирингильных звеньев, H : G : S), содержание кумаратов и ферулатов определяли согласно (del Río et al., 2012).

Результаты

В более ранней работе нами было изучено F_2 озимого сорта Новосибирская 9 с нулли-тетрасомными линиями сорта Chinese Spring по хромосомам 5-й гомеологической группы (Коновалов и др., 2016). В потомствах этих гибридов наблюдали различные типы спектров CAD. Растения, отличающиеся типами спектров, в данной работе были использованы для оценки поражения бурой ржавчиной. Оценка устойчивости проведена по стандартной методике по шкале Петерсона (Изучение…, 2008). Два контрастных образца 3-13-15-4 и 3-4-14-3, поражавшихся листовой (бурой) ржавчиной в разной степени – на 1–5 и 30 % соответственно, были взяты в дальнейшие исследования.

Более устойчивый образец 3-13-15-4 имеет такой же спектр CAD, как исходная нулли-тетрасомная линия n5B-t5A сорта Chinese Spring; менее устойчивый образец 3-4-14-3 имеет стандартный спектр, как у сорта Новосибирская 9 (рис. 1). Различия заключаются в отсутствии двух «медленных» изоферментов, что характерно для генотипов с отсутствием хромосомы 5B (Коновалов и др., 2016).

У растений более устойчивого образца 3-13-15-4 окраска листьев варьировала от бледно-желтой до красно-коричневой. Однако по результатам ВЭЖХ (данные не представлены) красно-коричневые листья не содержали антоциановых пигментов, следовательно, окраска вызвана другими причинами, возможно изменением оптических свойств лигнина.

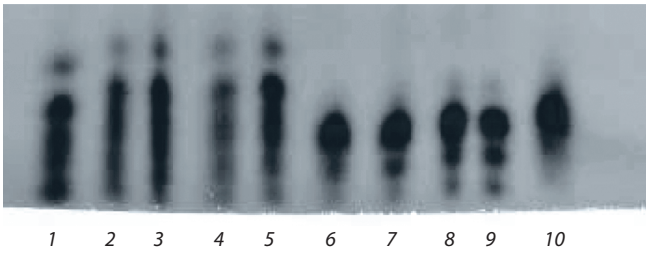


Fig. 1. Isozyme patterns of CAD1 in samples 3-4-14-3 (lanes *1–5*) and 3-13-15-4 (lanes *6–10*).

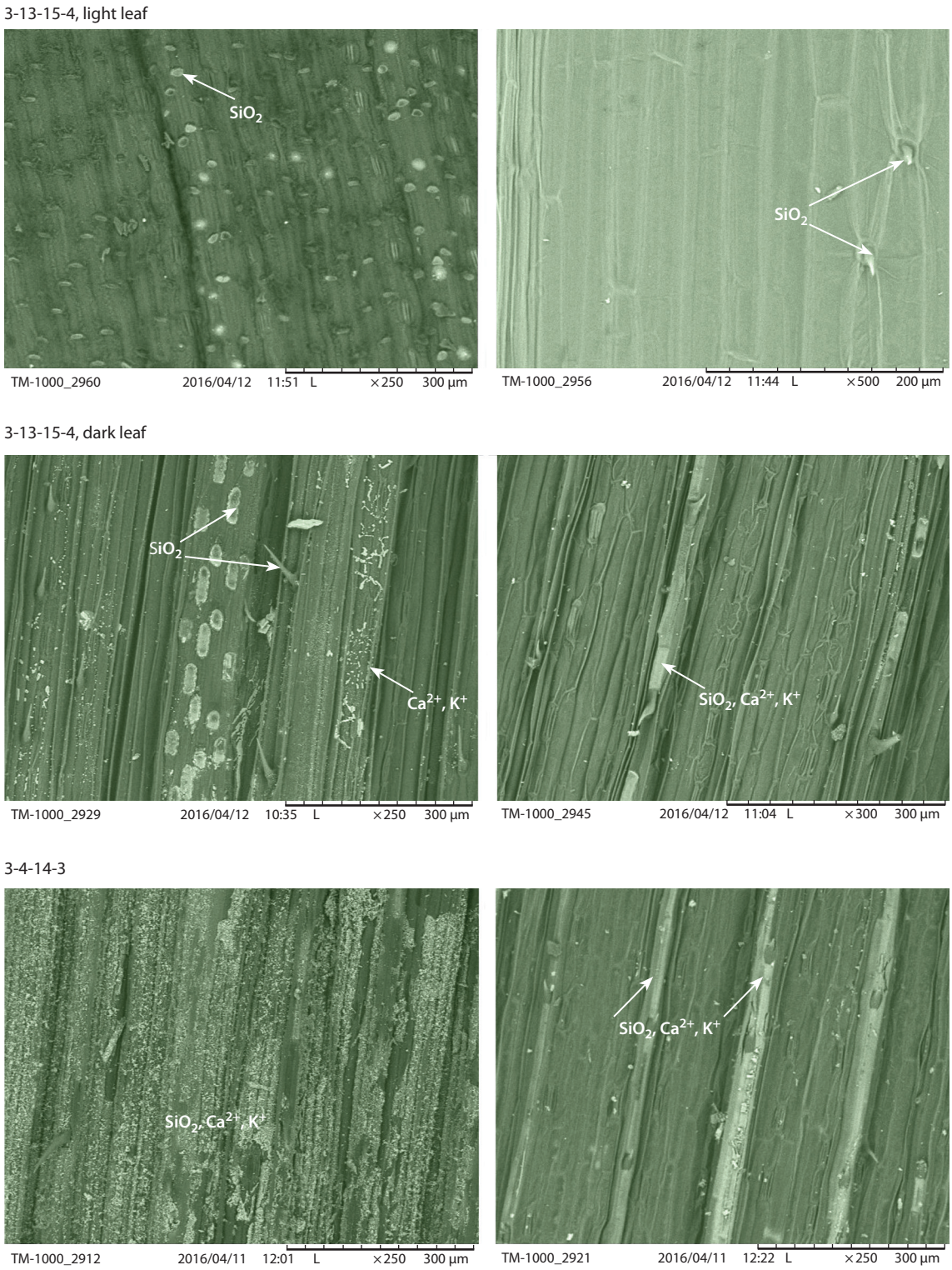


Fig. 2. SEM images and X-ray analysis of the leaf sheet surface in common wheat accessions studied.

Исследование листовой пластинки под электронным микроскопом выявило различия в распределении неорганических веществ на ее поверхности (рис. 2). Поверхность более светлых листьев генотипа 3-13-15-4 равномерно покрыта мелкими папиллами оксида кремния (кремнезема) размером 10–15 мкм. На обратной стороне листа выделяются папиллы в виде шипов, поверхность которых тоже состоит из оксида кремния. Красно-коричневые листья генотипа 3-13-15-4 покрыты рядами более крупных кремнеземных папилл вытянутой формы, достигающих в длину 50 мкм. Поверхность между рядами кремнеземных образований покрыта солями кальция и калия, на ней выделяются шипы, также из кремнезема. Обратная сторона листа покрыта полосами минеральных веществ,

Table 1. Fraction composition (%) of common wheat accessions studied

Fraction	Sample 3-4-14-3	Sample 3-13-15-4
Humidity	3.7	3.6
Extractives	17.7	17.5
Klason lignin	12.3 (10.5 without ash)	14.2 (10.2 without ash)
Klason lignin (SiO_2)	14.7	28.2
Acid-soluble lignin	2.5	2.5
Ash (600 °C)	19.8	20.0
Ash (900 °C)	14.17	16.11
Elemental analysis, %:		
C	38.41 ± 0.02	38.1 ± 0.2
H	5.00 ± 0.2	5.04 ± 0.08
N	1.19 ± 0.04	1.29 ± 0.04

Table 2. Relative contents of dioxane lignin substructures according to ^{1}H и ^{13}C 2D NMR

Substructure	Genotype	
	3-4-14-3	3-13-15-4
Percentages of bond types between phenylpropane monomers		
β-O-4′ Aryl ether (A)	82.88	85.14
α-Oxidized β-O-4′ aryl ether (A_{ox})	–	0.72
Phenylcoumarans (B)	10.78	9.61
Resinols (C)	5.50	4.49
Dibenzodioxocins (D)	0.59	0.26
α,β-Diaryl ethers (E)	0.01	0.26
Spirodienones (F)	0.24	0.25
Total, %	100	100
End groups of lignin macromolecules[1]		
Cinnamyl alcohol end groups (I)	1.17	1.15
Cinnamaldehyde end groups (J)	0.53	0.31
Aromatic links[2]		
n-Hydroxyphenyls (H), %	3.25	6.04
Guaiacyls (G), %	45.67	43.25
Syringyls (S), %	51.09	50.72
S : G ratio	1.12	1.17
n-Hydroxycinnamates[3]		
n-Coumarates (PCA), %	6.98	23.14
Ferulates (FA), %	19.24	9.67
PCA : FA ratio	0.36	2.39

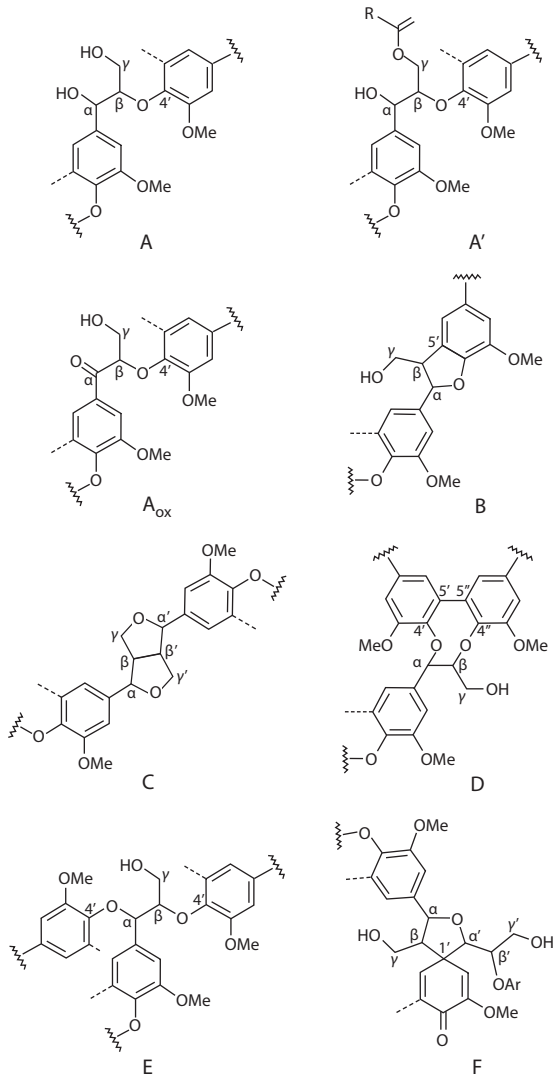
[1] Fraction of the total amount of types A–F lignin bonds; [2] molar percentage; [3] integral molar content as percentage of lignin content.

состоящих из соединений кремния, калия, кальция и магния.

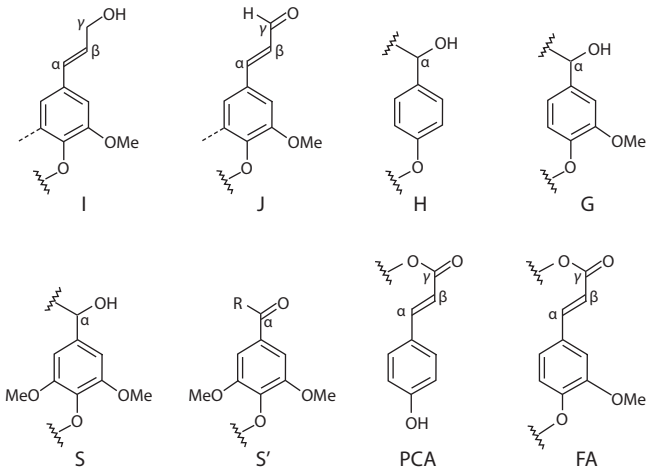
В отличие от этого образца, поверхность листа менее устойчивого генотипа 3-4-14-3 явно выраженных папилл не имеет и покрыта соединениями кремния, калия и кальция. Обратная сторона листа по своей морфологии похожа на поверхность красно-коричневого листа более устойчивого генотипа 3-13-15-4.

Химический анализ состава основных компонентов клеточной стенки показал различия по содержанию лигнина в листьях и по его зольности (табл. 1). Остальные компоненты присутствуют в сопоставимых количествах.

Структура диоксан-лигнинов, выделенных из листьев пшеницы разных генотипов, была охарактеризована методом двумерной ЯМР-спектроскопии (табл. 2).



По полученным данным, содержание β-O-4′ арилэфирных (A), фенилкумарановых (B), пинорезинольных (C) и спиродиеноновых (F) фрагментов практически одинаковое в лигнинах пшениц обоих генотипов. В лигнине генотипа, устойчивого к листовой ржавчине, присутствуют типы связывания через α-окисленный β-O-4′ арилэфир (A_{ox}) и α,β-диариловые эфиры (E).



В структуре лигнина генотипа 3-4-14-3 содержится больше концевых альдегидных групп (J), тогда как содержание спиртовых (I) концевых групп одинаково для обоих генотипов. Соотношение гваяцильных (G) и сирингильных (S) звеньев в образцах диоксан-лигнинов одинаково. Значительные различия наблюдаются в содержании *n*-кумаратов (PCA) и ферулатов (FA). Первые преобладают в структуре лигнина генотипа 3-13-15-4, вторые – в генотипе 3-4-14-3. Высокое содержание *n*-кумаратов в лигнине устойчивого генотипа согласуется с повышенным содержанием *n*-гидроксифенильных звеньев (H), образующихся непосредственно из *n*-кумаровой кислоты.

Обсуждение

Механизмы защитных реакций у растений многообразны и могут выражаться как в морфологических и микроморфологических (анатомических) особенностях, так и в биохимическом воздействии на патоген. Нами обнаружены различия по степени минерализации поверхности листовой пластинки у мягкой пшеницы, а также по содержанию в тканях продуктов фенилпропаноидного пути метаболизма. Возможно, эти различия связаны с различиями в изоферментном составе NADP-CAD (НАДФ-зависимая CAD; NADP – кофактор никотинамидадениндинуклеотид фосфат, окисленная форма), который считается одним из ключевых ферментов фенилпропаноидного пути (Коновалов и др., 2015).

Полиморфные варианты NADP-CAD оказывают существенное влияние на свойства тканей злаков (Гончаров и др., 2012; Коновалов и др., 2014, 2016; Konovalov et al., 2016). Это может быть обусловлено различиями по субстратной специфичности отдельных изоферментов NADP-CAD, которые обнаружены при очистке этого фермента у пшеницы и ее сородичей (Pillonel et al., 1992).

По общему содержанию лигнина образцы 3-4-14-3 и 3-13-15-4 различаются незначительно (12.3 и 14.2 % соответственно), однако более устойчивый образец содержит в лигнине повышенное содержание *n*-гидроксифенильных звеньев. Выраженные различия наблюдаются по содержанию *n*-гидроксициннаматов, ткани листа у образца 3-13-15-4 содержат большое количество *n*-кумаратов, при этом понижено содержание соединений с альдегидной группой C = O.

Фенольные соединения в тканях растений накапливаются, как правило, в гликозидной форме, однако непосредственно в районе гаусторий гриба фенолы обнаруживаются в виде агликонов (т. е. свободных фенолов), в котором они более токсичны (Benhamou, Bélanger, 1998). Гидролиз фенольных гликозидов с высвобождением молекулярных фенолов может быть спровоцирован какими-то веществами-элиситорами самих грибов.

При отсутствии антоцианов различия по окраске могут быть вызваны изменением химического состава лигнина. Для многих растений описаны мутантные генотипы CAD (как природные, так и искусственно полученные), у которых изменение в химическом составе мономеров привело к появлению характерной красновато-коричневой окраски тканей (Коновалов и др., 2015).

Поражение клеток пшеницы стеблевой ржавчиной (возбудитель *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) обусловливает усиление ультрафиолетовой флюоресценции пораженных участков тканей и изменение биохимической структуры лигнина (Moerschbacher et al., 1990; Menden et al., 2007). Ингибиторы CAD усиливали защитное действие. Вероятно, поражение листовой ржавчиной (возбудитель *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) приводит к сходным защитным процессам.

На поверхности листовой пластинки более устойчивого образца присутствуют минеральные образования, состоящие преимущественно из кремнезема SiO_2, который может представлять собой механическое препятствие для распространения гифов гриба. В золе лигнина устойчивого образца также содержится намного больше SiO_2 (см. табл. 1).

Связь между метаболизмом кремния и фенолов ранее отмечали многие исследователи (Fauteux et al., 2005). Одним из вероятных механизмов может быть влияние соединений кремния на активность ферментов, задействованных в защитных реакциях. Обработка растворами, содержащими кремний (силикат кальция, 300 г/м^2), увеличила устойчивость растений пшеницы к мучнистой росе (Bélanger et al., 2003). Кроме того, обработка кремнием вызвала сильное увеличение отложения фенолов в эпидермальных клетках. Кремниевые соединения играют пассивную роль, образуя вместе с полифенолами более прочные покровы листа, однако авторы считают более вероятным, что кремний откладывается именно в местах проникновения гаусторий, т. е. играет активную протекторную роль. Возможным механизмом является сродство соединений кремния в форме гидрооксидов $Si(OH)_4$ к органическим полигидроксильным соединениям, участвующим в синтезе лигнина (Bélanger et al., 2003).

Обнаруженный нами тип повышенной устойчивости примерно соответствует типу устойчивости, обозначенному в научной литературе как «нехозяйская устойчивость» (nonhost resistance) (Чесноков, 2007), который раньше называли горизонтальной (неспецифической). В отличие от вертикальной устойчивости типа «ген-на-ген» (gene-for-gene resistance), в формирование неспецифической устойчивости вовлечены обычные гены метаболизма. Можно предположить, что к таковым относятся ген *CAD1*, задействованный в метаболизме фенилпропаноидов, или сцепленные с ним гены. Дальнейшие исследования позво-

лят очертить круг факторов, вовлеченных в формирование устойчивости растений к грибным инфекциям.

Полученные данные свидетельствуют о значительных различиях в качественном и количественном составе ароматических соединений в тканях листьев пшеницы, а также в степени минерализации поверхности листовой пластинки. На основании этих результатов можно предположить, что определенные соотношения рассматриваемых веществ оказывают влияние на устойчивость растений пшеницы к грибной инфекции. Выделенные генотипы предполагается использовать для изучения возможных механизмов устойчивости.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0005.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bagniewska-Zadworna A., Barakat A., Lakomy P., Smoliński D.J., Zadworny M. Lignin and lignans in plant defence: insight from expression profiling of cinnamyl alcohol dehydrogenase genes during development and following fungal infection in *Populus*. Plant Sci. 2014;229:111-121. DOI 10.1016/j.plantsci.2014.08.015.

Barber M.S., McConnell V.S., De Caux B.S. Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. Phytochemistry. 2000;54(1):53-56. PMID: 10846747.

Bélanger R.R., Benhamou N., Menzies J.G. Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). Phytopathology. 2003;93(4):402-412. DOI 10.1094/PHYTO.2003.93.4.402.

Belhadj A., Saigne C., Telef N., Cluzet S., Bouscaut J., Corio-Costet M.F., Mérillon J.M. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. J. Agric. Food Chem. 2006;54(24):9119-9125.

Belyaev D.K. (Ed.) Genetika izofermentov [The Genetics of Isoenzymes]. Novosibirsk: Nauka Publ., 1977. (in Russian)

Belyy V.A., Alekseev I.N., Sadykov R.A. Study of the chemical structure of lignins from golden root (*Rhodiola rose*a L.) and crowned saw-wort (*Serratula coronata* L.) by 2D nuclear magnetic resonance spectroscopy. Izvestiya Komi nauchnogo tsentra UrO RAN = Proceedings of the Komi Research Center. 2012;3(11):20-26. (in Russian)

Benhamou N., Bélanger R.R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: Ultrastructure and cytochemistry of the host response. Plant J. 1998;14(1):13-21. DOI 10.1046/j.1365-313X.1998.00088.x.

Chesnokov Yu.V. Pathogen resistance in plants of plants (review of foreign literature). Selskokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural Biology. 2007;1:16-35. (in Russian)

del Río J.C., Rencoret J., Prinsen P., Martínez Á.T., Ralph J., Gutiérrez A. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. J. Agric. Food Chem. 2012;60(23):5922-5935. DOI 10.1021/jf301002n.

Fauteux F., Rémus-Borel W., Menzies J.G., Bélanger R.R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. FEMS Microbiol. Lett. 2005;249(1):1-6. DOI 10.1016/j.femsle.2005.06.034.

Gaskell J., Marty A., Mozuch M., Kersten P.J., BonDurant S.S., Sabat G., Azarpira A., Ralph J., Skyba O., Mansfield S.D., Blanchette R.A., Cullen D. Influence of *Populus* genotype on gene expression by the wood decay fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 2014;80(18):5828-5835. DOI 10.1128/AEM.01604-14.

Goncharov N.P., Konovalov A.A., Moiseeva E.A. Influence of short-term vernalization on the expression of the *Aadh1-Spn* gene and the growth habit of plants in hybrids of rye *Secale cereale* L. to *S. montanum* Guss. Sibirskiy vestnik selskokhozyaystvennoy nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences. 2012;5:19-25. (in Russian)

Hano C., Addi M., Bensaddek L., Cronier D., Baltora-Rosset S., Doussot J., Maury S. Mesnard F., Chabbert B., Hawkins S., Laine E., Lamblin F. Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. Planta. 2006;223:975-989.

Hart G.E., Gale M.D., McIntosh R.A. Linkage maps of *Triticum aestivum* (Hexaploid wheat, 2n = 42, Genomes A, B & D) and *T. tauschii* (2n = 14, Genome D). Genetic Maps. 6 ed. S.J. O'Brien (Ed.). N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1993;6.204-6.219.

Hijwegen T. Lignification, a possible mechanism of active resistance against pathogens. Neth. J. Plant Pathol. 1963;69:314-317.

Konovalov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V. Polymorphism of lignification enzymes in plants: Functional importance and applied aspects. Biology Bulletin Reviews. 2016;6(2):149-163.

Konovalov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V., Goncharov N.P., Kondratenko E.Ya. Chromosomal localization of aromatic alcohol dehydrogenase fast-migrating isoenzyme *AAdh1F* (*CAD1F*) gene in *Triticum aestivum* L. bread wheat. Russian Journal of Genetics. 2016;52(10):1110-1116.

Konovalov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V., Nefedov A.A., Goncharov N.P. Inheritance and phenotype expression of functional and null alleles of aromatic alcohol dehydrogenase (CAD) in diploid wheats. Russian Journal of Genetics. 2014;50(11):1161-1168.

Konovalov A.A., Shundrina I.K., Karpova E.V., Orlova E.A., Goncharov N.P. Influence of a lignification and mineralization of leaf tissues on resistance of bread wheat plants to a brown rust. Plant Genetics and Genomics for Food Security. The 1st Int. Workshop: Abstract Book. Novosibirsk, Russia, Aug. 26–28. Novosibirsk, 2016;27.

Kumar S., Röder M.S., Kumar S., Singh R.P., Joshi A.K., Kumar U. Mapping of spot blotch disease resistance using NDVI as substitute to visual observation in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Genetics and Genomics for Food Security. The 1st Int. Workshop: Abstract Book. Novosibirsk, Russia, Aug. 26–28. Novosibirsk, 2016;32.

Leonova I.N., Roder M.S., Kalinina N.P., Budashkina E.B. The genetic analysis and localization of the loci controlling the resistance of *Triticum aestivum* × *T. timopheevii* introgression lines to leaf rust. Genetika = Genetics (Moscow). 2008;44(12):1652-1659. (in Russian)

Li X., Ma D., Chen J., Pu G., Ji Y., Lei C., Du Z., Liu B., Ye H., Wang H. Biochemical characterization and identification of a cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua*. Plant Sci. 2012;193-194:85-95. DOI 10.1016/j.plantsci.2012.05.011.

McIntosh R.A., Devos K.M., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C.F., Appels R., Anderson O.D. Catalogue of gene symbols for wheat: Supplement. Annual Wheat Newsletter. 2005;51:251-285.

Menden B., Kohlhoff M., Moerschbacher B.M. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. Phytochemistry. 2007;68(4):513-520.

Mitchell H.J., Hall J.L., Barber M.S. Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Plant Physiol. 1994;104(2):551-556.

Moerschbacher B.M., Noll U., Gorrichon L., Reisener H.J. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. Plant Physiol. 1990;93(2):465-470. PMID: 16667489.

Pillonel C., Hunziker P., Binder A. Multiple forms of the constitutive wheat cinnamyl alcohol dehydrogenase. J. Exp. Bot. 1992;43(248): 299-305.

Radchenko E.E. (Ed.) Izuchenie geneticheskikh resursov zernovykh kultur po ustoychivosti k vrednym organizmam: metodicheskoe posobie [Study of Genetic Resources for Pest Resistance in Grain Crops: Methodical Handbook]. Moscow: Rosselkhozakademiya Publ., 2008. (in Russian).

Simons L., Bultman T.L., Sullivan T.J. Effects of methyl jasmonate and an endophytic fungus on plant resistance to insect herbivores. J. Chem. Ecology. 2008;34:1511-1517.

Somssich I.E., Wernert P., Kiedrowski S., Hahlbrock K. *Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol: $NADP^+$ oxidoreductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996;93:14199-14203.

Tronchet M., Balagué C., Kroj T., Jouanin L., Roby D. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. Molecular Plant Pathology. 2010;11:83-92. DOI 10.1111/j.1364-3703.2009.00578.x.

Varbanova M., Porter K., Lu F., Ralph J., Hammerschmidt R., Jones A.D., Day B. Molecular and biochemical basis for stress-induced accumulation of free and bound *p*-coumaraldehyde in cucumber. Plant Physiol. 2011;157(3):1056-1066. DOI 10.1104/pp.111.184358.

Zaprometov M.N. Fenolnye soedineniya: rasprostranenie, metabolizm i funktsii v rasteniyakh [Phenolic Compounds: Distribution, Metabolism, and Functions in Plants]. Moscow: Nauka Publ., 1993. (in Russian)

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):694-700
DOI 10.18699/VJ17.287

On three cultivated subspecies of pea (*Pisum sativum* L.)

O.E. Kosterin

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The common pea (*Pisum sativum* L.) is an important crop characterised by high diversity, taxonomic fixation of which may be important for selection as it attracts attention to the taxa recognised, although this recognition can be poorly justified. Two subspecies of the common pea, traditionally recognised in Russian botanical and genetical literature, *Pisum sativum* L. subsp. *transcaucasicum* Makasheva from Transcaucasia and *Pisum sativum* L. subsp. *asiaticum* Govorov from Anterior and Central Asia and North Africa, are considered, as well as their diagnostic characters and arguments in favour of their subspecific status. *P. sativum* subsp. *transcaucasicum* is characterised by small seeds, three pairs of small diamond-shaped leaflets, vigorous branching and full reproductive compatibility with *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* and has a very limited range in Georgia. As a very local landrace it hardly deserves a subspecific status, however it is reasonable to consider it as a variety, *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* var. *transcaucasicum* (Makasheva) Kosterin comb. nov. The subspecies *P. sativum* subsp. *asiaticum* practically misses diagnostic characters which are limited to small flowers with presence of some flavonoid pigmentation in the corolla. In fact, this subspecies has accumulated very diverse landraces from most of the Old World. Absence of reliable diagnostic characters makes it impossible to recognise this subspecies. Thus, *P. sativum* subsp. *asiaticum* is a later synonym of *P. sativum* subsp. *sativum*, to which all cultivated representatives of *P. sativum* L. should be attributed. A peculiar form traditionally cultivated in Egypt was described as the species *Pisum jomardii* Schrank and subsequently considered also in the ranks of subspecies and variety; it would better be considered as *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* var. *jomardii* (Schrank) Govorov.

Key words: *Pisum sativum* L. subsp. *sativum*; *Pisum sativum* L. subsp. *transcaucasicum* Makasheva; *Pisum sativum* L. subsp. *asiaticum* Govorov; *Pisum jomardii* Schrank; *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* var. *transcaucasicum* (Makasheva) Kosterin comb. nov.; *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* var. *jomardii* (Schrank) Govorov; pea; subspecies; varieties; landraces.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Kosterin O.E. On three cultivated subspecies of pea (*Pisum sativum* L.) Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):694-700. DOI 10.18699/VJ17.287

Received 15.07.2017
Accepted for publication 05.09.2017
© AUTHOR, 2017

e-mail: kosterin@bionet.nsc.ru

О трех культурных подвидах посевного гороха (*Pisum sativum* L.)

О.Э. Костерин

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

Горох (*Pisum sativum* L.) – важная сельскохозяйственная культура, характеризующаяся большой изменчивостью. Ее таксономическое оформление имеет значение для селекции, поскольку привлекает особое внимание к выделяемым таксонам, хотя их выделение не всегда оправданно. Рассмотрены два традиционно выделяемых в отечественной ботанической и генетической литературе культурных подвида посевного гороха – *Pisum sativum* L. subsp. *transcaucasicum* Makasheva из Закавказья и *Pisum sativum* L. subsp. *asiaticum* Govorov из Передней и Центральной Азии и Северной Африки, их диагностические признаки и аргументация в пользу их выделения. *P. sativum* subsp. *transcaucasicum* отличается мелкими семенами, тремя парами мелких ромбовидных листочков, усиленной ветвистостью, полной репродуктивной совместимостью с обычным культурным горохом *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* и имеет очень ограниченный ареал в Грузии. Такая узколокальная культурная форма вряд ли заслуживает подвидового статуса, однако ее целесообразно рассматривать в качестве разновидности *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* var. *transcaucasicum* (Makasheva) Kosterin comb. nov. Подвид *P. sativum* subsp. *asiaticum* не имеет надежных диагностических признаков, которые сводятся в основном к мелким цветкам с присутствием некоторой флавоноидной пигментации венчика. По сути к этому подвиду были отнесены самые разнообразные местные традиционные формы посевного гороха Старого Света. Отсутствие надежных диагностических признаков также не позволяет признать данный таксон ни в каком ранге. Таким образом *P. sativum* subsp. *asiaticum* является более поздним объективным синонимом *P. sativum* subsp. *sativum*, к которому следует относить все культурные представители вида посевного гороха (*P. sativum* L.). Своеобразная местная форма, традиционно культивировавшаяся в Египте, была первоначально описана в ранге вида *Pisum jomardii* Schrank и впоследствии рассматривалась также в рангах подвида и разновидности в составе азиатского подвида. Представляется целесообразным рассматривать ее как *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* var. *jomardii* (Schrank) Govorov.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L. subsp. *sativum*; *Pisum sativum* L. subsp. *transcaucasicum* Makasheva; *Pisum sativum* L. subsp. *asiaticum* Govorov; *Pisum jomardii* Schrank; *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* var. *transcaucasicum* (Makasheva) Kosterin comb. nov.; *Pisum sativum* L. subsp. *sativum* var. *jomardii* (Schrank) Govorov; горох; подвиды; разновидности; местные культурные формы.

The common pea (*Pisum sativum* L.) is an important crop with three important applications, as a vegetable, corn and fodder culture (plus a less known application in crop rotation for enrichment of soils with nitrogen). The pea is the first genetical object (Mendel, 1866; Kosterin, 2015) and is characterised by huge accumulated genetic and phenotypical variation (Blixt, 1972). It is not hence surprising that for a long time it has been attracting a thorough attention of various researchers including botanists, resulting in a complicated and discrepant intraspecies taxonomy, the history of which was considered in detail in a comprehensive monograph by R.Kh. Makasheva (1979). This monograph has also presented a taxonomical system of the genus *Pisum* L. in general and the species *P. sativum* in particular, which until recently was universally used in Russia; it was quite close to that by C. Lehmann (1954) which, in turn, until recently was the most used worldwide.

The system of the species *P. sativum* adopted by Makasheva (1979) contains two wild and three cultivated subspecies, wild *P. sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmalh. and *P. sativum* subsp. *syriacum* Berger, and cultivated *P. sativum* subsp. *sativum*, *P. sativum* subsp. *asiaticum* Govorov and *P. sativum* subsp. *transcaucasicum* Makasheva. The same three cultivated subspecies are adopted in the taxonomical system by H. Lehmann and S. Blixt (1984), based on genetic factors exhibiting Mendelian segregation. This mini review concerns *P. sativum* subsp. *asiaticum* and *P. sativum* subsp. *transcaucasicum* and argues in favour of considering them to be later synonyms of the autonymic subspecies *P. sativum* L. subsp. *sativum* rather than their recognition at subspecific rank. Besides, 'Jomard's pea' is considered, which was suggested to be another cultivated subspecies of *P. sativum* in one of our earlier papers (Kosterin, Bogdanova, 2008) that we now consider unjustified. It is noteworthy that the system of the genus *Pisum* by N. Maxted and M. Ambrose (2001), most broadly accepted at present, also recognises only one cultivated subspecies of the common pea, *P. sativum* subsp. *sativum*.

For the sake of practical convenience, in this work I proceed considering *Pisum* as a genus, although a recent molecular phylogenetic analysis of the tribe Fabea (Schaefer et al., 2012) suggested to cancel the genus *Pisum* and subsume it, as a section, to the genus *Lathyrus* L. (Coulot, Rabaute, 2016; Kosterin, 2017). Since I do not support a subspecific rank of the taxa considered, treatment of the common pea in the genus *Lathyrus* (under the name *Lathyrus oleraceus* Lamarck) would not demand new combinations.

Transcaucasian Pea (*Pisum sativum* L. subsp. *transcaucasicum* Makasheva)

The subspecies *P. sativum* subsp. *transcaucasicum* Govorov nom. illeg., including nine groups of varieties ('proles') was erected by L.I. Govorov (1937, p. 242) in the first edition of the 'Cultivated Flora of the USSR', with the following note: "We isolate the endemic forms of Transcaucasia into a new subspecies ssp. *transcaucasicum* and attribute it to the species of cultivated forms, *P. sativum*" (here and on the Russian text is translated into English by the author of this paper). Govorov (1937, p. 283) provided it with the following diagnosis: "Differs drastically from other subspecies by oblong, acute, always whole-edged leaflets. The habitus of the entire plant is vetch-like. The flowers are moderately large. The alae are usually dark-violet. The carina always is more or less coloured with anthocyanin. The stems do not branch or are scarcely branching at base, moderately high. The pods are narrow, from small to medium-sized, always with a parchment layer. The seeds are small, usually of an angulate shape, pigmented". (An example of such plant is shown in Figure, *b*.) He also provided the following geographical range: "Central Transcaucasia, North Caucasus and south-eastern European part of the Union". Govorov (1937, p. 295) reported seven varieties of this subspecies. No information on the origin of the type is given but the names of most varieties and their groups were formed from toponyms, among which we find Bakuriani, Akhalkalaki, Dzhavakheti, Volga, Saratov, the three former ones referring to the territory of Georgia and the two latter to the present-day Russia.

The descriptions of the subspecies, varieties and their groups were given only in Russian that contradicted the rules of botanical nomenclature and made those names illegal. The situation was corrected by R.Kh. Makasheva (1979) who repeated the descriptions by Govorov in Latin, with some update including comparative diagnoses and information of the types, and some change of the system of varieties: in her treatment the subspecies had five varieties, two of which were split into two, and one into three subvarieties. This made R.Kh. Makasheva the actual author of these taxa as validly published. In particular she (Makasheva, 1979, p. 71) for the first time provided the comparative diagnosis of the subspecies: "Differs from a close subspecies *asiaticum* Govorov by 3–4-paired narrow leaflets (2–2.5 times as long as wide)". Information about the types of varieties and subvarieties (that for the nominotypical var. *transcaucasicum* is missing) gives us an idea of the provenance of the Transcaucasian pea materials at Makasheva's disposal. It is striking that for as many as eight recognised taxa there are only two geographical localities – "near Bakuriani and Mitrab village" (*locus classicus* of three varieties and four more subvarieties) and "Saratov Province, in a vetch field"! That is, extensive taxonomical formalisation was undertaken for polymorphisum observed just in two local populations!

P.M. Zhukovskiy (1964, p. 333) added the subspecies "*P. sativum* subsp. *transcaucasicum* Govorov" to the second edition of his monograph 'Cultivated plants and their relatives' with the following characteristics: "Small-seeded, anthocyanin-coloured forms in meadow herbage of the subalpine zone of Transcaucasia". Here one can recognise indication to growing in the wild, that by no means corresponds to both the earlier opinion of the taxon's author, L.I. Govorov (1937, p. 242), who attributed it to "the species of cultivated forms", and to the later opinion by R.Kh. Makasheva (1979, p. 71): "The forms cultivated for fodder in Central Transcaucasia and North Caucasus, field weedy forms in vetch and lentil fields (before [19]30s years) in the south-eastern European part of the USSR". More recent and/or detailed information on cultivation or spontaneous growing of these forms in the Caucasus and Transcaucasia is missing, but their non-dehiscing pods imply them to be cultivated.

Another phenotypical peculiarity of the Transcaucasian pea is a rare allelic electromorph 2 of the subtype 6 of histone H1 (Berdinkov et al., 1989, 1993; Kosterin et al., 1994) resulting

Pisum sativum subsp. *sativum* var. *transcaucasicum* (Govorov) Kosterin, com. nov., accession VIR4871 (Bakuriani): *a* – seeds; *b* – branches of the upper part of the plant.

from a substitution of proline to hystidine in the C-terminal domain of the protein (Kosterin et al., 2012). It is noteworthy that the same electromorph is found in accession VIR1851 from Georgia (Tbilisi Botanical Garden), originally identified in the N.I. Vavilov All-Union Institute of Plant Breeding, St-Petersburg (VIR) as wild subspecies *P. sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Shmalh. but actually missing the key characters of a wild pea, dehiscing pods and gritty seed testa, and with 'normal', by no means vetch-like habitus (Berdnikov et al., 1993).

Such a characteristic of the Transcaucasian pea as three pairs of whole-margined leaflets is found also in the accession WG26109 of wild pea *P. sativum* subsp. *elatius*, also from Georgia (Kvemo-Kartli, Trialeti Mountain Range, 7 km N of Partsklisi) belonging to the evolutionary lineage A, as different from cultivated subspecies which belongs to the lineage B (Zaytseva et al., 2017). However in this accession, the leaflets have another, oblong ovoid shape and they are soft and somewhat curving inside, while in the Transcaucasian pea they are elongate-diamond-shaped, subacute, flat (Figure, *b*) and very stiff. Perhaps Zhukovskiy (1964, p. 333) implied plants resembling accession WG26109 as "growing in the subalpine zone of Transcaucasia". It is noteworthy that on a phylogenetic tree reconstructed by Ellis et al. (1998), the four accessions of *P. sativum* subsp. *transcaucasicum* formed a distinct cluster branched off near the cluster of '*P. elatius*'. One could suppose formation of the Transcaucasian pea through a past introgression of wild (resembling WG26109) and cultivated peas in Georgia.

However, our experiments on crossing a typical accession of Transcaucasian pea VIR4871 with WG26109 and testerline WL1238 representing *P. sativum* subsp. *sativum*, carried out in the greenhouse of the Institute of Cytology & Genetics SB RAS, Novosibirsk, in the 2016 autumn vegetation and the 2017 spring vegetation, did not support this assumption. Reciprocal crosses VIR4871 × WL1238 and WL1238 × VIR4871 were carried out; two hybrid plants of the first generation of the former cross and five from the latter cross were grown out and fertility of their pollen was analysed according to Singh (2003). F_1 hybrids of both reciprocal crosses had fully fertile pollen: 98.3 ± 2.6 % filled pollen grains (the number of flowers analysed, $n = 9$) in hybrids WL1238 × VIR4871 and 96.2 ± 10.3 % ($n = 10$) in hybrids VIR4871 × WL1238, that evidenced for the absence of reproductive barriers between the Transcaucasian pea and a typical representative of *P. sativum* subsp. *sativum*, via either reciprocal translocation(s) or a nuclear-cytoplasmatic conflict. We failed to obtain hybrid plants in the cross VIR4871 × WG26109, while in the reciprocal cross WG26109 × VIR4871, pollen fertility was analysed in eleven F_1 obtained and appeared to be 51.4 ± 9.5 % ($n = 31$). Similar values of pollen fertility was found also in eleven F_1 hybrids in the cross WG26109 × WL1238 (54.6 ± 15.3 %, $n = 30$) and in ten obtained reciprocal hybrids WL1238 × WG26109 (38.3 ± 12.0 %, $n = 26$). Hence a representative of the Transcaucasian pea, VIR4871, showed complete reproductive compatibility with a representative of *P. sativum* subsp. *sativum*, WL1238, but both exhibited only partial compatibility with a Georgian wild pea (*P. sativum* subsp. *elatius* s. l.) accession WG26109 with three leaflet pairs, the F_1 hybrids with which had semifertile pollen, that is the two former peas are related to each other but both unrelated to the third one.

Earlier we recognised the subspecies *P. sativum* subsp. *transcaucasicum* (Berdnikov et al., 1989, 1993; Kosterin, Bogdanova, 2008), later evasively called it 'a subspecies of doubtful validity' (Zaytseva et al., 2012, 2015).

The main problem of the taxonomical status of the Transcaucasian pea is whether it is reasonable to ascribe the subspecific rank to some local cultivated form (landrace) which is endemic for a very small region and has distinct diagnostic characters. If this were a wild plant, the answer would surely be positive, and perhaps this form would be considered even at a species rank. However, we deal with a local traditionally cultivated form, the range of which is inevitably to shrink and the limits to dissolve because of supplanting traditional agriculture by its more agrotechnically advanced commercial version oriented to widespread modern cultivars, and also because of availability of diverse seed stock. It seems reasonable, following the system by Maxted and Ambrose (2001) to consider the subspecies *P. sativum* L. subsp. *transcaucasicum* Makasheva as a later synonym of *P. sativum* L. subsp. *sativum.* At the same time this peculiar taxon deserves recognition as a variety within it. According to the Article 49 of the International Code of Nomenclature of algae, fungi and plants (2012), change of a rank of a taxon creates a new combination:

***Pisum sativum* L. subspecies *sativum* variatio *transcaucasicum* (Makasheva) Kosterin combinatio nova**

Basionymum: *Pisum sativum* subsp. *transcaucasicum* Makasheva (Flora of Cultivated Plants. 4(1): 71, 1979).

Asian Pea (*Pisum sativum* L. subsp. *asiaticum* Govorov)

Recognition of the Asian pea as a taxonomical unit fully faces the aforementioned problem of the current rapid 'dis-

solving' and vanishing of any isolated set of landraces, which are products of long-term traditional agriculture. However, an additional and more serious obstacle for recognition of this subspecies is fuzziness and uncertainty of its diagnostic characters. This is not surprising for a subspecies where primitive cultivated landraces were united, according to L.I. Govorov (1937), the subspecies author, from so vast range as "Anterior, South-Western and Central Asia and mountainous regions of North Africa". Diversity of forms united into this subspecies is reflected in the number of subordinate taxa isolated in it: 19 varieties in the work by L.I. Govorov (1928) where *P. sativum* subsp. *asiaticum* was first described, 34 varieties in his later work (Govorov, 1937) and 39 varieties and subvarieties (monotypical varieties and autonymical subvarieties in polytypic varieties were counted) in R.Kh. Makasheva (1979).

In the subspecies protologue, L.I. Govorov (1928, p. 499) reported the following diagnostic characters: "(1) the presence of a peculiar dirty-pink or cream tint on the flower standard, brought about by the presence, along with the anthocyanin, of a special pigment from the flavonoid group, (2) the predominance of character combinations rarely met together in other subspecies and, lastly, (3) a specific range of distribution, namely South-Western, Central and East Asia, except for the boreal part of the latter". Note that the points (2) and (3) are senseless: the character combinations are not explained, while any biological entity always has some range of occurrence; and in this case it is too broad for a subspecies, approaching that of the entire species. Then a diagnosis of 15 lines follows and a detailed, one and half page long, description of variation of the new subspecies (descriptions of all taxa repeated in Latin). It can be easily seen, that in fact the only diagnostic character is provided – the coloration of the standard.

The subspecies diagnosis in a later work by L.I. Govorov (1937, p. 282) is also very indefinite: "The flowers are small (0.9–1.5 cm), usually with a flavonoid pigment. The standard is narrow, the alae are oblong to ovoid, narrow. The calyx teeth are shorter, or as long as the tube. The leaflets are small to medium-sized, ovoid, serrate or dentate. The stipulae are dentate all over their margins, rarely to 2/3–1/3. The stems are branching at base, medium in height, rarely tall. The peduncules are usually shorter than the stipulae, sometimes exceeding them, with 1, rarely 2 flowers. The pods are small, rarely medium-large, always with a parchment layer. The seeds are small, rarely medium-large, usually pigmented". Govorov did not provide a separate key to the subspecies but this was done by R.Kh. Makasheva (1979); in her key, the Asian subspecies is grouped with the subspecies *transcaucasicum* and *abyssinicum* and is opposed to the subspecies *sativum*, *elatius* and *syriacum* by the following set of characters: stem narrow versus medium-thick or thick, branching at base versus non-branching or weakly branching, branch orientation almost horizontal versus departing at acute (sometimes almost right) angle, and the number of sympodial bundles "in the plant upper part" – 4 versus 6–11 (but sometimes also 4). All these are very unreliable quantitative characters.

From the above presented information it is evident that no objective reasons for isolation of the Asian subspecies ever existed. The reasons why L.I. Govorov isolated it concerned solely his theoretical notion on pea evolution, including under cultivation, which he formulated as follows: "It is difficult to suppose that any single species could include in its genotypical basis all the subsequently appeared diversity of cultivated forms, from the West European hygrophylous forms to the Asian drought-prove ones, from thermophilous to withstanding temperatures of –10 °C (or sometimes lower), from day-neutral to demanding long illumination…" (Govorov, 1937, p. 240). Nowadays we know that the original genetic diversity of wild forms of the species *P. sativum* is much more than Govorov supposed (but he would hardly agree to consider them within one species). Govorov supposed that "Mutation and repeated crosses of the species *P. fulvum* and *P. elatius* with their derivative species – *P. humile* and *P. abyssinicum*, or the initial cross of only the two former species, resulted in segregation and mutation of a hybrid complex, picked up in different ancient cradles of human culture and giving rise to appearance of new diversity of cultivated forms…" (Govorov, 1937, p. 240). So, Govorov, without sufficient objective reasons, supposed, first, multiple interspecies hybridisation to take place in the natural history of the cultivated pea, and, second, multiple independent domestication.

L.I. Govorov formulated the arguments in favour of isolation of the Asian subspecies as follows: "In South-East Asia, in one of the primary cradles… of formation of a number of crops, a diversity was concentrated of the pea cultivated forms described by us… and attributed to ssp. *asiaticum* of the species *P. sativum* s. a. A more detailed study of forms of this subspecies with the complex use of the methods of physiology, anatomy and genetics, managed to reveal their hybrid origin from the cross of the species *P. elatius* and *P. fulvum*" (Govorov, 1937, p. 240). It should be noted that the results mentioned in the last phrase have never been published, while the very inference of participation of the gene pool of *P. fulvum* in the origin of forms attributed to subsp. *asiaticum* was not supported by modern studies.

L.I. Govorov (1937, p. 242) supposed that the subspecies including the Mediterranean and European forms, which he called *P. sativum* subsp. *commune* (*P. sativum*. subsp. *sativum* in the modern sense) originated "while departing from the two… ancient centres of cultivated pea, the Asian and Transcaucasian, westwards to the Mediterranean [Средиземье]" by means of gradual missing the complex of "such dominant pea characters as small flower size, its flavonic coloration, brown marbled pattern of seeds, often combined with violet specks and a black hilum, strong serration of leaflet margins". Thus Govorov actually combined all, without exception, 'primitive' cultivated pea forms into the subspecies *asiaticum*, and the 'advanced' forms, in fact having undergone systematic selection, to the subspecies "*commune*". This point of view corresponds to his (Govorov, 1928) erroneous supposition that the pea culture originated in Afghanistan, in view of revealing the greatest diversity of cultivated peas in this region. In fact, the pea, one of the founder crops, was domesticated in 'Fertile Crescent' (Zohary, Hopf, 2000; Weiss, Zohary, 2011), that is in the Mediterranean in the sense of Govorov. The greater genetic diversity of cultivated peas in Afghanistan as compared to Anterior Asia is partly associated with their persistence under conditions of primitive agriculture in Afghanistan, while the diversity in Anterior Asia could be partly lost during longer and more 'advanced' agriculture, and

partly could arise *de novo* already under cultivation (Kosterin, 2015). Note that the mountainous relief of Afghanistan favours isolation of local populations (including those of crops) and hence genetic diversification.

Enough is said above to refrain from recognition of the subspecies *P. sativum* subsp. *asiaticum*, which has neither reliable diagnostic characters nor a distinct geographical range and was isolated solely as a widest set of 'primitive' (that is not undergone directional selection) cultivated forms, up to its authors' notions what 'primitive' is. So, *P. sativum* L. subsp. *asiaticum* Govorov should be considered a later synonym of *P. sativum* L. subsp. *sativum*,

***Pisum sativum* L. subsp. *sativum* = *Pisum sativum* L. subsp. *asiaticum* Govorov,**

while a diverse set of accessions attributed to it by L.I. Govorov (1928, 1937) and R.Kh. Makasheva (1979) hardly deserves a taxonomical fixation at any rank.

Jomard's Pea (*Pisum jomardii* Schrank)

The exact translation of the name *Pisum jomardii* into English would be 'Jomardius' Pea', since the Latin singular, genitive case ending *-ii* corresponds to the ending *-ius* in the nominative case, that is the name was derived from a previously latinised surname, *Jomardius*. For simplicity we, however, will speak on Jomard's Pea.

Under the name *P. jomardii* local cultivated forms from Egypt were described (Schrank, 1818) differing by a rather characteristic complex of external characters: small flowers with a narrow, apically truncated, dirty-violet (pale-greenish pink at withering) standard and narrow dirty-purple (dirty-pink at withering) alae, whole-margined leaflets, an anthocyanin semiring at the stipulae (Makasheva, 1979).

Of this taxon, we have at our disposal accessions VIR3424, VIR3429 (Egypt) and VIR3439 (Egypt, Asuan) received from VIR, where R.Kh. Makasheva worked. The plants grown up in the greenhouse of the Institute of Cytology & Genetics SB RAS, Novosibirsk, had unbranched stems, narrow, pointed leaflets and stipulae, one pair of leaflets in the plant lower part, two pairs since node 7 to 12, singular anthocyanin ring at the stipula base (phenotype A, D^{co}), clear-cut, rather numerous aerial cameras on blade organs (phenotype Fl), flowering since node 20, totally 29–32 nodes in the stem, the first peduncle 2.5 cm in length, further shortening, small pale-pinkish flowers with somewhat elongate petals (especially the alae), the standard with rather conspicuous violet veins, pods without a spongeous inner layer and outer neoplastic pustules (phenotype np), non-dehiscing (phenotype dpo, the key character of a cultivated pea), small seeds with smooth (phenotype gty) texta of an evenly olivaceous colour without pattern (phenotype m, u, fs). I also incline to attribute to the taxon considered the accession VIR3171, originating from "Madrid Botanical Garden" (the actual origin unclear), with the same characters except for well expressed lateral branches. The evenly olivaceous seeds are the most conspicuous external character of this taxon (unfortunately, the seeds are not mentioned in the original description by Schrank (1818)).

Later authors recognised the taxon in question retaining its name but at lower ranks: variety (Govorov, 1937; Makasheva, 1979) or subspecies (Alefeld, 1866; Hedrick et al., 1928; Kosterin, Bogdanova, 2008). Govorov (1937, p. 283–284) attributed it to his Asiatic subspecies as "*P. sativum* subsp. *asiaticum* var. *Jomardi* (Schrank pr. sp.) Gov." (note an erroneous spelling with single 'i'), while Makasheva (1979) – to the Persian group of varieties of the same subspecies, as *P. sativum* subsp. *asiaticum* convar *persicum* Govorov var. *jomardii* (Schrank) Alefeld. However H. Lamprecht (1956) claimed synonymy of *P. jomardii* with '*P. arvense*' basing on fertility of reciprocal hybrids suggesting identical karyotypes and absence of deviations in segregation of markers. Taking into account that the latter 'species' is a synonym of *P. sativum* (Makasheva, 1979; Maxted, Ambrose, 2001), this implies synonymy of *P. jomardii* and *P. sativum*.

Maybe the Jomard's pea would not worth mentioning here if 'the problem of Jomard's pea' was not created earlier by ourselves, by assuming it at the subspecific rank again (Kosterin, Bogdanova, 2008), as "*Pisum sativum* L. subsp. *jomardii* (Schrank) Kosterin stat. n." That (erroneous) authorship of the combination occurred because of our fallacy that this name had not earlier been used at the subspecific rank, while it was used so before, as '*Pisum sativum jomardii*', by Alefeld (1866) and Hedrick et al. (1928). The reason why we ascribed one of so many and diverse traditional local pea landraces such a high rank consisted in its having a plesiomorphic, electrophoretically more mobile allelic variant of seed albumin SCA^f. This variant occurs in about a half of representatives of the wild subspecies *P. sativum* subsp. *elatius* and in all representatives in two other pea species – wild *P. fulvum* Sibth. et Smith and cultivated *P. abyssinicum* A. Br. (Kosterin, Bogdanova, 2008; Zaytseva et al., 2017), but not found in *P. sativum* subsp. *sativum* (with two exceptions probably resulting from germplasm contamination) (Kosterin, Bogdanova, 2008). With this allele, the Jomard's pea has combination D of three diagnostic molecular markers (Kosterin et al., 2010). We (Kosterin, Bogdanova, 2008) supposed this taxon to be an independently domesticated in Egypt 'missing link' between our conventional evolutionary lineages A and B, both represented in *P. sativum* subsp. *elatius*, in contrast to *P. sativum* subsp. *sativum* entirely belonging to the lineage B (Kosterin, Bogdanova, 2008; Kosterin et al., 2010). Consistently assuming the character 'wild/cultivated' as taxonomical and a principle to accept paraphyletic taxa in pea, followed in the system by Maxted and Ambrose (2001), we granted the subspecific rank also to the Jomard's pea (Kosterin, Bogdanova, 2008).

Later in a hybridological analysis we found out that accession VIR3439, representing the Jomard's pea, was fully reproductively compatible with the common cultivate pea in both reciprocal directions (Bogdanova et al., 2014) while its plastidic genome had a deletion in the *psbA-trnH* spacer characteristic for *P. sativum* subsp. *sativum* (Zaytseva et al., 2012, 2017). This circumstance practically excludes domestication of the Jomard's pea in Egypt independently from the Near Eastern (Kurdic) domestication centre, which would imply a broad distribution of this deletion among wild peas over East Mediterranean, which is not the case (Zaytseva et al., 2017).

More plausible looks secondary introgression of the plesiomorphic alele SCA^f into the local cultivated pea because of a spontaneous cross with *P. sativum* subsp. *elatius*, *P. abyssinicum*, or even *P. fulvum* (surely a very rare but still possible event). Hedrick et al. (1928) considered the Jomard's pea

as close to *P. abyssinicum* – a cultivated plant endemic for Yemen and Ethiopia, which is presently considered a product of hybridisation between *P. sativum* and *P. fulvum* (Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2010; Kosterin, 2017). Of external characters, they share small habitus, small pale flowers, absence of any pattern on the seed testa (so in most representatives of *P. abyssinicum*) and of the pod neoplasia. Taking into account the territorial proximity of Ethiopia and Egypt, one can suppose that the history of the Jomard's pea included introgression from *P. abyssinicum*, or even that the Jomard's pea is yet another descendant from the same hybridisation event which gave rise to *P. abyssinicum* itself. In this respect it is interesting that in Sudan (which is situated just between Ethiopa and Egypt), cultivated pea landraces occur (e. g. accession JI281) belonging to the evolutionary lineage B, as normally in *P. sativum* subsp. *sativum*, but with gritty seed testa (phenotype Gty). This character is common in the wild *P. sativum* subsp. *elatius* but extremely rare in the cultivated peas, known only from Sudan and Canary Islands (Michael Ambrose, pers. comm.; Zaytseva et al., 2017). This may be another sign of introgression of 'wild' alleles into cultivated peas in North Africa.

Hence, presently I, following Govorov (1937), Lamprecht (1956) and Makasheva (1979), do not consider the Jomard's pea deserving a subspecific rank. It is reasonable to return to its treatment as a variety (although considering taxonomical ranks below subspecies is not so useful). It was considered for the first time at this rank by L.I. Govorov (1937, p. 283–284, see above). As a cultivated representatives of *P. sativum,* and taking into account that I, following Maxted and Ambrose (2001) do not recognise the subspecies *P. sativum* subsp. *asiaticum*, this variety should be attributed to the subspecies *P. sativum* subsp. *sativum*. According to Article 49 of the International Code of Nomenclature of algae, fungi and plants (2012), the authorship of a variety does not change when it is transferred to another subspecies, so the correct name for this taxon is as follows:

***Pisum sativum* L. subspecies *sativum* variatio *jomardii* (Schrank) Govorov.**

Our previous paper (Zaytseva et al., 2017, p. 1419) mentioned (as "broadly accepted") the combination "*Pisum sativum* subsp. *sativum* var. *jomardii* (Schrank) Alefeld)", again with an erroneous authorship ascribed to Alefeld, who did not consider this taxon in the rank of variety.

Hedrick et al. (1928) indicated a controversy between the original description of *P. jomardii* by Schrank (1818) (flowers white with pinkish alae, one pair of leaflets) and the later description of "*Pisum sativum jomardii*" by Alefeld (1866) mentioning a coloured flower and two leaflet pairs. Having no possibility to evaluate differences between plants described in the second last century other than by concise descriptions, I would nevertheless note that both characters are rather quantitative – pea plants with one pair of leaflets often have leaves with two pairs in the upper part of their stem (so in most wild peas and in the representatives of the Jomard's pea studied by us), and the pinkish alae in the flowers of Schrank's plants evidenced that the anthocyanin synthesis was not suppressed in them (phenotype A), while the pigmentation intensity may vary even in related forms (in our Jomard's pea plants it was quite pale).

Conclusion

As recently as in 2011, Coyne et al. (2011, p. 243) wrote on the genus *Pisum*: "There is general agreement over the number of taxa and less agreement in their rank". Recognition of taxa at the rank of species and subspecies in *P. sativum* (the only species of *Pisum* in which subspecies were described) and is especially discrepant. For this reason, the online resource Integrated Taxonomic Information System (2017) does not recognise subspecies in *P. sativum*, although it does recognise varieties. (It should be noted, however, that (i) such comprehensive systems are compiled by those who are not experts in taxonomy of any particular genus and species and cannot be free of errors, and (ii) solutions as to any botanical names made in such systems are not validly published and cannot be considered as taxonomical novelties). The widely accepted system by Maxted and Ambrose (2001) recognises only two subspecies in *P. sativum* based on an artificial but very practical character: being wild (*P. sativum* subsp. *elatius*) versus cultivated (*P. sativum* subsp. *sativum*). It could be supposed that these authors may have insufficiently taken into account the taxonomical contributions by Russian authors (Govorov, 1937; Makasheva, 1979). However, the above consideration of three presumed cultivated subspecies of pea lead us to their downgrading to varieties or pure synonymisation, and hence to the conclusion coinciding with that by Maxted and Ambrose (2001) that only one cultivated subspecies of the common pea is worth recognition: *P. sativum* subsp. *sativum*. The same conclusion was recently made from the AFLP analysis by Dyachenko et al. (2017) who showed, both in dendrograms and by principle component analysis, a continuous variation of cultivated pea accessions from the collection of Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), which earlier served as a basis for the work by Govorov (1937) and Makasheva (1979).

Acknowledgements

The work is supported by project No. 0324-2016-0001 at the Institute of Cytology & Genetics SB RAS, Novosibirsk.

The author is grateful to Elena Y. Vlasova for the help in analysis of the pollen fertility of hybrid plants, to Vera S. Bogdanova for critically reading the text and to the anonymous reviewer for useful comments.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

References

Alefeld F. Landwirthschaftliche Flora. VIII. Berlin. 1866.

Berdnikov V.A., Bogdanova V.S., Rozov S.M., Kosterin O.E. Formation of diversity of histone H1 genes in the course of cultural evolution of pea. In: Vavilovskoe Nasledie v Sovremennoy Biologii. Moscow: Nauka Publ., 1989;72-89. (in Russian)

Berdnikov V.A., Bogdanova V.S., Rozov S.M., Kosterin O.E. Geographic patterns of histone H1 allelic frequencies formed in the course of *Pisum sativum* L. (pea) cultivation. Heredity. 1993;71:199-209. DOI 10.1038/hdy.1993.125.

Blixt S. Mutation genetics in *Pisum.* Agri Hort. Genet. 1972;30:1-293.

Bogdanova V.S., Kosterin O.E., Yadrikhinskiy A.K. Wild peas vary in their cross-compatibility with cultivated pea (*Pisum sativum* subsp. *sativum* L.) depending on alleles of a nuclear-cytoplasmic incompatibility locus. Theor. Appl. Genet. 2014;127:1163-1172. DOI 10.1007/s00122-014-2288-9.

Coulot P., Rabaute P. Monographie de Leguminosae de France. 4. Tribus des Fabeae, des Cicereae et des Genisteae. Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest. 2016;46:1-902.

Coyne C.J., McGee R.J., Redden R.J., Ambrose M.J., Furman B.J., Miles C.A., Genetic adjustment to changing climate: pea. In: S.S. Yadav, J.H. Redden, H. Lotze-Campen, A.J. Hall (Eds.) Crop Adaptation to Climate Change. N. Y.: John Wiley & Sons, 2011;238-250.

Dyachenko E.A., Ryzhova N.N., Kochieva E.Z., Vishnyakova M.A. Molecular genetic diversity of the pea (*Pisum sativum* L.) from the Vavilov Research Institute collection by the AFLP analysis. Russ. J. Genet. 2017;50:916-924. DOI 10.7868/S0026898415040023.

Ellis T.H.N., Poyser S.J., Knox M.R., Vershinin A.V., Ambrose M.J. Polymorphism of insertion sites of *Ty1-copia* class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. Mol. General Genet. 1998;260:9-19. DOI 10.1007/PL00008630.

Govorov L.I. Pea of Afghanistan (on the problem of the origin of the cultivated pea). Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding. 1928;19: 497-522. (in Russian)

Govorov L.I. Pea. Kulturnaya flora SSSR. Vol. IV. Grain legumes. Moscow: Gosudarstvennoe izdatelstvo sovkhoznoi i kolkhoznoi literatury, 1937;229-336. (in Russian)

Hedrick U.P., Hall F.R., Hawthorn L.V., Berger A. The Vegetables of New York: Report of the New York State Agricultural Experiment Station for the Year During Ending June 30, 1928. Vol. 1. Pt. 1. Peas of New York. Albany: J.B. Lyon Company, Printers, 1928.

Integrated Taxonomic Information System, online resource, 2017. www.itis.gov. Accessed 05.08.2017.

International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Oberreifenberg: Koeltz Scientific Books, 2012.

Jing R., Vershinin A., Grzebota J., Shaw P., Smýkal P., Marshall D., Ambrose M.J., Ellis T.H.N., Flavell A.J. The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. BMC Evol. Biol. 2010;10:44. DOI 10.1186/1471-2148-10-44.

Kosterin O.E. Pea (*Pisum sativum* L.): the uneasy fate of the first genetical object. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Beeding. 2015;19(1):13-26. DOI 10.18699/VJ15.002. (in Russian)

Kosterin O.E. Abyssinian pea (*Lathyrus schaeferi* Kosterin nom. nov. pro *Pisum abyssinicum* A. Br.) is a problematic taxon. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(2):158-169. DOI 10.18699/VJ17.234. (in Russian)

Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum* L. as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. Genet. Res. Crop Evol. 2008;55:735-755. DOI 10.1007/s10722-007-9281-y.

Kosterin O.E., Bogdanova V.S., Gorel F.L., Rozov S.M., Trusov Yu.A., Berdnikov V.A. Histone H1 of the garden pea (*Pisum sativum* L.): composition, developmental changes, allelic polymorphism and inheritance. Plant Sci. 1994;101:189-202. https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90255-0.

Kosterin O.E., Bogdanova V.S., Kechin A.A., Zaytseva O.O., Yadrikhinskiy A.K. Polymorphism in a histone H1 subtype with a short N-terminal domain in three legume species (Fabaceae, Fabaeae). Mol. Biol. Rep. 2012;39:10681-10695. DOI 10.1007/s11033-012-1959-3.

Kosterin O.E., Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Ambrose M. New data on three molecular markers from different cellular genomes in Mediterranean accessions reveal new insights into phylogeography of *Pisum sativum* L. subsp. *elatuis* (Beib.) Schmahl. Genet. Res. Crop. Evol. 2010;57:733-739. DOI 10.1007/s10722-009-9511-6.

Lamprecht H. Zur Artberechtigung *Pisum elatius* Stev. und *Jomardi* Schrank. Agri Hort. Genet. 1956;14:5-18.

Lehmann C. Das morphologische system der Saarerbsen. Der Züchter. 1954;24:316-337.

Lehmann C., Blixt S. Artificial infraspecific classification in relation to phenotypic manifestation of certain genes in *Pisum*. Agri Hort. Genet. 1984;42:48-74.

Makasheva R.Kh. Flora of Cultivated Plants. Vol. IV. Grain legumes. Pt. I. Pea. Leningrad: Kolos Publ., 1979. (in Russian)

Maxted N., Ambrose M. Peas (*Pisum* L.). In: Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 39. N. Maxted, S.J. Bennett (Eds.). Dordrecht: Kluw. Acad. Publ., 2001;181-190.

Mendel G. Versuche über Plflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn. Bd. IV für das Jahr 1865 (Abhandlungen). 1866:3-47.

Schaefer H., Hechenleitner P., Santos-Guerra A., Menezes de Sequeira M., Pennington R.T., Kenicer G., Carine M.A. Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages. BMC Evol. Biol. 2012;12:250. DOI 10.1186/1471-2148-12-250.

Schrank F. Flora Monacensis. T. 4. Monachii, 1818.

Singh R.J. Plant Cytogenetics. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2003.

Vershinin A.V., Allnutt T.R., Knox M.R., Ambrose M.J., Ellis T.H.N. Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution, and domestication. Mol. Biol. Evol. 2003;20(12):2067-2075. DOI 10.1093/molbev/msg220.

Weiss E., Zohary D. The Neolithic Southwest Asian founder crops, their biology and archaeobotany. Curr. Anthropol. 2011;52:S237-S254. DOI 10.1086/658367.

Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Kosterin O.E. Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecies levels in the genus *Pisum* (L.) (peas) using a histone H1 gene. Gene. 2012;504:192-202. http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.05.026.

Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Mglinets A.V., Kosterin O.E. Refinement of the collection of wild peas (*Pisum* L.) and search for the area of pea domestication with a deletion in the plastidic *psbA-trnH* spacer. Genet. Resour. Crop Evol. 2017;64:1417-1430. DOI 10.1007/s10722-016-0446-4.

Zaytseva O.O., Gunbin K.V., Mglinets A.V., Kosterin O.E. Divergence and population traits in evolution of the genus *Pisum* L. as reconstructed using genes of two histone H1 subtypes showing different phylogenetic resolution. Gene. 2015;556:235-244. http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.11.062.

Zhukovskiy P.M. Cultivated plants and their relatives (systematics, geography, ecology, origin, use). 2nd ed. Moscow: Kolos Publ., 1964. (in Russian)

Zohary D., Hopf M. Domestication of Plants in the Old World. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 2000.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):701-709
DOI 10.18699/VJ17.288

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки: протокол

И.Е. Пристяжнюк[1], А.Г. Мензоров[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

Возможность репрограммирования генома млекопитающих активно исследуется более полувека. В 1962 г. Гёрдон впервые показал возможность репрограммирования генома дифференцированной клетки факторами энуклеированного ооцита. В 2006 г. Яманака получил индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) мыши из фибробластов с помощью всего лишь четырех транскрипционных факторов: Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc. Получение ИПСК поставило вопрос о полноте репрограммирования: остаются ли активными гены, экспрессирующиеся в исходных фибробластах? И насколько характеристики ИПСК соответствует эмбриональным стволовым (ЭС) клеткам, которые в данном случае являются стандартом. В настоящее время ИПСК получены для десятков видов животных, однако ЭС клетки – менее чем для двадцати. В 1993 г. в Институте цитологии и генетики СО РАН были получены ЭС клетки ценного пушного зверя – американской норки (*Neovison vison*), благодаря чему появилась уникальная возможность сравнить индуцированные и полученные из эмбриона плюрипотентные клетки. В 2015 г. нами получены ИПСК американской норки и показано репрограммирование генома фибробластов на уровне анализа экспрессии генов: часть генов была успешно репрограммирована, часть имела промежуточную между фибробластами и ЭС клетками экспрессию, часть не репрограммировалась, и наконец, присутствовали гены, экспрессия которых отличалась от обоих типов клеток. Таким образом, еще для одного вида животных стало возможным изучать плюрипотентность и дифференцировку на двух типах плюрипотентных клеток: ЭС и ИПСК. В настоящей статье представлен подробный протокол получения ИПСК американской норки с использованием векторов, несущих гены *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* и *c-MYC* человека. Кратко описан необходимый набор методов анализа: морфология ИПСК, цитогенетический анализ, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией на присутствие «маркирующих» плюрипотентность генов и тест на формирование тератом в иммунодефицитных мышах. Данный протокол позволяет воспроизводимо и эффективно получать ИПСК из фибробластов американской норки.

Ключевые слова: ИПСК; плюрипотентность; *Neovison vison*; американская норка.

Generation of American mink induced pluripotent stem cells: a protocol

I.E. Pristyazhnyuk[1], A.G. Menzorov[1, 2]

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

Mammalian genome reprogramming has been studied for more than half a century. First, Sir John Gurdon showed the possibility of differentiated cell genome reprogramming by enucleated oocyte factors in 1962. Dr. Shinya Yamanaka produced induced pluripotent stem (iPS) cells from mouse fibroblasts by the use of just four transcription factors in 2006: Oct4, Klf4, Sox2, and c-Myc. Generation of iPS cells put a question about the reprogramming completeness: do genes derived from fibroblasts retain their expression? And are the features of iPS cells in compliance with those of embryonic stem (ES) cells that serve as a standard? To date, iPS cells have been produced for tens of species, while ES cells, for less than twenty. In 1993 American mink (*Neovison vison*) ES cells were produced in the Institute of Cytology and Genetics SB RAS. That created a unique opportunity for comparison of induced and embryo-derived pluripotent cells. In 2015 we produced American mink iPS cells and showed fibroblast genome reprogramming at the level of gene expression and divided genes into four groups: reprogrammed, with intermediate expression, non-reprogrammed, and the ones with a "novel" expression pattern. Thus, an opportunity to study pluripotency and differentiation on two pluripotent cell types, ES and iPS cells, was added for one more species. In this article we present a detailed protocol for generation of American mink iPS cells with human *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, and *c-MYC* genes. In addition, we briefly describe necessary methods for their analysis: morphology, cytogenetic analysis, PCR with reverse transcription for the presence of pluripotency "marker" genes, and teratoma formation test in immunodeficient mice. This protocol allows reliable and efficient generation of American mink iPS cells from embryonic fibroblasts.

Key words: iPS cells; pluripotency; *Neovison vison*; American mink.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
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

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Pristyazhnyuk I.E., Menzorov A.G. Generation of American mink induced pluripotent stem cells: a protocol. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):701-709. DOI 10.18699/VJ17.288 (in Russian)

Received 27.07.2017
Accepted for publication 14.08.2017
© AUTHORS, 2017

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 других видов открыло новую страницу в изучении плюрипотентности, эмбрионального развития и дифференцировки. Простота методического подхода позволила к настоящему времени получить ИПСК для десятков видов. В то же время эмбриональные стволовые (ЭС) клетки, которые можно считать стандартом плюрипотентности, получены менее чем для 20 видов.

В Институте цитологии и генетики СО РАН в 1993 г. были впервые получены ЭС клетки американской норки (Sukoyan et al., 1993). В 2015 г. нами получены ИПСК американской норки, и, таким образом, появилась уникальная возможность сравнения полученных из эмбриона и индуцированных плюрипотентных клеток на новом, сравнительно мало исследованном виде (Menzorov et al., 2015). Ключевые транскрипционные факторы, позволяющие индуцировать плюрипотентность в геноме дифференцированных клеток, достаточно консервативны, что позволяет использовать для репрограммирования дифференцированных клеток различных видов гены человека, например для получения ИПСК собаки (Baird et al., 2015). Так, представленная система репрограммирования генома с минимальными модификациями была успешно применена нами для получения ИПСК как человека и мыши (неопубл. данные), так и американской норки. Мы предполагаем, что дифференцированные клетки других видов также могут быть репрограммированы после незначительной модификации данного протокола. Ниже представлен подробный и эффективный протокол получения ИПСК американской норки из эмбриональных фибробластов с использованием набора лентивирусных векторов, несущих гены *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* и *c-MYC* человека.

Материалы

Перечисленные ниже реагенты можно заменять на аналогичные от других производителей, поэтому для части пластиковых расходных материалов производитель не указан. В разделе «Ожидаемые результаты» необходимые материалы приведены в тексте.

- Среда DMEM с 4.5 г/мл глюкозы и GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32430-100).
- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- Среда MEM α с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32571-093).
- FBS (fetal bovine serum – сыворотка крови телят) для ЭС клеток (Thermo Fisher Scientific, 16141079).
- FBS (Thermo Fisher Scientific, 10270106).
- KSR (knockout serum replacement – нокаутный заменитель сыворотки) (Thermo Fisher Scientific, 10828-028).
- GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 35050038).
- NEAA (non-essential amino acid – ненезаменимые аминокислоты) (Thermo Fisher Scientific, 11140050).
- Пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122).
- Трипсин-ЭДТА 0.25 % (Thermo Fisher Scientific, 25200-056).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Желатин (Sigma, G1890).
- Митомицин С (Sigma, M4287).
- Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific, 11058021).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000008).
- 2-меркаптоэтанол (Amresco, Am-0482-0.1).
- Полибрен (Merck Millipore, TR-1003-G).
- Вальпроевая кислота, натриевая соль (Sigma-Aldrich, P4543).
- Параформальдегид (Sigma-Aldrich, 158127).
- Планшет 12-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 721.110).
- Планшет 6-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 720.113).
- Чашка Петри диаметром 100 мм, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 702.115).
- Стерильные серологические пипетки объемом 5, 10 и 25 мл.
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0.5 и 1.5 мл.
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0.22 мкм (Jet Biofil, FPV203030).
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0.45 мкм (Jet Biofil, FPV403030).
- Шприц пластиковый стерильный, 10 мл.
- Шприц пластиковый стерильный, 1 мл, с иглой 26GX5/8.
- Пробирки стерильные, 5 мл (Axygen, SCT-5ML-S).
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Криопробирки, 1.8 мл (SSIbio, 6222-S0).
- Гипохлорит натрия («Белизна», «Domestos гель»).
- Пакеты для отходов автоклавируемые, класс «Б».
- Обработанные митомицином С эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 (фидерные клетки) (см. протокол приготовления в разделе «Подготовка материалов»).
- Клетки линии Phoenix-AMPHO (ATCC, CRL-3213), Phoenix-ECO (ATCC, CRL-3214), Phoenix-GP (ATCC, CRL-3215) или 293T (ATCC, CRL-3216).
- Эмбриональные фибробласты *Neovison vison* (эмбрионы предоставлены О.В. Трапезовым).
- Лентивирусные упаковочные плазмиды и векторы: pMDLg/pRRE (Addgene, 12251), pRSV-Rev (Addgene, 12253), pCMV-VSV-G (Addgene, 8454), pLeGO-G2 (Addgene, 25917), pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2 и pLeGO-hc-MYC (векторы предоставлены С.В. Киселевым).

Подготовка материалов

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, 1X пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования клеток линии Phoenix (среда для Phoenix): среда DMEM/F12, 10 % инактивированной 30 мин при 56 ° C FBS, 1X GlutaMAX, 1X NEAA, 1X пенициллин-стрептомицин. Среду Phoenix можно использовать и для культивирования фибробластов мыши.

ВАЖНО! Считается, что для эффективной наработки лентивирусов необходимо инактивировать комплемент в FBS, поэтому сыворотка подвергается тепловой инактивации.

- Среда для культивирования эмбриональных фибробластов американской норки (ЭФН) (среда для ЭФН): среда MEM α, 15 % FBS, 1X пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования ИПСК американской норки (среда для ИПСК): среда MEM α, 15 % FBS для ЭС клеток, 1X GlutaMAX, 1X NEAA, 1X 2-меркаптоэтанол, 1X пенициллин-стрептомицин.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- Желатин: приготовить 1 % водный раствор и проавтоклавировать. Рабочий раствор – 0.1 % в НФБ. Покрыть пластиковые чашки Петри или планшеты 0.1 % желатином и поместить на 37 °C не менее чем на 30 мин. Убрать желатин и добавить среду для культивирования клеток.
- Среда для заморозки клеток млекопитающих: 90 % KSR и 10 % ДМСО. Вместо KSR можно использовать FBS. Среду для заморозки можно однократно замораживать на –20 °C, при +4 °C хранить не более двух недель.
- Вальпроевая кислота: развести 81.31 мг в 5 мл автоклавированной бидистиллированной воды (100 мМ), профильтровать через фильтр 0.22 мкм, аликвотировать и заморозить на –20 °C. Рабочая концентрация 1 мМ.

ВАЖНО! После разморозки вальпроевую кислоту не хранить при +4 °C больше суток. В среду для культивирования добавлять свежие аликвоты вальпроевой кислоты.

- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор X500).
- Гипохлорит натрия (дезинфицирующий раствор): приготовить 20 % раствор «Белизны» или «Domestos гель», хранить не более недели.
- Параформальдегид 1 %: нагреть 4/5 объема НФБ до ~60 °C при помешивании, добавить 1 % параформальдегида и несколько капель 1 M NaOH, растворить, долить НФБ и довести с помощью HCl pH до 6.9. Аликвотировать и заморозить на –20 °C.
- Приготовление фидерных клеток: развести митомицин C в воде до 200 мкг/мл, рекомендуемая рабочая концентрация 10 мкг/мл, мы используем 5 мкг/мл. Обработать эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 из эмбрионов стадии 13.5 дней (получены из ЦКП «SPF-виварий» ФИЦ ИЦиГ СО РАН) на втором-третьем пассаже митомицином C в течение 2–3 ч. Трижды промыть клетки НФБ, снять трипсином-ЭДТА, инактивировать трипсин средой с FBS (не менее чем одним объемом), подсчитать количество клеток, центрифугировать, заморозить аликвоты в среде для заморозки (от 1 до 5 млн кл./мл). За день до использования фидерных клеток разморозить в среде для ЭФМ, рассадить на желатинизированные чашки Петри в концентрации 15 тыс. кл./см^2. Один из вариантов протокола получения фидерных клеток из эмбрионов мыши описан в работе (Takahashi et al., 2007).

ВАЖНО! Митомицин C очень токсичен для клеток, поэтому необходимо промыть клетки НФБ не менее трех раз.

Оборудование

Для большей части оборудования производитель не указан, так как можно использовать приборы разных производителей. Криоконтейнер также может быть заменен на аналогичный.

- Ламинарный шкаф II класса защиты.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Пипеточный дозатор 0.5–100 мл.
- Криоконтейнер (Thermo Fisher Scientific, 5100-0001).
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0.5 и 1.5 мл.
- Центрифуга для пробирок 10 и 50 мл.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 °C).
- Термостат на 37 °C.
- Холодильники на –80 °C, –20 °C и +4 °C.
- Инвертированный микроскоп.
- Автоклав.
- Криохранилище с жидким азотом.
- Водяная баня.
- Проточный цитофлуориметр.

Протокол получения ИПСК американской норки

Ниже приведен протокол получения ИПСК американской норки по дням. Несколько общих замечаний по протоколу:

- Общая схема эксперимента представлена на рис. 1. День заражения лентивирусами (трансдукции) назван днем 0, номер пассажа клеток с этого дня – также 0.
- Культивирование клеток производится в CO_2-инкубаторе при 5 % CO_2 и 37 °C. Среды, НФБ и трипсин-ЭДТА хранятся при +4 °C, перед работой с клетками прогреваются до комнатной температуры. При наработке лентивирусов в клетках Phoenix и при разморозке клеток среда прогревается до 37 °C.
- Работа с клетками проводится в стерильных условиях в ламинарном шкафу II класса защиты.
- Площадь лунки 12-луночного планшета составляет около 4 см^2, 6-луночного планшета – 10 см^2, а чашки Петри диаметром 10 см – 55 см^2, для культивирования добавлять 1, 2 или 10 мл среды соответственно.
- Работа с лентивирусами опасна и требует соблюдения техники безопасности, необходимо обязательно проконсультироваться со специалистами. Базовые рекомендации приведены по указанным ниже ссылкам (http://www.ohsu.edu/xd/about/services/integrity/policies/upload/IBC-EHRS-Form_Lentiviral-Vector-Safety-Manual.doc; http://ehs.uky.edu/docs/pdf/bio_viral_vectors_0001.pdf).

День –6. Разморозка ЭФН. Разморозка клеток Phoenix

Разморозка ЭФН

1. Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФН.
2. Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭФН и поместить на водяную баню на 37 °C. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

ВАЖНО! Криопротектор ДМСО токсичен для клеток, разморозка проводится при 37 °C быстро, чтобы минимизировать время взаимодействия с ДМСО.

3. Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить

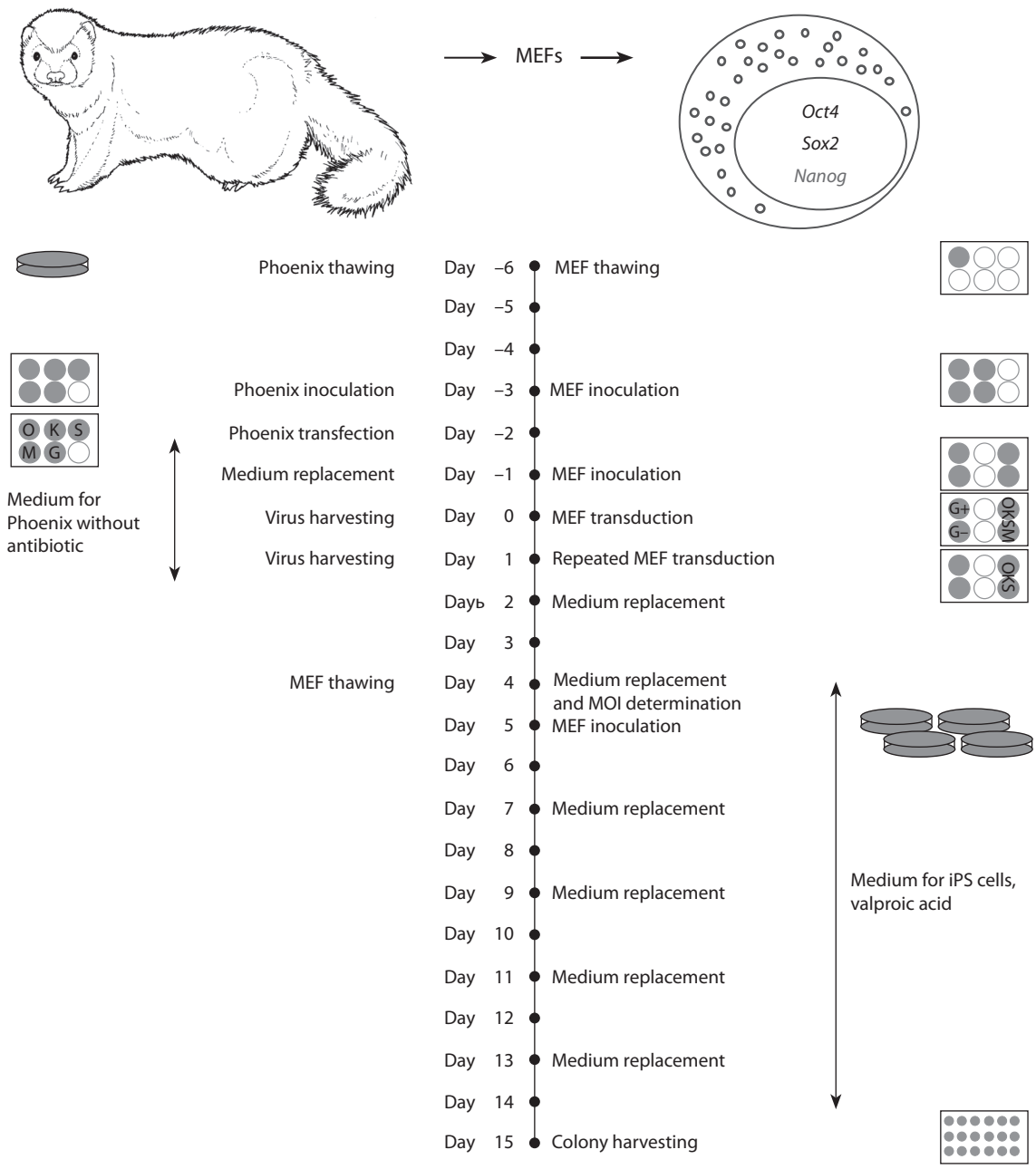


Fig. 1. Derivation of American mink iPS cells from embryonic fibroblasts.

на 6-луночный планшет с 2 мл среды на лунку. Площадь рассадки должна соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку. Например, при заморозке ЭФН с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (около 10 см^2) разморозку также проводить на одну ячейку.

4. Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

ВАЖНО! В зависимости от количества замороженных клеток и эффективности разморозки можно культивировать ЭФН и в другом удобном режиме. Важно на день –1 получить культуру ЭФН с плотностью 70–95 %. Пересев клеток нужно вести при плотности 80–95 %. Считается, что клетки на ранних пассажах более эффективно репрограммируются в ИПСК.

Разморозка клеток Phoenix

5. Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для Phoenix.
6. Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с клетками Phoenix и поместить на водяную баню на 37 °C. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.
7. Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на 6-луночный планшет с 2 мл среды на лунку (или чашку Петри с 10 мл среды). Площадь рассадки может соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку, или быть больше.
8. Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

День –3. Пересадка ЭФН. Пересадка клеток Phoenix

Пересадка ЭФН

9. ЭФН должны иметь плотность 70–95 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить трипсин-ЭДТА, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки, и перенести в термостат на 37 °C. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.
10. После округления клеток ресуспендировать в 20–30-кратном избытке среды для ЭФН до образования суспензии единичных клеток и рассадить в соотношении (1:2)–(1:4).

ВАЖНО! Клетки не должны пересыхать. Если добавлено слишком много трипсина-ЭДТА, необходимо после открепления клеток от пластика добавить равный объем среды для ЭФН, ресуспендировать до одноклеточной суспензии, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать осадок, ресуспендировать в среде и рассадить.

Пересадка клеток Phoenix

11. Убрать культуральную среду, аккуратно промыть НФБ, не допуская открепления клеток, добавить трипсин-ЭДТА, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки, и перенести в термостат на 37 °C. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.
12. После округления клеток ресуспендировать в 20–30-кратном избытке среды для клеток Phoenix до образования суспензии единичных клеток и рассадить по 0.7–1.3 млн кл./10 см^2 на 5 лунок желатинизированного 6-луночного планшета (см. рис. 1). Число клеток необходимо подобрать заранее так, чтобы на день –2 плотность Phoenix была 70–90 %.

ВАЖНО! Клетки не должны пересыхать. Если добавлено слишком много трипсина-ЭДТА, необходимо после открепления клеток от пластика добавить равный объем среды для клеток Phoenix, ресуспендировать до одноклеточной суспензии, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать осадок, ресуспендировать в среде и рассадить.

День –2. Трансфекция клеток Phoenix

13. Добавить в 1.5 мл пробирку 625 мкл Opti-MEM I и 28 мкл Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать.

ВАЖНО! Мы используем среднее количество Lipofectamine 3000 от рекомендованных производителем минимального и максимального, т. е. 5.6 мкл на лунку 6-луночного планшета.

14. Добавить в пять 1.5 мл пробирок по 125 мкл Opti-MEM I, смесь упаковочных плазмид pMDLg/pRRE, pRSV-Rev и pCMV-VSV-G и, в индивидуальные пробирки, векторы pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2, pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hc-MYC и pLeGO-G2 (всего 2.5 мкг ДНК), перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать. Добавить по 5 мкл реагента P3000 (входит в комплект Lipofectamine 3000), перемешать на вортексе несколько секунд и быстро сбросить на центрифуге.

ВАЖНО! Соотношение количества ДНК плазмид следующее: pRSV-Rev : pMDLg/pRRE : pCMV-VSV-G : Vector = = 5 : 10 : 2 : 10. На лунку 6-луночного планшета необходимо 2.5 мкг ДНК и 5 мкл P3000. Рекомендуем заранее приготовить смесь упаковочных плазмид и выравнять концентрации векторов.

15. Добавить смесь ДНК и P3000 к раствору Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд, подождать 10–15 мин.
16. Аккуратно поменять среду клеткам Phoenix на среду для Phoenix без добавления пенициллина-стрептомицина (2 мл среды на лунку 6-луночного планшета), клетки не должны отслоиться от поверхности.

ВАЖНО! Считается, что антибиотики токсичны при трансфекции клеток, поэтому рекомендуется проводить трансфекцию без антибиотиков.

17. По каплям добавить липидные комплексы ДНК к клеткам, аккуратно перемешать покачиванием планшета и перенести в CO_2-инкубатор.

День –1. Пересадка ЭФН. Смена среды клеткам Phoenix

Пересадка ЭФН

18. Рассадить ЭФН на три (или больше) лунок 6-луночного планшета в концентрации 15 тыс. кл./см^2 (150 тыс. кл./лунку). Остатки заморозить. Одна лунка будет использоваться для определения MOI (multiplicity of infection – «число вирусов на клетку») по свечению GFP, вторая лунка – как отрицательный контроль свечения GFP и, при желании, как отрицательный безвирусный контроль получения ИПСК, остальные лунки – для получения ИПСК (см. рис. 1).
19. Заморозка ЭФН: после снятия клеток и центрифугирования осадок ресуспендировать вибрацией или в 20 мкл среды, мягко ресуспендировать в 1 мл среды для заморозки, поместить в криоконтейнер и сразу поставить на –80 °C. На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.

Смена среды клеткам Phoenix

20. Аккуратно отобрать среду в стеклянную банку с гипохлоритом натрия и добавить по 2 мл среды для Phoenix без пенициллина-стрептомицина. Не допускать пересушивания и отслоения клеток.

ВАЖНО! Для дезинфекции вирусов необходимо среды и пластик, контактировавшие с вирусами, помещать в 1 % раствор гипохлорита натрия (20 % разведение «Белизны» или «Доместос» в воде, готовить свежий раствор каждую неделю). После дезинфекции необходимо проводить автоклавирование. Автоклавирование всех выбрасываемых материалов проводится до дня 7.

День 0. Трансдукция ЭФН. Смена среды клеткам Phoenix

21. Собрать среду с лентивирусами, несущими *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* и *c-MYC* (OKSM), в пробирку 50 мл, среду с *GFP* – в пробирку 5 мл. Поменять среду клеткам Phoenix, если планируется повторная трансдукция на день 1.
22. Профильтровать среду с лентивирусными векторами OKSM через фильтр 0.45 мкм в 50 мл пробирку, добавить равный объем среды для Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

23. Профильтровать среду с лентивирусным вектором GFP через фильтр 0.45 мкм в 5 мл пробирку, отобрать в новую пробирку 0.2 мл, добавить 1.8 мл среды для Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.
24. В лунке (лунках) с ЭФН для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунке для тестирования MOI – на 10 % смесь GFP, в отрицательном контроле – на среду для Phoenix (см. рис. 1). Начиная с этого дня будущим ИПСК присваивается пассаж 0.

День 1. Трансдукция ЭФН

25. Для получения ИПСК может быть достаточно однократной трансдукции клеток лентивирусами, однако для надежности в день 1 предлагается провести повторную трансдукцию лентивирусами. Трансдукция проводится так же, как и в день 0, с минимальными изменениями: собрать среду с лентивирусами, несущими *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, но не *c-MYC*, среда с *GFP* не требуется.

ВАЖНО! Если значительная часть клеток Phoenix открепилась от поверхности, не следует использовать среду, так как титр вируса невозможно определить. Для повторной трансдукции можно использовать среду, собранную в день 0 и хранившуюся при +4 °C. Вирусы можно также замораживать на –80 °C, но при этом титр падает примерно на порядок.

26. В лунке (лунках) с ЭФН для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунках для тестирования MOI и отрицательном контроле – на среду для Phoenix.

День 2. Смена среды

27. Поменять среду во всех лунках на среду для ЭФН.

ВАЖНО! На второй день после трансдукции лентивирусами векторы эффективно экспрессируются и можно проводить определение MOI (см. день 4).

День 4. Смена среды. Разморозка фидерных клеток. Определение MOI

Смена среды

28. Поменять среду во всех лунках на среду для ИПСК с 1 мМ вальпроевой кислоты.

ВАЖНО! Вальпроевая кислота ингибирует деацетилазу гистонов и, соответственно, делает хроматин более доступным для действия транскрипционных факторов. В разных протоколах используют вальпроевую кислоту от 7 до 14 дней, в этом протоколе взят средний срок – 10 дней.

Разморозка фидерных клеток

29. Желатинизировать необходимое число чашек Петри (см. раздел «Подготовка реагентов»).
30. Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФМ.
31. Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭФМ и поместить на водяную баню на 37 °C. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.
32. Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные чашки Петри с 10 мл среды на лунку с плотностью 15 тыс. кл./см^2.

ВАЖНО! Необходимо заранее разморозить аликвоту фидерных клеток и на следующий день подсчитать число живых клеток, чтобы знать реальное количество клеток после разморозки.

33. Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

ВАЖНО! Фидерные клетки необходимо использовать на первый-второй день после разморозки. При необходимости пересадки клеток в день рассадки фидерных клеток должно пройти не менее трех часов после их разморозки.

Определение MOI

34. Интеграция вектора, содержащего GFP, позволяет сделать грубую оценку эффективности трансдукции остальными вирусами. Для определения MOI необходимо провести проточную цитофлуориметрию на присутствие белка GFP. Клетки с контрольной и обработанной вирусом с GFP лунок снять трипсином-ЭДТА, центрифугировать, промыть НФБ, центрифугировать, фиксировать в 1 % параформальдегиде 5 мин, центрифугировать, ресуспендировать в НФБ и определить процентное содержание клеток, имеющих GFP, на проточном цитофлуориметре.

ВАЖНО! При фиксации параформальдегидом может пропадать флуоресценция GFP. В этом случае можно использовать антитела против GFP. Кроме того, с помощью антител возможно определить также число фибробластов, зараженных, например, OCT4, и таким образом точно узнать процентное содержание клеток с интеграцией трансгена (см. протокол окраски: https://stemcells.nih.gov/research/nihresearch/scunit/facsprotocol.htm).

35. Подсчет MOI: MOI = –ln(1 – [доля GFP+ клеток]). Например, если 63.2 % клеток имели флуоресценцию GFP, MOI = –ln (1 – 0.632) = 1, т. е. в среднем один вирус на клетку или, точнее, соотношение числа вирусов к числу клеток равно единице. Так как использовалось 10 % разведение вируса, реальный MOI = 10. Сделаем качественную оценку MOI, предположив, что MOI для вирусов OKSM не отличается от такового для GFP, тогда MOI в опыте также равен 10. Разбавление среды вдвое соответственно уменьшило MOI, а вторая трансдукция – увеличила в два раза, итого, по грубой оценке, в клетках должно быть около 10 вирусных частиц. Для получения ИПСК MOI должен быть более 4.

ВАЖНО! Для увеличения эффективности трансдукции в данном протоколе используется полибрен. Если не удается достичь необходимого титра вируса, можно использовать спинокуляцию: центрифугировать клетки со средой с вирусами в 6-луночном планшете при 650 g 60 мин при 32 °C.

День 5. Пересадка ЭФН

36. Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ИПСК и свежую аликвоту вальпроевой кислоты до концентрации 1 мМ.
37. ЭФН, обработанные векторами, несущими OKSM, пересадить в соотношении 1:10 на чашки Петри с фидерными клетками в ИПСК среде. Например, клетки

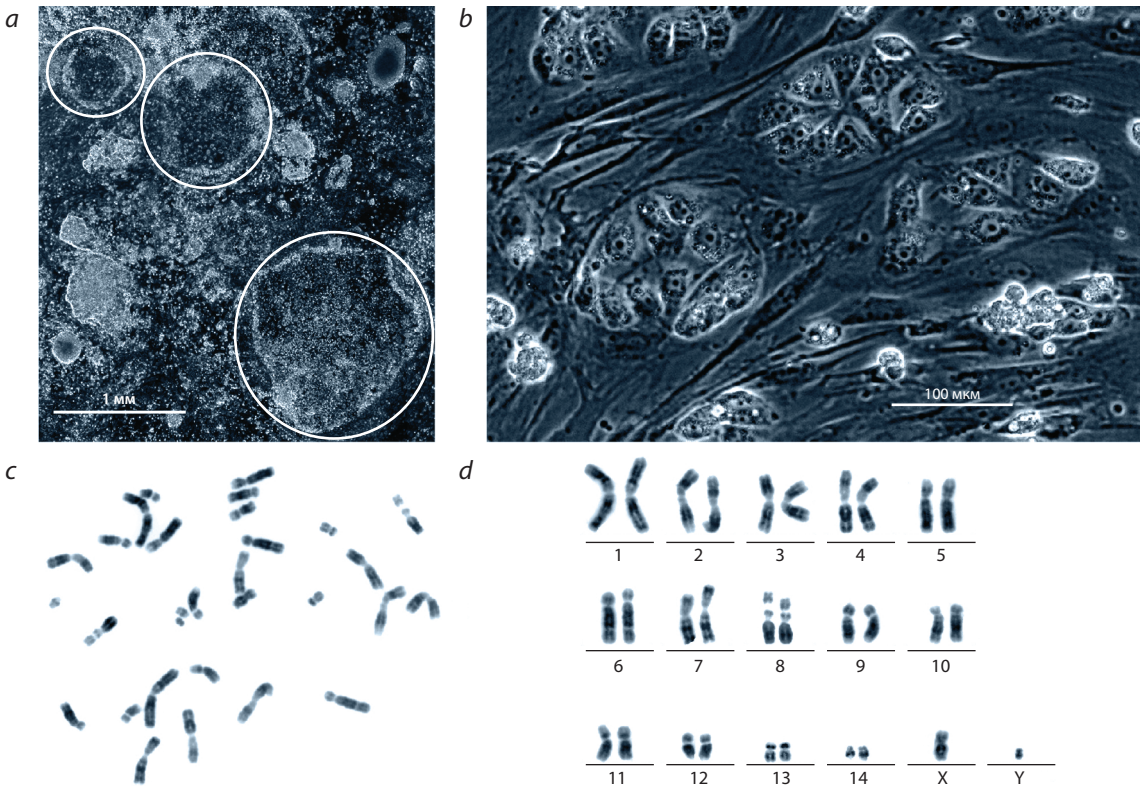


Fig. 2. iPS cell morphology and chromosome set.

(*a*) Morphology of primary iPS cell colonies on day 15. White circles indicate colonies with mink iPS cell morphology; (*b*) iPS cell colonies on days 1–2 after passage; (*c*) iPS cell metaphase plate; (*d*) iPS cell chromosome set.

с одной лунки 6-луночного планшета перенести на две чашки Петри.

ВАЖНО! Если колоний ИПСК будет слишком много, к моменту снятия они могут начать сливаться. В этом случае необходимо использовать большее разведение клеток.

Дни 7–11. Смена среды

38. Каждый второй день проводить смену среды на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.

ВАЖНО! Если колонии слишком маленькие для снятия, продолжать культивирование без добавления вальпроевой кислоты.

День 13. Смена среды. Разморозка фидерных клеток

39. Сменить среду на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.
40. Разморозить фидерные клетки на необходимое число желатинизированных 12-луночных планшетов.

День 15. Снятие колоний ИПСК

41. Ко дню 15 на чашках Петри должны быть десятки–сотни колоний, из них около половины с морфологией, соответствующей ИПСК (рис. 2, *a*). Отметить тонким маркером снизу чашки Петри колонии с морфологией ИПСК для снятия.
42. Убрать среду с фидерных клеток, промыть НФБ, добавить по 1 мл среды для ИПСК без вальпроевой кислоты на лунку 12-луночного планшета.
43. Нанести на новые чашки Петри капли НФБ (~50 мкл) и трипсина-ЭДТА (~20 мкл).
44. Обвести выбранные колонии иглой шприца на 1 мл, сковырнуть индивидуальным пластиковым носом на 200 мкл и перенести в 10 мкл среды в каплю НФБ. После переноса серии колоний индивидуальными пластиковыми носами перенести колонии из буфера в трипсин-ЭДТА и инкубировать 10 мин при 37 °C.
45. Ресуспендировать колонии в 50 мкл среды для ИПСК и перенести в лунку с фидерными клетками. Покачивая плато, равномерно распределить клетки по лункам. С этого момента номером пассажа ИПСК считается 2, каждая пересадка добавляет номер пассажа. При заморозке номер пассажа не меняется, единица прибавляется при разморозке.

Дни 16–30. Размножение и характеристика ИПСК

46. Менять среду на среду для ИПСК раз в два дня.
47. При достижении плотности более 90 % или при изменении морфологии колоний (появление дифференцированных клеток, появление «пузырей» и плавающих «шаров») проводить пересадку ИПСК американской норки. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА, поместить на 10 мин на 37 °C.
48. Добавить один объем среды для ИПСК, ресуспендировать, центрифугировать при 300 g 3 мин, рассадить на фидерные клетки в соотношении (1:2)–(1:12) в зависимости от плотности клеток.

49. После получения достаточного количества клеток заморозить ИПСК: после снятия клеток и центрифугирования осадок ресуспендировать вибрацией или в 20 мкл среды, мягко ресуспендировать в 1 мл среды для заморозки, поместить в криоконтейнер и сразу поставить на –80 °C. На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.
50. Параллельно с заморозкой можно проводить анализ ИПСК (см. раздел «Ожидаемые результаты»).

Ожидаемые результаты

Морфология ИПСК. В эксперименте можно получить десятки колоний ИПСК. Морфология ИПСК должна соответствовать плюрипотентным клеткам американской норки (Sukoyan et al., 1993; Menzorov et al., 2015). На рис. 2, *б* показаны маленькие колонии ИПСК. Колонии монослойные, при перерастании начинают формироваться плавающие полые «шары», пересадку клеток следует делать, не допуская этой стадии. ИПСК американской норки содержат круглые гранулы, вероятно липидные. Эти гранулы хорошо видны в отраженном свете.

Цитогенетический анализ. Следующий этап характеристики ИПСК – анализ кариотипа, который у американской норки имеет 30 хромосом (см. рис. 2, *в*, *г*). По нашим наблюдениям, хромосомный состав плюрипотентных клеток норки стабилен по сравнению с ЭС клетками мыши. Для получения препаратов метафазных хромосом ИПСК американской норки за 3–4 ч до фиксации в среду добавить колцемид (Sigma-Aldrich, 10295892001) в концентрации 0.1 мкг/мл. Клетки промыть НФБ и снять с чашки Петри с помощью 0.25 % трипсина-ЭДТА. Трипсин инактивировать средой для ЭФН. Суспензию клеток перенести в 10 мл пробирку и центрифугировать при 300 g 5 мин. Супернатант слить, к осадку добавить 3 мл гипотонического раствора (0.56 % KCl) и инкубировать при 37 °C 20 мин. После этого к суспензии добавить 100 мкл свежеприготовленного фиксатора (метанол : уксусная кислота в соотношении 3:1). Клетки центрифугировать при 300 g 5 мин, слить супернатант. К осадку аккуратно добавить 2 мл охлажденного фиксатора и выдержать на льду 20 мин. Клетки ресуспендировать и центрифугировать при 300 g 5 мин, осадок ресуспендировать в 1–1.5 мл фиксатора, повторить процедуру. Полученную суспензию клеток раскапать на обезжиренные охлажденные мокрые предметные стекла (Thermo Scientific Menzel-Gläser, 76 × 26 мм) и высушить в потоке горячего воздуха.

Для анализа метафазных пластинок препараты окрасить раствором DAPI (Sigma-Aldrich, D9542) (2 мг/мл в НФБ), накрыть покровным стеклом, под которое поместить несколько капель антифэйда ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific, P36934). Метафазные пластинки анализировать на флуоресцентном микроскопе, оснащенном камерой для съемки препаратов. Для анализа хромосомного состава произвести подсчет хромосом на 50 метафазных пластинках, 20 из которых использовать для кариотипического анализа. Хромосомный состав анализировать согласно номенклатуре, предложенной в (Mandahl, Fredga, 1975). В анализе используются митотические пластинки округлой формы, хромосомы в которых лежат отдельно, без большого числа наложений, при этом на препарате вблизи метафазных пластинок не должно быть отдельных, свободно лежащих хромосом.

Анализ плюрипотентности. Для подтверждения плюрипотентности ИПСК используется ОТ-ПЦР-анализ на «маркирующие» плюрипотентность гены и тест на формирование тератом в иммунодефицитных мышах. Дополнительно можно проверить, произошло ли ожидаемое в плюрипотентных клетках замолкание внесенных в геном трансгенов.

Для выявления экспрессии генов выделить суммарную РНК из клеток с помощью Aurum Total RNA mini kit (Bio-Rad, 732-6820) или TRI Reagent (Sigma-Aldrich, T9424) в соответствии с рекомендациями производителя, обработать ДНКазой I (Fermentas, #EN0521) и синтезировать кДНК (Fermentas, #1612). Затем произвести амплификацию транскриптов генов *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* и эндогенного контроля *Hprt* и *Gapdh* (см. таблицу). Условия амплификации: начальная денатурация при 95 °C 3 мин, 30 циклов из 95 °C – 15 с, 58 °C – 15 с, 72 °C – 30 с и заключительная элонгация в течение 3 мин. Плюрипотентные клетки американской норки экспрессируют маркеры плюрипотентности *Nanog*, *Sox2* и *Oct4*.

В плюрипотентных клетках происходит замолкание лентивирусных вирусных последовательностей, в том числе введенных вирусами трансгенов. Поскольку в

Primers for RT-PCR

Gene	Forward prime	Reverse primer	Amplicon size, bp.
Nanog (*N. vison*)[1]	TGCAGAGGAGAGAACTGGGA	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	137
Oct4 (*N. vison*)[1]	GATCAGCCACATTGCCCAG	CGTTGCGAATAGTCACTGCT	159
Sox2 (*N. vison*)[1]	CCATCTCCGTGGTCTTCTTT	ATTACCAACGAAGTCAACCT	131
c-MYC (*H. sapiens*)[2]	TGCCTCAAATTGGACTTTGG	GATTGAAATTCTGTGTAACTGC	192
KLF4 (*H. sapiens*)[2]	GCCACCCACACTTGTGATT	TCCACTCACAAGATGACTCAGT	408
Hprt (*N. vison*)[3]	CTTTGCTGACCTGCTGGATT	CACCAATGACTTTGATGTCCC	134
Gapdh (*N. vison*)[3]	AATGCCTCCTGTACCACCAA	GGTCATGAGTCCCTCCACAA	84

References: [1] (Menzorov et al., 2015); [2] (Mathew et al., 2010); [3] (Rouvinen-Watt et al., 2012).

качестве трансгенов были использованы гены человека, можно их специфически амплифицировать, не затрагивая гомологи американской норки. В таблице приведены праймеры для специфической амплификации генов *KLF4* и *c-MYC* человека.

Тест на формирование тератом. Плюрипотентные клетки способны образовывать тератомы с клетками – производными всех трех зародышевых листков, при введении иммунодефицитным мышам. Несмотря на критику (Buta et al., 2013), тератомный тест широко применяется для анализа плюрипотентности клеток различных видов, в том числе ЭС клеток и ИПСК американской норки.

Для получения тератом использовать стандартный протокол (Hogan et al., 1994). От 5 до 15 млн ИПСК в среде для ИПСК подкожно инъецировать иммунодефицитным мышам линии SCID в загривочную область. Через две-три недели после инъекции проводится анализ выросших до диаметра 0.5–1 см тератом (Hentze et al., 2009; Кизилова, 2016). Плюрипотентные клетки должны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков, но единичные тератомы могут не иметь все типы клеток, поэтому желательно анализировать не менее трех тератом на линию клеток.

Заключение

Представленный протокол получения ИПСК американской норки позволяет быстро получить плюрипотентные клетки, которые можно использовать в исследованиях раннего развития американской норки, изучения плюрипотентности и, в дальнейшем, для трансгенеза. Полученные нами ИПСК и ЭС клетки американской норки депонированы и доступны в ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» ФИЦ ИЦиГ СО РАН (http://ckp.icgen.ru/cells/; http://cells.biores.cytogen.ru/cells/).

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-00644, and by the program of the development of bioresource collections, Federal Agency for Scientific Organizations. Use of Shared Access Center equipment was supported by the Russian Federation Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.
The authors are grateful to S.L. Kiselev (Institute of General Genetics, Moscow) for kindly provided lentiviral vectors and to O.V. Trapezov for kindly provided American mink embryos. The authors acknowledge the work of the staff of the Shared Access Center SPF vivarium (RFMEFI61914X0005 and RFMEFI62114X0010); Shared Access Center for Microscopic Analysis of Biological Objects, Siberian Branch of the RAS, Shared Access Center for Flow Cytometry; and Shared Access Center “Collection of Human and Mammalian Pluripotent Cell Cultures for General Biology and Biomedicine, ICG, Novosibirsk. The authors thank M.S. Pristyazhnyuk for the drawing of an American mink.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

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.

Buta C., David R., Dressel R., Emgård M., Fuchs C., Gross U., Healy L., Hescheler J., Kolar R., Martin U., Mikkers H., Müller F.J., Schneider R.K., Seiler A.E., Spielmann H., Weitzer G. Reconsidering pluripotency tests: do we still need teratoma assays? Stem Cell Res. 2013;11(1):552-562. DOI 10.1016/j.scr.2013.03.001.

Hentze H., Soong P.L., Wang S.T., Phillips B.W., Putti T.C., Dunn N.R. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. Stem Cell Res. 2009; 2(3):198-210. DOI 10.1016/j.scr.2009.02.002.

Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy L. Manipulating the Mouse Embryo. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Kizilova E.A. Optimization of the teratoma formation test. Geny i kletki = Genes & Cells. 2016;11(2):119-128. (in Russian)

Mandahl N., Fredga K. Q-, G- and C-band patterns of the mink chromosomes. Hereditas. 1975;81(2):211-220.

Mathew R., Jia W., Sharma A., Zhao Y., Clarke L.E., Cheng X., Wang H., Salli U., Vrana K.E., Robertson G.P., Zhu J., Wang S. Robust activation of the human but not mouse telomerase gene during the induction of pluripotency. FASEB J. 2010;24(8):2702-2715. DOI 10.1096/fj.09-148973.

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.

Rouvinen-Watt K., Harris L., Dick M., Pal C., Lei S., Mustonen A.M., Nieminen P. Role of hepatic *de novo* lipogenesis in the development of fasting-induced fatty liver in the American mink (*Neovison vison*). Br. J. Nutr. 2012;108(8):1360-1370. DOI 10.1017/S0007114511006775.

Sukoyan M.A., Vatolin S.Y., Golubitsa A.N., Zhelezova A.I., Semenova L.A., Serov O.L. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. Mol. Reprod. Dev. 1993;36(2):148-158. DOI 10.1002/mrd.1080360205.

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.

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. 2017;21(6):710-716
DOI 10.18699/VJ17.26-o

Роль гена *pAbp*, кодирующего цитоплазматический поли(А)-связывающий белок, в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*

Е.У. Болоболова ✉, Э.М. Баричева, Н.В. Дорогова

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

Поли(А)-связывающий белок (PABP) *Drosophila melanogaster* относится к цитоплазматическим PABP, участвующим в контроле инициации и терминации трансляции мРНК, сохранении ее стабильности, цитоплазматическом полиаденилировании/деаденилировании, деградации мРНК. Несмотря на всестороннюю структурную и биохимическую характеристику цитоплазматических PABP, относительно мало известно об их участии в процессах развития и дифференцировки. Вследствие того что большинство генов, кодирующих необходимые для сперматогенеза *Drosophila* белки, транскрибируется в первичных сперматоцитах, предполагают, что развитие сперматид определяется отложенной трансляцией, в регулировании которой участвует белок PABP. Утрата PABP приводит к гибели эмбрионов. Сочетание некоторых мутантных аллелей гена *pAbp D. melanogaster* является тканеспецифичным и приводит к нарушению сперматогенеза и стерильности самцов. Ранее были выявлены и описаны дефекты мейоза и цитокинеза, нарушения структуры небенкерна в сперматогенезе гипоморфных мутантов *pAbp*. Опубликованные данные дают возможность судить о действии мутантных аллелей *pAbp* на отдельные события сперматогенеза, но не охватывают весь процесс. Целью настоящей работы было детальное цитологическое исследование влияния гена *pAbp* на сперматогенез *D. melanogaster* с помощью флуоресцентной световой и электронной микроскопии. Показано, что начальное действие мутации гена *pAbp* на структуру клеток проявилось на стадии первичных сперматоцитов. Первичной структурной мишенью мутации был митохондриальный аппарат клеток. Изменение морфологии митохондрий мутанта *pAbp* включало набухание, уменьшение плотности матрикса и редукцию количества крист. Далее действие мутации проявилось плейотропно, вызвало нарушение формирования и деления небенкерна, образования аксиальных комплексов и привело к остановке сперматогенеза на стадии элонгации цист. На основании результатов проведенных исследований можно сделать вывод, что белок PABP *D. melanogaster* участвует во многих событиях сперматогенеза и играет критически важную роль в структурной дифференцировке гамет в спермиогенезе.

Ключевые слова: дрозофила; сперматогенез; ультраструктура; мутация *pAbp*; цитоплазматический поли(А)-связывающий белок (PABP).

The role of the *pAbp* gene encoding the cytoplasmic poly(A)-binding protein in spermatogenesis of *Drosophila melanogaster*

E.U. Bolobolova ✉, E.M. Baricheva, N.V. Dorogova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The *Drosophila melanogaster pAbp* gene encodes the cytoplasmic poly(A)-binding protein (PABP). Cytoplasmic PABPs participate in the metabolic pathways of the mRNA: translation initiation and termination, cytoplasmic polyadenylation/deadenylation, mRNA stability, mRNA degradation. Despite the extensive biochemical and structural characterization, relatively little is known about the biological roles of PABPs in the processes of cellular development and differentiation. In *Drosophila* spermatogenesis, posttranscriptional mechanisms of gene regulation play an important role, so cytoplasmic PABP can have significant function in this process. Deletion of PABP leads to embryonic lethality. However, some flies carrying combinations of mutant *pAbp* alleles survive but display male sterility and show defects in spermatogenesis. It has previously been shown that hypomorphic *pAbp* mutations cause a number of meiotic defects, abnormalities of Nebenkern formation. These data provide an insight into the effect of *pAbp* mutation on the individual events of spermatogenesis, but they do not cover the entire process. We studied spermatogenesis in *pAbp* allele heterozygotes by transmission electron and fluorescent light microscopy. We showed that cellular mitochondria were the primary structural target of the mutation. Abnormal mitochondria were less structured, swollen, had transparent matrix and depleted cristae. Further mutation had a polymorphous effect and induced anomalies in the ultrastructure of mature spermatocytes, defects in Nebenkern formation and division, axial complex formation, shutdown of spermatogenesis during spermatid elongation. Thus our data show a significant role of PABP in structural transformations of male germ cells during entire spermatogenesis.

Key words: *Drosophila*; spermatogenesis; ultrastructure; *pAbp* mutation; cytoplasmic poly(A)-binding protein (PABP).

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Болоболова Е.У., Баричева Э.М., Дорогова Н.В. Роль гена *pAbp*, кодирующего цитоплазматический поли(А)-связывающий белок, в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):710-716. DOI 10.18699/VJ17.26-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Bolobolova E.U., Baricheva E.M., Dorogova N.V. The role of the *pAbp* gene encoding the cytoplasmic poly(A)-binding protein in spermatogenesis of *Drosophila melanogaster*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):710-716. DOI 10.18699/VJ17.26-o

Received 21.12.2016
Accepted for publication 16.03.2017
Online 23.06.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: elbol@bionet.nsc.ru

Поли(А)-связывающие белки (PABP) эукариот относятся к важному классу регуляторных белков. Они присоединяются к 3′-концевой поли(А)-последовательности мРНК и, не обладая каталитической активностью, обеспечивают скаффолд для присоединения ключевых факторов, контролирующих функцию мРНК. Геномы различных эукариот содержат от одного до нескольких генов *pAbp*. Многолетние исследования показали, что белки семейства PABP участвуют во всех метаболических путях мРНК. В зависимости от локализации в клетке PABP разделяют на ядерные и цитоплазматические. PABP *D. melanogaster* относится к цитоплазматическим белкам. Цитоплазматические PABP участвуют в контроле инициации и терминации трансляции мРНК, сохранении ее стабильности, цитоплазматическом полиаденилировании/деаденилировании, деградации мРНК (Mangus et al., 2003; Goss, Kleiman, 2013; Gallie, 2014).

В настоящее время мало известно об участии цитоплазматических PABP в процессах развития и дифференцировки. У *Xenopus laevis* три цитоплазматических PABP имеют специфичные функции на разных стадиях раннего эмбриогенеза, и нокдаун каждого из трех генов этих белков приводит к гибели эмбрионов (Gorgoni et al., 2011). У *Saccharomyces cerevisiae* делеция гена, кодирующего единственный поли(А)-связывающий белок PAB1, летальна (Sachs et al., 1987), а у *Schizosaccharomyces pombe* поли(А)-связывающий белок spPABP, гомолог PAB1 *Saccharomyces cerevisiae*, не является жизненно необходимым (Thakurta et al., 2002). У *Caenorhabditis elegans*, имеющего два цитоплазматических PABP, две разные мутации гена *pab-1* вызывают похожие дефекты в пролиферации зародышевых клеток, но их влияние на продолжительность жизни мутантных организмов различается (Ko et al., 2010).

Ген *pAbp D. melanogaster* экспрессируется на всех стадиях развития в тканях и органах личинок и взрослых особей и может выполнять специфичную функцию в процессах, в которых важную роль играет трансляционная регуляция экспрессии генов. В оогенезе *D. melanogaster* белок PABP участвует в пространственной регуляции локализации и трансляции мРНК *gurken*, необходимых для формирования дорсо-вентральной оси яиц и эмбрионов (Clouse et al., 2008). PABP участвует в постсинаптическом трансляционном контроле долговременной пластичности личиночных нейро-мышечных синапсов *D. melanogaster* (Sigrist et al., 2000). Получена серия мутантных аллелей гена *pAbp*, характеризующихся варьирующей экспрессивностью и плейотропным эффектом в разных тканях *D. melanogaster* (Blagden et al., 2009; Pertceva et al., 2010). Сочетание некоторых мутантных аллелей гена *pAbp* тканеспецифично и приводит к нарушению сперматогенеза.

Сперматогенез – специализированный процесс, состоящий из цепочки последовательных преобразований клеток, приводящих к формированию высокодифференцированных клеток – сперматозоидов. Первичный сперматогоний проходит четыре митотических деления, образуя 16 сперматоцитов, заключенных в цисту. Сперматоциты, пройдя мейоз, образуют 64 сперматиды. После мейоза происходят значительные морфологические изменения, включающие сборку аксонем и перестройку мембран и митохондрий. Дифференцировка предшественников половых клеток требует координированного действия большого числа генных продуктов. Существуют программы координации регулирования сперматогенеза. Выявлен класс мутаций, нарушающих регулирование транскрипции. У мутантов перед делениями мейоза происходит остановка развития сперматоцитов и далее следует их гибель (White-Cooper, 2010). Гены, участвующие в сперматогенезе, обычно транскрибируются в первичных сперматоцитах. Транкрипты белков хранятся в трансляционно репрессированном состоянии до стадии их функционирования. В ядрах сперматид конденсация хроматина приводит к прекращению транскрипции (Steger, 2001; White-Cooper, 2010). Вследствие этого предполагают, что процессы, происходящие в спермиогенезе, зависят от трансляции, в регулировании которой участвует белок PABP *D. melanogaster*. Утрата функции гена *pAbp* в сперматогенезе приводит к стерильности самцов, что позволяет использовать зародышевую линию дрозофилы в качестве модели для изучения роли белка в клеточных событиях в процессе сперматогенеза. Анализ распределения в семеннике GFP-pAbp химерного белка показал, что в процессе сперматогенеза наибольшая концентрация белка PABP наблюдается в цитоплазме сперматоцитов, распределение белка неравномерно, участки наибольшей концентрации совпадают с участками локализации эндоплазматического ретикулума (Pertceva et al., 2010). Используя фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопию, S.P. Blagden с коллегами (2009) выявили и описали дефекты мейоза и цитокинеза в сперматогенезе мутантов *pAbp*. Кроме того, было показано, что мутации гена *pAbp* влияют на структуру небенкерна (Pertceva et al., 2010). Приведенные данные позволяют судить о действии мутаций на отдельные события сперматогенеза, но они не охватывают весь процесс. Электронная микроскопия дает возможность исследовать структурные нарушения внутриклеточных событий сперматогенеза начиная с ранних стадий.

Цель настоящей работы – детальное цитологическое исследование влияния гена *pAbp* на сперматогенез *D. melanogaster* с помощью флуоресцентной световой и электронной микроскопии.

Материалы и методы

Линии *D. melanogaster*, содержащие мутантные по гену *pAbp* аллели w^{1118}; $P\{EP\}pAbpEP^{310}(17261)$, y^1w^{67c23}; $P\{EPgy2\}pAbp^{EY11561}(20684)$, y^1w^{67c23}; $P\{lacW\}pAbp^{k10109}/CyO(10970)$, получены из Блумингтонского центра (Bloomington Stock Center, США). Из гетероаллельных жизнеспособных мутантов была выбрана комбинация $pAbp^{k10109}/pAbp^{EY11561}$. Данные мутации получены методом инсерционного мутагенеза в результате встройки P-элемента в некодирующую область гена: для $pAbp^{k10109}$ – 102 п. о. и $pAbp^{EY11561}$ – 762 п. о. перед старт-кодоном. Мутация $pAbp^{k10109}$ в гомозиготе летальна, а гомозиготы по $pAbp^{EY11561}$ жизнеспособны и фертильны. Однако самцы, несущие данную аллельную комбинацию (Blagden et al., 2009), были стерильны и имели наибольшее число нарушений в сперматогенезе. В качестве контроля использовали линию дикого типа *Hikone-AW*.

Условия содержания и работы с линиями дрозофил. Для работы с линиями дрозофил брали специальную

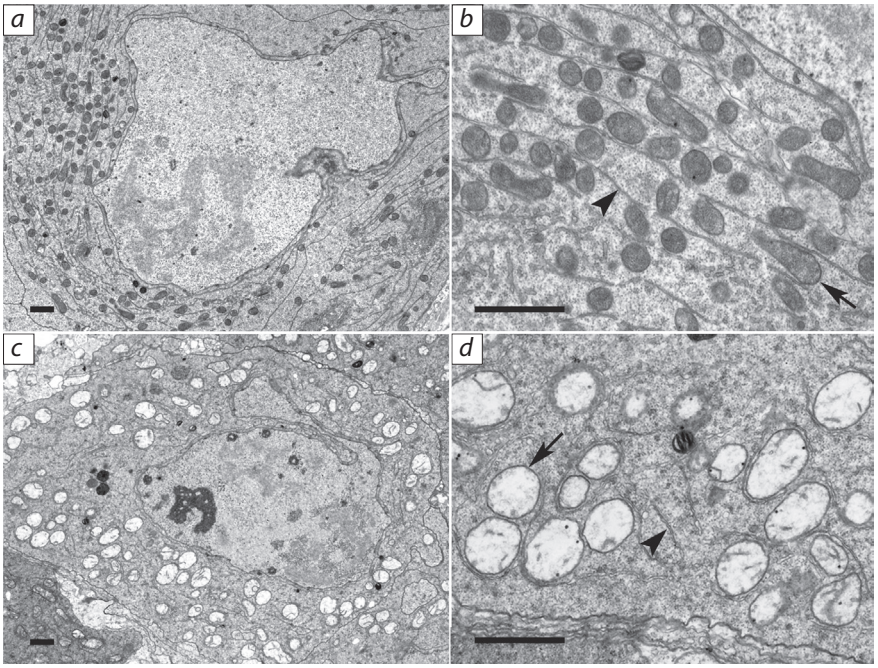


Fig. 1. Mature spermatocyte ultrastructure in wild-type Drosophila and the $pAbp^{k10109}/pAbp^{EY11561}$ mutant.

(*a*, *b*) Mitochondria (arrows) of a normal spermatocyte contain densely packed intact cristae associated with highly developed endoplasmic reticulum cisternae (arrowheads). (*c*, *d*) In a mutant spermatocyte, swollen mitochondria (arrows) with electron-transparent matrix and remnant cristae are randomly distributed over the cell. Endoplasmic reticulum (arrowheads) is poorly developed in comparison to normal cells, fragmented, and weakly ordered in the cell. Scale bar 1μm.

обогащенную среду: дрожжи (сухие) – 18 г, изюм – 40 г, агар-агар – 6–12 г, манная крупа – 36 г, патока – 50 мл, пропионовая кислота – 0.8 мл, вода – до 1 л. Скрещивания проводили в стаканах диаметром 25 мм при 25 °С.

Приготовление препаратов для электронно-микроскопического анализа. Семенники фиксировали в 2.5 % растворе глутарового альдегида в 0.1М какодилатном буфере (pH 7.2) 2 ч, дофиксировали в 1 % растворе OsO_4 в 0.1М какодилатном буфере в течение 1 ч. Зафиксированные образцы инкубировали в 1 % водном растворе уранилацетата в течение ночи при 4 °С, обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации, заключали в эпоксидную смолу Эпон. Ультратонкие срезы контрастировали в растворе цитрата свинца 5 мин. Препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-100 (Jeol, Япония).

Препараты для иммуногистохимического окрашивания готовили по (Болоболова и др., 2011).

Результаты

Электронно-микроскопический анализ. Процесс сперматогенеза в норме у *D. melanogaster* изучен на ультраструктурном уровне, результаты представлены в статьях (Stanley et al., 1972; Lindsley, Tokuyasu, 1980; Fuller, 1993). Для сравнительного анализа всех стадий сперматогенеза нами получены серии ультратонких срезов разных частей семенников мутантных и нормальных особей. Сперматогонии и ранние сперматоциты, образовавшиеся в результате митотических делений, в норме и у мутанта *pAbp* имели сходное типичное строение. Они содержали небольшое количество клеточных органелл, их цитоплазма была заполнена рибосомами и полисомами. Мелкие митохондрии лежали рядом с короткими фрагментами эндоплазматического ретикулума (ЭР). Митохондрии содержали многочисленные кристы и матрикс, имевший мелкогранулярное гомогенное строение. Первые структурные отличия у мутанта были выявлены в сперматоцитах, находящихся в фазе роста. В норме в процессе развития сперматоцитов, во время активного интерфазного синтеза, происходят рост объема клеток, увеличение количества клеточных органелл. Митохондрии делятся, увеличиваются в размере, перемещаются в цитоплазматическом пространстве, в целом сохраняя свою ультраструктуру. В зрелых сперматоцитах митохондрии колокализуются с цистернами хорошо развитого ЭР. Часть митохондрий ассоциирована с отдельными цистернами ЭР, но большинство их находится в комплексах, состоящих из паралелльных цистерн ЭР и лежащих между ними митохондрий. У мутанта в начале периода роста сперматоцитов в клетках наряду с нормальными встречались единичные более крупные митохондрии, имевшие расширенный, неравномерный по структуре матрикс. В процессе роста сперматоцитов число крупных митохондрий увеличивалось. В зрелых сперматоцитах все митохондрии имели аномальную ультраструктуру. Они выглядели «набухшими», имели неровные контуры, электронно-светлый матрикс, содержали мало крист (рис. 1). ЭР был развит хуже, чем в норме, фрагментирован, слабо упорядочен внутри клетки. Ассоциация митохондрий и ЭР была выражена более слабо по сравнению с нормой, в цитоплазме клетки встречались одиночные митохондрии, а также группы митохондрий, не связанные с ЭР.

В нормальном сперматогенезе зрелые сперматоциты проходят мейотические деления, в результате которых образуются сперматиды. В процессе развития сперматид происходят значительные структурные преобразования хондриома клеток. На начальном этапе все клеточные митохондрии собираются вместе и образуют один большой агломерат рядом с ядром. Затем митохондрии сливаются друг с другом, создавая сферическую структуру, названную небенкерном. Полностью сформированный небенкерн состоит из двух гигантских митохондрий, организованных в плотно упакованную сферу, прослоенную мембранами, подобно луковице. Далее небенкерн делится на две субъединицы – митохондриальные дериваты. Два митохондриальных деривата и аксонема ассоциируют, образуя аксиальный комплекс (рис. 2, *а*, *б*). У мутанта процесс формирования большинства небенкернов прошел с раз-

личными нарушениями: аномальное расположение митохондриальных слоев, редукция числа слоев, неполное слияние митохондрий в агломерате, приведшее к тому, что часть митохондрий осталась лежать отдельно. Все небенкерны имели электронно-светлый матрикс, содержали мало крист. После завершения деления небенкернов большинство сперматид содержали по несколько варьирующих в размере митохондриальных дериватов (рис. 2, *в*, *г*).

В процессе элонгации в норме митохондриальные дериваты и аксонема согласованно удлиняются, создавая хвостовой отдел сперматиды. Все сперматиды, находящиеся в одной цисте, проходят одновременно стадии спермиогенеза. На поперечном срезе цисты все дериваты имеют приблизительно одинаковые размер и форму (рис. 3, *а*, *б*). У мутанта срезы цист на стадии элонгации показали разнообразные ультраструктурные нарушения: митохондриальные дериваты различались по размеру, значительная часть дериватов не ассоциирована с аксонемами, аксиальные комплексы включали разное число аксонем и дериватов, часть аксонем разрушена и видна в виде фрагментов (рис. 3, *в*, *г*). Таким образом, у мутанта нарушен процесс образования аксиальных коплексов. Поздних сперматид и зрелых сперматозоидов не выявлено, следовательно, спермиогенез прекратился на стадии элонгации сперматид.

Анализ мутантного фенотипа методами световой микроскопии. Электронно-микроскопический анализ позволил выявить значительные дефекты во внутренней структуре митохондрий, вызванные мутацией *pAbp*. Однако для того чтобы представить общую картину проявления мутации в сперматогенезе, необходимо исследовать мутантный фенотип методами световой микроскопии. Мы провели цитологический анализ при помощи окрашивания семенников митотрекером (mitoTracker Red) – флуоресцентным митохондриальным маркером.

Аномалии во внутриклеточной морфологии начинают отчетливо проявляться в фазе роста сперматоцитов. В процессе роста происходит увеличение цитоплазматического объема

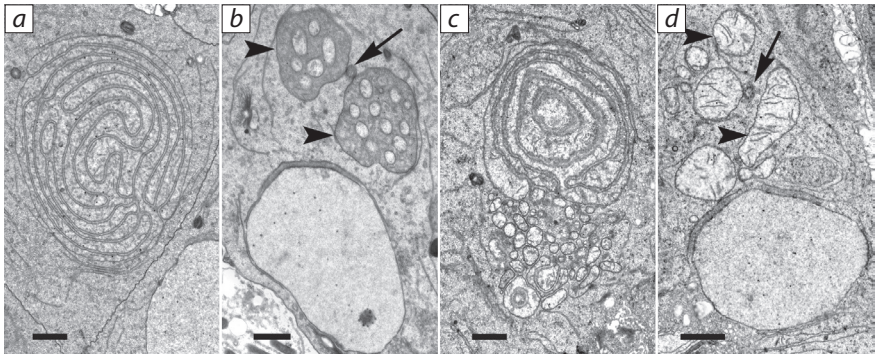


Fig. 2. Nebenkern at the onion stage. Formation of the axial complex in (*a*, *b*) wild-type Drosophila and (*c*, *d*) the $pAbp^{k10109}/pAbp^{EY11561}$ mutant.

Nebenkern: (*a*) shaped as a spherical body with concentrically lamellate inner structure; (*b*) divided into two mitochondrial derivatives (arrowheads) associated with axoneme (arrows) to form an axial complex; (*c*) with a distorted structure in mutant cells, discontinuous; (*d*) divided into several mitochondrial derivatives. Scale bar 1μm.

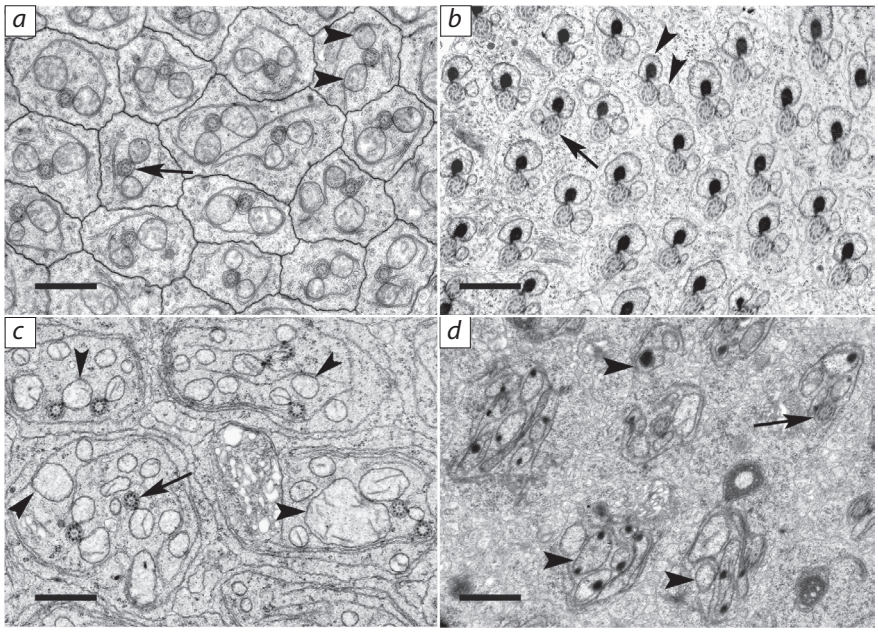


Fig. 3. Cross-section through the tail of an elongating spermatid bundle in wild-type Drosophila and in the $pAbp^{k10109}/pAbp^{EY11561}$ mutant.

(*a*, *b*) In the normal cyst, the mitochondrial derivatives (arrowheads) and axoneme (arrow) of each spermatid concordantly elongate. (*c*, *d*) In the mutant cyst, spermatids show various numbers of mitochondrial derivatives, higher than normal, most derivatives not being associated with axonemes; The axial complexes have various numbers of axonemes and mitochondrial derivatives. Scale bar 1μm.

и количества мембранных структур, в том числе митохондрий. Мутации не влияют на количество митохондрий и их способность к внутриклеточному перемещению. Но если в норме эти органеллы выявляются в виде дискретных, ярко окрашенных и плотных телец, то у мутанта они выглядят более разбухшими, слабо окрашенными и лишенными четких границ. На стадии луковицы такие митохондрии, так же как и в норме, перемещаются в определенную область цитоплазмы и формируют консолидированную структуру – митохондриальный дериват или небенкерн. В норме небенкерн имеет сферическую морфологию и равномерно окрашен. У мутанта эта структура окрашивается неоднородно, выглядит диффузной и включает участки различной плотности (рис. 4, *а*, *в*).

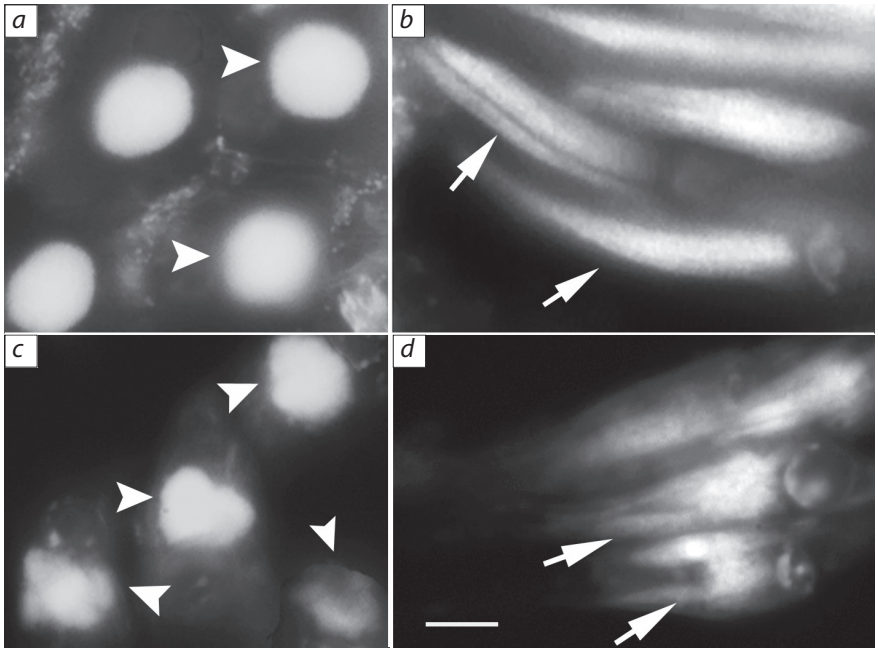


Fig. 4. Mitochondrial derivative (Nebenkern) at the (*a*, *c*) onion and (*b*, *d*) spermatid elongation stages: (*a*, *b*) wild type; (*c*, *d*) $pAbp^{k10109}/pAbp^{EY11561}$ mutant.

(*a*) Normal spherical Nebenkern morphology (arrowheads); (*b*) Nebenkern elongation (arrows). (*c*) The Nebenkern has a nonhomogeneous morphology (arrowheads). (*d*) Nebenkern elongation proceeds irregularly and incompletely (arrows). Scale bar 5 μm.

Дальнейшие события в сперматогенезе связаны с элонгацией сперматид, которая сопровождается ростом аксонемы и удлинением митохондрий (рис. 4, *б*, *г*). У мутанта в начале стадии элонгации митохондриальные дериваты не приобретают морфологию листа, характерную для нормы. Последующего равномерного удлинения митохондрий также не происходит. В редких случаях наблюдается лишь незначительное вытягивание отдельных участков. В результате аномалий на стадии элонгации образуются цисты, которые содержат не только дефектные митохондриальные дериваты, но и хаотично расположенные ядра.

Обсуждение

Рассмотрение всех стадий сперматогенеза у мутанта *pAbp* показало, что влияние мутации проявилось уже на стадии первичных сперматоцитов, находящихся в процессе интерфазного роста, а самым значительным структурным изменениям подвергся митохондриальный аппарат клеток. Первичное проявление мутации выразилось в набухании митохондрий и изменении их ультраструктуры. Аномальные митохондрии имели электронно-светлый матрикс, содержали мало крист. Митохондриальное набухание определяется как увеличение объема матрикса. Объем митохондриального матрикса контролируется осмотическим балансом между цитозолем и митохондрией. Гомеостазис митохондриального объема является клеточной функцией, необходимой для поддержания структурной целостности органеллы. При набухании митохондрий происходит увеличение их объема за счет поступления жидкости в матрикс. Сначала расширение матрикса приводит к уменьшению межмембранного пространства в кристах. Дальнейшее расширение приводит к увеличению площади внутренней пограничной мембраны, постепенному изменению формы митоходрий на сферическую и, если набухание продолжается, – к разрушению внешней мембраны (Kaasic et al., 2007). Показано, что изменение объема матрикса влияет на некоторые клеточные процессы. Увеличение объема матрикса может активировать дыхательную цепь, увеличивая продукцию аденозин-5′-трифосфата (АТФ) (Halestrap, 1987). Набухание митохондрий сопутствует высвобождению цитохрома С в процессе запуска апоптоза (Gogvadze et al., 2004). Изменение морфологии митохондрий может быть также следствием действия мутаций. К настоящему времени выделен ряд мутаций, приводящих к изменению или нарушению функционирования митохондрий и характеризующихся их набуханием, например мутации *D. melanogaster PINK1* (Poole et al., 2008), *LETM1* (McQuibban et al., 2010), *emm* (Dorogova et al., 2013). У всех мутантов набухание митохондрий сопровождалось перестройкой крист. Ультраструктурные изменения митохондрий в сперматоцитах мутанта *pAbp* подобны изменениям, описанным у мутантов *LETM1* и *emm*, но последующие структурные изменения митохондриального аппарата у всех мутантов различались. У мутанта *LETM1* набухшие митохондрии подверглись митофагии, мутация была летальна в третьем личиночном возрасте. У мутантов *pAbp* и *emm* процесс сперматогенеза продолжался с различными структурными нарушениями. В результате поздние сперматиды у мутанта *pAbp* отсутствовали, а у *emm* имели аномальное строение, приведшее к стерильности. Выявленное изменение морфологии митохондрий мутанта *pAbp*, проявившееся в набухании, уменьшении плотности матрикса и редукции количества крист, и сравнение с известными данными позволяют предположить, что мутация *pAbp* влияет на функциональную активность митоходрий. Известно, что митохондрия – полифункциональная клеточная органелла, участвующая в разнообразных процессах клеточного метаболизма. Изменение активности митохондрий может повлиять на разные внутриклеточные процессы.

Следующим структурным проявлением действия мутации *pAbp* были слабое развитие ЭР в зрелых сперматоцитах и ослабление ассоциации ЭР и митохондрий. Системы ЭР и митохондрий играют фундаментальную роль в процессе трансляции, поддержании клеточного гомеостаза и определении судьбы клетки в условиях стресса. Исследования последних лет показали важное взаимодействие этих систем. Выявлены зоны контакта между митохондриями и ЭР,

через которые происходит постоянный обмен сигналами, например ионами Ca^{2+}, регулирующими широкий спектр клеточных процессов (Pizzo, Pozzan, 2007). Получены данные о том, что зоны контактов митохондрий с трубочками ЭР могут маркировать места деления митохондрий (Friedman et al., 2011). Найдены свидетельства того, что движение митохондрий в клетке происходит совместно со специфическими районами ЭР, а некоторые клеточные сигналы эффективно синхронизируют движение органелл. Нарушения во взаимодействии митохондрий и ЭР могут активировать апоптоз (Giorgi et al., 2009). Таким образом, наблюдаемые у мутанта недоразвитие ЭР и ослабление его ассоциации с митохондриями в период роста сперматоцитов могли привести к изменению внутриклеточного морфогенеза, снижению уровня трансляции и значительно повлиять на более поздние стадии сперматогенеза.

Процесс формирования небенкерна в сперматидах включает перемещение всех клеточных митохондрий в один район возле ядра, их слияние в единую органеллу и далее формирование ее внутренней структуры. Форма митохондрий и ее изменение детерминируются динамически противоположными процессами слияния и деления органелл. В этих процессах участвуют белки цитозоля, внешней и внутренней митохондриальных мембран (Westermann, 2008; Van der Bleik et al., 2013). Выявленные нарушения структуры небенкернов у мутанта *pAbp* показали, что в большинстве случаев процесс слияния митохондрий прошел не полностью, часть митохондрий осталась лежать отдельно от общей сферической структуры, внутренняя структура большинства небенкернов имела аномальное строение, следовательно ее формирование было нарушено. Можно предположить, что мутация затронула функционирование механизмов слияния и деления митохондрий. Сравнение структурных нарушений мутантов *pAbp* и *fzo* подтверждает это предположение. Белок FZO участвует в слиянии митохондрий и является специфичным для сперматогенеза *Drosophila*. Мутация *fzo* приводит к формированию небенкерна, состоящего из нескольких субъединиц. На стадии элонгации каждая сперматида содержит по несколько удлиняющихся митохондрий, что приводит к нарушению формирования аксиальных комплексов и стерильности (Hales, Fuller, 1997). Похожий эффект наблюдался в случае мутации *pAbp*. У мутанта *pAbp* после деления небенкернов сперматиды содержали по несколько митохондрий, показаны множественные нарушения формирования аксиальных комплексов. Спермиогенез прекратился на стадии элонгации сперматид. Проведенный структурный анализ показал, что первичный морфологический эффект мутации гена *pAbp* на процесс сперматогенеза проявляется на стадии сперматоцитов, находящихся в фазе роста. Первичной структурной мишенью мутации *pAbp* является митохондриальный аппарат клеток. Далее действие мутации происходит плейотропно и вызывает серию структурных нарушений на всех последующих стадиях, в итоге приводящих к остановке сперматогенеза на стадии элонгации цист. Таким образом, белок PABP *D. melanogaster* участвует во многих событиях сперматогенеза и играет значительную роль в структурной дифференцировке гамет в процессе спермиогенеза.

Acknowledgments
This work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0003 and the Russian Foundation for Basic Research, project 16-04-01018a.

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest.

References
Blagden S.P., Gatt M.K., Archambault V., Lada K., Ichihara K., Lilley K.S., Inoue Y.H., Glover D.M. *Drosophila* Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development. Dev. Biol. 2009;334:186-197. DOI 10.1016/j.ydbio.2009.07.016.

Bolobolova E.U., Yudina O.S., Dorogova N.V. *Drosophila* tumor suppressor Merlin is essential for morphogenesis of mitochondria during sperm formation. Tsitologiya = Cytology. 2011;53(1):31-38. (in Russian).

Clouse K.N., Ferguson S.B., Schüpbach T. Squid, Cup and PABP 55B function together to regulate gurken translation in *Drosophila*. Dev. Biol. 2008;313:713-724. DOI 10.1016/j.ydbio.2007.11.00.

Dorogova N.V., Bolobolova E.U., Akhmetova K.A., Fedorova S.A. *Drosophila* male-sterile mutation emmenthal specifically affects the mitochondrial morphogenesis. Protoplasma. 2013;250(2):515-520. DOI 10.1007/s00709-012-0434-2.

Friedman J.R., Lackner L.L., West M., DiBenedetto J.R., Nunnari J., Voeltz G.K. ER tubules mark sites of mitochondrial division. Science. 2011;334:358-362. DOI 10.1126/science.1207385.

Fuller M. The Development of *Drosophila melanogaster*. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993.

Gallie D.R. Insights from a paradigm shift: how the poly(A)-binding protein brings translating mRNAs full circle. New J. Sci. 2014;2014: 1-16. DOI 10.1155/2014/873084.

Giorgi C., Stefani D., Bononi A., Rizzuto R., Pinton P. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2009;41:1817-1827. DOI 10.1016/j.biocel.2009.04.010.

Gogvadze V., Robertson J.D., Enoksson M., Zhivotovsky B., Orrenius S. Mitochondrial cytochrome c release may occur by volume-dependent mechanisms not involving permeability transition. Biochem. J. 2004;378(1):213-217. DOI 10.1042/BJ20031193.

Gorgoni B., Richardson W.A., Burgess H.M., Anderson R.C., Gavin S., Wilkie G.S., Gautier P., Martins J.P.S., Brook M., Sheets M.D., Gray N.K. Poly(A)-binding proteins are functionally distinct and have essential roles during vertebrate development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011;109(19):7844-7849. DOI 10.1073/pnas.1017664108.

Goss D.J., Kleiman F.E. Poly(A)-binding proteins: are they all created equal? WIREs RNA. 2013;4:167-179. DOI 10.1002/wrna.1151.

Hales K.G., Fuller M.T. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. Cell. 1997; 90(1):121-129. DOI 10.1016/S0092-674(00)80319-0.

Halestrap A.P. The regulation of the oxidation of fatty acids and other substrates in rat heart mitochondria by changes in matrix volume induced by osmotic strength, valinomycin and Ca^{2+}. Biochem. J. 1987; 244(1):159-164.

Kaasic A., Safiulina D., Zharkovsky A., Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. Am. J. Physiol. Cell Phisiol. 2007;292:157-163. DOI 10.1152/ajpcell.00272.2006.

Ko S., Park J.-H., Lee A.-R., Kim E., Kim J., Kawasaki I., Shim Y.-H. Two mutations in *pab-1* encoding poly(A)-binding protein show similar defects in germline stem cell proliferation but different longevity in *C. elegans*. Mol. Cells. 2010;30:167-172. DOI 10.1007/s10059-010-0103-2.

Lindsley D.L., Tokuyasu K.T. Genetics and Biology of *Drosophila*. N. Y.: Acad. Press, 1980.

Mangus D.A., Evans M.C., Jacobson A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the posttranscriptional control of gene expression. Genome Biol. 2003;4(7):223. DOI 10.1186/gb-2003-4-7-223.

McQuibban A.G., Joza N., Megighian A., Scorzeto M., Zanini D., Reipert S., Richter C., Schweyens R.J., Nowikovsky K. A *Drosophila* mutant of LETM1, a candidate gene for seizures in Wolf-Hirschhorn syndrome. Hum. Mol. Genet. 2010;19(6):987-1000. DOI 10.1093/hmg/ddp563.

Pertceva J.A., Dorogova N.V., Bolobolova E.U., Nerusheva O.O., Fedorova S.A., Omelyanchuk L.V. The role of *Drosophila* hyperplastic discs gene in spermatogenesis. Cell. Biol. Int. 2010;34(10):991-996. DOI 10.1042/CBI20100105.

Pizzo P., Pozzan T. Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. Trends Cell. Biol. 2007; 17(10):511-517. DOI 10.1016/j.tcb.2007.07.011.

Poole A.C., Thomas R.E., Andrews L.A., McBride H.M., Whitworth A.J., Leo J., Pallanck L.J. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105(5):1638-1643. DOI 10.1073/pnas.0709336105.

Sachs A.B., Davis R.W., Kornberg R.D. A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. Mol. Cell. Biol. 1987;7(9):3268-3276. DOI 10.1128/MCB.7.9.3268.

Sigrist S.J., Thiel P.R., Reiff D.F., Lachance P.E., Lasko P., Schuster C.M. Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. Nature. 2000;405(6790):1062-1065. DOI 10.1038/35016598.

Stanley H.P., Bowman J.T., Romrell L.J., Reed S.C., Wilkinson R.F. Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. J. Ultrastruct. Res. 1972;41:433-466.

Steger K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. Anat. Embriol. 2001;203:323-334.

Thakurta A.G., Yoon J.H., Dhar R. *Schizosaccharomyces pombe* spPABP, a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Pab1p, is a non-essential, shuttling protein that facilitates mRNA export. Yeast. 2002;19:795-802. DOI 10.1002/yea.876.

Van der Bleik A.M., Shen Q., Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013;5:a011072. DOI 10.1101/cshperspect.a011072.

Westermann B. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. J. Biol. Chem. 2008;283(20):13501-13505. DOI 10.1074/jbc.R800011200.

White-Cooper H. Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis. Reproduction. 2010;139:11-21. DOI 10.1530/REP-09-0083.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):717-727
DOI 10.18699/VJ17.289

Экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции в дендритных клетках человека, активированных двуцепочечной ДНК

А.С. Проскурина[1] ✉, К.Е. Орищенко[1], Е.А. Поттер[1], Е.В. Долгова[1], А.В. Спасельникова[1, 2], Г.С. Риттер[1, 2], Н.А. Вараксин[3], Т.Г. Рябичева[3], О.Ю. Леплина[4], А.А. Останин[4], Е.Р. Черных[4], С.С. Богачев[1]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[3] Акционерное общество «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия
[4] Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Одно из важнейших свойств экстраклеточной двуцепочечной ДНК, имеющее отношение к терапии различных заболеваний, – это ее способность через дендритные клетки (ДК) активировать эффекторные клетки иммунной системы (противоопухолевый и вакцинальный иммунитет). Стимулирующий эффект ДНК на ДК опосредуется через TLR9 сигнальный путь и/или через систему цитозольных сенсоров и проявляется усилением экспрессии MHC антигенов II класса и костимулирующих молекул, а также синтеза иммунорегуляторных цитокинов. В настоящей работе была исследована экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции в ДК, активированных двуцепочечной ДНК человека: (1) без использования каких-либо дополнительных факторов, (2) при использовании липофильного агента и (3) при блокировании TLR9 хлорохином. Оценка эффекта ДНК проводилась после 6- и 24-часовой экспозиции. Показано, что препарат двуцепочечной ДНК при трансфекции липофектамином активирует ДК на таком же уровне, как и Poly(dA : dT), синтетический аналог двуцепочечной ДНК. Установлено, что совместная обработка ДНК и хлорохином усиливает экспрессию генов *ИФН-α*, *ИФН-β*, *ИФН-γ*, *ИЛ-8*, *MCP1*, *VEGF*, *CD25* и *CD83* к 24 ч инкубации. Впервые показано, что геномная «self» двуцепочечная ДНК как монопрепарат активирует синтез мРНК *ИФН-α*, *ИФН-β*, *ИФН-γ*, *ИЛ-8*, *ИЛ-10* и *VEGF* в ДК к 6 часам индукции.

Ключевые слова: хлорохин; двуцепочечная ДНК; цитокины; дендритные клетки; Real-time ПЦР.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Проскурина А.С., Орищенко К.Е., Поттер Е.А., Долгова Е.В., Спасельникова А.В., Риттер Г.С., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Богачев С.С. Экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции в дендритных клетках человека, активированных двуцепочечной ДНК. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):717-727. DOI 10.18699/VJ17.289

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Potter E.A., Dolgova E.V., Spaselnikova A.V., Ritter G.S., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Expression of genes of cytokines, transcription factors and differentiation antigens in human dendritic cells activated by double-stranded DNA. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):717-727. DOI 10.18699/VJ17.289 (in Russian)

Received 09.12.2016
Accepted for publication 21.03.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: likhacheva@bionet.nsc.ru

Expression of genes of cytokines, transcription factors and differentiation antigens in human dendritic cells activated by double-stranded DNA

A.S. Proskurina[1] ✉, K.E. Orishchenko[1], E.A. Potter[1], E.V. Dolgova[1], A.V. Spaselnikova[1, 2], G.S. Ritter[1, 2], N.A. Varaksin[3], T.G. Ryabicheva[3], O.Y. Leplina[4], A.A. Ostanin[4], E.R. Chernykh[4], S.S. Bogachev[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia
[4] Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

One of the most important properties of extracellular double-stranded DNA related to the treatment of various diseases is its ability to activate effector cells of the immune system (anti-tumor and vaccinal immunity) through dendritic cells (DCs). The stimulatory effect of DNA on DCs is mediated by the TLR9 signaling pathway and/or through a system of cytosolic sensors and is manifested by increased expression of MHC class II antigens and costimulatory molecules and by increased synthesis of immunoregulatory cytokines. In this work, the expression of cytokines, differentiation antigens and transcription factor genes has been investigated in DCs activated by double-stranded human DNA (i) without any additional factors, (ii) using a lipophilic agent, and (iii) by blocking TLR9 with chloroquine. Evaluation of the DNA effect was carried out after the 6- and 24-hour exposure. It was found that the preparation of double-stranded DNA transfected by Lipofectamine 2000 boosts DCs at the same level as Poly(dA : dT), a synthetic equivalent of double-stranded DNA. It was discovered that combined application of DNA and chloroquine enhances expression of the *IFN-α*, *IFN-β*, *IFN-γ*, *IL-8*, *MCP1*, *VEGF*, *CD25*, and *CD83* genes by hour 24 of incubation. It was for the first time shown that genomic "self" double-stranded DNA as a mono agent activates mRNA synthesis of cytokines *IFN-α*, *IFN-β*, *IFN-γ*, *IL-8*, *IL-10*, and *VEGF* in DCs at 6 hours of induction.

Key words: chloroquine; double-stranded DNA; cytokines; dendritic cells; real-time PCR.

Двуцепочечная ДНК различного происхождения, в различной форме и независимо от нуклеотидной последовательности принимает участие в регуляции врожденного и адаптивного иммунитета. Показано, что двуцепочечная ДНК в форме нуклеосом (Decker et al., 2005; Yasuda et al., 2005), очищенная геномная «self» ДНК млекопитающих, бактерий, вирусов (Martin, Elkon, 2006; Shirota et al., 2006), двуцепочечная ДНК, не содержащая CpG мотивы (Suzuki et al., 1999; Shirota et al., 2006), и одноцепочечные CpG олигонуклеотиды (Krieg, 2003) способны активировать дендритные клетки (ДК) и макрофаги. Стимулирующий эффект ДНК проявляется усилением экспрессии МНС антигенов II класса и костимулирующих молекул, а также синтеза иммунорегуляторных цитокинов, что во многом определяет направленность и выраженность иммунных реакций (Suzuki et al., 1999; Ishii et al., 2001; Zhu et al., 2003; Jiang et al., 2004; Decker et al., 2005; Martin, Elkon, 2006; Shirota et al., 2006).

В настоящее время ведутся целенаправленные исследования механизмов активации адаптивного иммунитета с участием нуклеиновых кислот. Экстраклеточная self ДНК определяется в самых различных внеклеточных жидкостях организма, включая плазму, сыворотку, мочу, слюну и даже спинномозговую жидкость (Giacona et al., 1998; Anker, 2000; Тамкович и др., 2008). Источником этой ДНК могут быть соматические, ядросодержащие клетки, погибшие путем апоптоза или некроза; эритробласты, ядра которых энуклеируются в процессе дифференцировки в эритроциты; лимфоциты в процессе их апоптотической гибели после стимуляции (Stroun et al., 2001; Choi et al., 2005; Тамкович и др., 2008). Кроме того, при развитии инфекционных заболеваний в крови больных появляются нуклеиновые кислоты возбудителей (Ngan et al., 2004), а во время беременности в крови матери детектируется фетальная ДНК (Lo et al., 1997). На данный момент нет разработанной концепции оборота экстраклеточной self ДНК в жидкостных средах организма. Очевидно, что деградация до мономеров и их последующее участие в синтетических процессах клетки – самый простой путь утилизации свободной циркулирующей ДНК. Как функциональная молекула экстраклеточная ДНК может интернализоваться в клеточных компартментах и принимать участие в механизмах репаративной рекомбинации (Holmgren et al., 1999; Würtele et al., 2003; Rogachev et al., 2006; Franco et al., 2008; Alyamkina et al., 2010a). ДНК микроорганизмов или ДНК, попадающая в кровь в результате повреждения и гибели клеток, может активировать реакции врожденного и адаптивного иммунитета (Ishii, Akira, 2006, 2008; Medzhitov, 2007). Именно вопросу о механизмах активации иммунного ответа посредством различных форм ДНК и путях передачи активирующего сигнала в настоящее время уделяется наибольшее внимание (Barbalat et al., 2011; Barber, 2011a, b; Sharma, Fitzgerald, 2011).

CpG богатые нуклеиновые кислоты микроорганизмов (бактерий, вирусов) воспринимаются клетками врожденного иммунитета как чужеродные молекулы – так называемые патоген-ассоциированные молекулярные структуры (Yoneyama, Fujita, 2007). Широко известно, что ДНК, обогащенная неметилированными CpG динуклеотидами, связывается с активной формой TLR9 в кислых эндосомальных компартментах (Hemmi et al., 2000). Это связывание приводит к запуску каскада внутриклеточных последовательных взаимодействий регуляторных молекул. В результате трансдукции сигнала происходит активация транскрипционных факторов IRF3 и IRF7, что приводит к запуску транскрипции генов интерферонов первого типа. Одновременно активируется транскрипционный фактор NF-κB, который, в свою очередь, запускает транскрипцию генов провоспалительных цитокинов.

На данный момент известно, что независимо от TLR9 двуцепочечная ДНК активирует иммунокомпетентные клетки, в первую очередь ДК, к продукции интерферонов первого типа, цитокинов, хемокинов (Ishii et al., 2001, 2006; Jiang et al., 2004; Kis-Toth et al., 2011). Активирующим началом обладают как геномная self ДНК из подвергшихся апоптозу или поврежденных клеток организма, так и экзогенные геномные или синтетические фрагменты двуцепочечной ДНК, независимо от последовательности. Предполагается, что в этом случае активация ДК происходит за счет взаимодействия фрагментов двуцепочечной ДНК с системой цитозольных сенсоров (Takeshita, Ishii, 2008; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Unterholzner et al., 2010; Barbalat et al., 2011; Barber, 2011a, b; Sharma, Fitzgerald, 2011; Алямкина и др., 2013).

Как известно, основой развития антиген-специфического иммунного ответа является межклеточная, цитокин-опосредованная кооперация с участием целого ряда эффекторных и регуляторных клеток иммунной, кроветворной и других систем организма. Ключевую роль при этом играют ДК, которые являются «профессиональными» антиген-презентирующими клетками, способными индуцировать иммунный ответ против различных антигенов, включая опухолевые и вирусные антигены. Эффективность запуска иммунных реакций во многом зависит от уровня экспрессии на ДК антигенов гистосовместимости II класса и костимулирующих молекул, а также спектра продуцируемых ими цитокинов и хемокинов. В работе (Barber, 2011b) установлено, что двуцепочечная ДНК активирует ДК и макрофаги, а также клетки эндотелия и эпителия, что проявляется усилением синтеза интерферонов первого типа и провоспалительных цитокинов. Для активации иммунокомпетентных клеток использовалась синтетическая двуцепочечная ДНК, которая искусственно интродуцировалась в цитоплазму. В другой работе (Huang et al., 2005) для активации ДК использовалась геномная ДНК *Brucella abortus*. Показано, что нативная геномная двуцепочечная ДНК бактерии активировала ДК к синтезу цитокинов (ИЛ-12) без дополнительных факторов, аналогично материалу бактерий после их термической обработки (HKBA heat-killed *B. abortus*). Сравнение активирующего влияния геномной ДНК *B. abortus* и материала бактерий после их термической обработки демонстрирует, что для равного активирующего влияния в случае нативной ДНК требуется в 50 раз большее ее количество по сравнению с ДНК в составе HKBA. Для обоих вариантов активации показана необходимость функционирования системы передачи сигнала MyD88 и активной формы TLR9 в кислых эндосомальных компартментах.

В наших исследованиях было показано, что двуцепочечная геномная self ДНК естественным путем (т. е. без

применения каких-либо трансфецирующих агентов) эффективно активирует ДК человека миелоидного типа, генерированные *ex vivo* из моноцитов крови, что проявляется усилением экспрессии активационных и дифференцировочных антигенов, аллостимуляторной активности ДК в смешанной культуре лимфоцитов и способности ДК индуцировать пролиферацию перфоринсодержащих цитотоксических Т-лимфоцитов (Alyamkina et al., 2010a, b, 2012; Orishchenko et al., 2013). Было показано также, что препарат двуцепочечной ДНК человека стимулирует продукцию целого ряда цитокинов и хемокинов мононуклеарными клетками цельной крови: ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α, ИФН-α, ИФН-γ, MCP1, VEGF, ИЛ-1РА и ИЛ-10 (Orishchenko et al., 2013). Иммуностимулирующая активность двуцепочечной ДНК, в частности в отношении ДК, во многом определяет и обнаруженную нами клиническую эффективность препарата ДНК человека (Панаген®) при проведении второй фазы многоцентровых, двойных слепых, плацебо-контролируемых испытаний у пациенток с раком молочной железы II–IV стадии (Proskurina et al., 2015, 2016).

Активация ДК под влиянием двуцепочечной геномной self ДНК может осуществляться через TLR9 сигнальный путь и/или через систему цитозольных сенсоров. Система обнаружения нуклеиновых кислот через TLR9 сигнальный каскад описана во множестве научных работ (Yasuda et al., 2009; Kawai, Akira, 2011; Алямкина и др., 2013). Феномен активации ДК молекулами двуцепочечной self ДНК также описан в отдельных научных публикациях (Martin, Elkon, 2006; Alyamkina et al., 2010a, b). Однако молекулярные особенности этого процесса остаются неизученными. Характеристика экспрессии генов поверхностных антигенов и специфических цитокинов под воздействием двуцепочечной self ДНК как монопрепарата в условиях блокады TLR9 сигнального пути является первым целенаправленным шагом в понимании молекулярных механизмов активации ДК фрагментами экстраклеточной двуцепочечной ДНК.

В настоящей работе была исследована экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции в ДК под воздействием двуцепочечной геномной self ДНК, при непосредственном воздействии на ДК без использования дополнительных факторов или при интернализации этой ДНК во внутриклеточное пространство с помощью трансфецирующего агента, в условиях блокирования TLR9 сигнального пути и без него. В первой части исследования сравнивалось множество различных обработок между собой. Во второй части целенаправленно изучалось совместное воздействие ДНК и хлорохина на выборке из трех доноров.

Материалы и методы

Выделение мононуклеарных клеток из крови человека. Отобранные образцы венозной крови от трех здоровых доноров разбавляли в 3 раза раствором PBS. Наслаивали образцы разбавленной крови на раствор фиколла-урографина (ρ = 1.077 г/см^3) из расчета 2 : 1 по объему. Центрифугировали 45 мин при 400 g при комнатной температуре. Отбирали интерфазные кольца клеток в пробирки со средой RPMI-1640 без сыворотки, ресуспендировали. Трижды промывали клетки средой RPMI-1640, центрифугируя 10 мин при 200 g при комнатной температуре. Считали количество клеток в камере Горяева.

Генерация дендритных клеток человека. Моноциты выделяли на чашках Петри путем прилипания к пластику мононуклеарных клеток ((2–5) · 10^6/мл) в течение 2 ч в присутствии 10 % сыворотки крови AB(IV) группы. Для генерации ДК моноциты культивировали во флаконах (Nunc, Дания) в течение 4 суток в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0.3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5 % эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США), в присутствии ГМ-КСФ (40 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) и ИФН-α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария).

Препарат ДНК человека получали из плацент здоровых рожениц. В работе использовали плацентарный материал, имеющий отрицательные результаты анализов на наличие ВИЧ, сифилиса, гепатитов В и С. Для выделения ДНК использовали бесфенольный метод. ДНК фрагментировали ультразвуком при частоте 22 кГц до получения фрагментов ДНК размером от 200 до 6000 п. н. Данный препарат является фармакопейным (патентованное название «Панаген®», регистр. свидетельство ЛСР № 004429/08 от 09.06.2008). Полученный препарат фильтровали через 0.22 мкм.

Трансфекцию ДК проводили с использованием реагента Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Получение кДНК. По окончании инкубации из каждого образца дендритных клеток выделяли полиА мРНК («Медиген», Россия), а затем синтезировали кДНК с помощью набора GoTaq 2-Step RT-qPCR System (Promega, США). Образцы РНК и кДНК хранили при –70 °С.

Real-time PCR проводили с помощью реагентов SYBR® Green PCR Master Mix на приборе фирмы Applied Biosystems®. Для нормирования в качестве внутреннего контроля брали ген большой субъединицы Р0 кислого рибосомного фосфорилированного белка (*RPLP0*) (Wang et al., 2012). Праймеры, использованные в первой и второй серии экспериментов, приведены в табл. 1 и 2. Олигонуклеотиды для ПЦР в реальном времени были синтезированы ООО «Биоссет» с очисткой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Относительный уровень экспрессии генов определяли методом ΔΔCt. Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы REST 2009.

Результаты

Экспрессия генов цитокинов, антигенов дифференцировки и факторов транскрипции ДК человека после 6-часовой экспозиции с двуцепочечной ДНК

На первом этапе работы с помощью ПЦР в реальном времени был проведен анализ влияния двуцепочечной ДНК, ее синтетического аналога Poly(dA : dT) и ЛПС (классического активатора ДК) на экспрессию девяти генов цитокинов и хемокинов (*ФНО-α*, *ИФН-α*, *ИФН-β*, *ИЛ-6*, *ИЛ-8*, *ИЛ-1α*, *ИЛ-1β*, *ИЛ-1РА*, *ИЛ-18*) в ДК человека после 6-часовой экспозиции. Помимо этого оценивалась экс-

Table 1. Primers for the genes for cytokines, differentiation antigens, and transcription factors of dendritic cells, and the human *RPLP0* gene used in the first series of experiments

Gene	Primer	Length, base	Sequence 5′–3′	Amplicon size, bp
TNF-α	for	21	GGCGTGGAGCTGAGAGATAAC	120
	rev	22	GGTGTGGGTGAGGAGCACAT	
IFN-α	for	26	GTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCAC	93
	rev	23	TCTCATGATTTCTGCTCTGACAA	
IFN-β	for	20	GTCAGAGTGGAAATCCTAAG	134
	rev	20	ACAGCATCTGCTGGTTGAAG	
IL-6	for	20	GAAAGCAGCAAAGAGGCACT	108
	rev	20	TTTCACCAGGCAAGTCTCCT	
IL-8	for	24	GAATGGGTTTGCTAGAATGTGATA	129
	rev	24	CAGACTAGGGTTGCCAGATTTAAC	
IL-1α	for	20	ATACCCAAAACCATCACAGG	136
	rev	20	CCAAGCACACCCAGTAGTCT	
IL-1β	for	20	GAAATGATGGCTTATTACAG	110
	rev	20	CCATCCAGAGGGCAGAGGTC	
IL-1PA	for	20	GTGCCTGTCCTGTGTCAAGT	115
	rev	20	TGAGCGGATGAAGGCGAAGC	
IL-18	for	20	GGTATGGCTGTAACTATCTC	121
	rev	20	TGTCACTTTTTGTATCCTTG	
CD-14	for	19	ACGCCAGAACCTTGTGAGC	122
	rev	22	GCATGGATCTCCACCTCTACTG	
CD-25	for	21	CGCAGAATAAAAAGCGGGTCA	116
	rev	21	ACTTGTTTCGTTGTGTTCCGA	
CD-83	for	22	AAGGGGCAAAATGGTTCTTTCG	96
	rev	19	GCACCTGTATGTCCCCGAG	
RIG-I	for	22	TTCTCTTGATGCGTCAGTGATA	103
	rev	21	CCGTGATTCCACTTTCCTGAA	
MDA5	for	22	GTCTCGTCACCAATGAAATAGC	145
	rev	26	TTATACATCATCTTCTCTCGGAAATC	
IRF3	for	20	GGTCAAGGTTGTGCCCACGT	144
	rev	20	AGGTAGGCCTTGTACTGGTC	
IRF7	for	20	GCTGCGCTACACGGAGGAAC	120
	rev	24	CCGCCCACCTCCCAGTACACC	
NF-κB	for	20	GAAGCACGAATGACAGAGGC	137
	rev	21	GCTTGGCGGATTAGCTCTTTT	
RPLP0	for	21	CTAAAATCTCCAGGGGCACCA	120
	rev	21	AGGAGAAGGGGGAGATGTTGA	

прессия генов, кодирующих антигены дифференцировки (*CD14*, *CD83*) и активации ДК (*CD25*), а также факторов транскрипции (*IRF3*, *IRF7*, *NF-κB*) и трансдукции активирующего сигнала (*RIG-I*, *MDA5*).

Дендритные клетки человека генерировали из моноцитов крови с использованием ГМ-КСФ и ИФН-α. Полученные ДК были обработаны следующим образом: 1) контроль – интактные ДК; 2) ДК + Poly(dA : dT) (10 мкг/мл); 3) ДК + двуцепочечная ДНК (10 мкг/мл); 4) ДК с добавлением только липофектамина 2000 (контроль на действие трансфецирующего агента); 5) ДК, трансфецированные Poly(dA : dT) (10 мкг/мл); 6) ДК, трансфецированные двуцепочечной ДНК (10 мкг/мл); 7) ДК + ЛПС (5 мкг/мл); 8) ДК, обработанные хлорохином (100 мкМ), плюс двуцепочечная ДНК (10 мкг/мл). Экспозицию со всеми агентами проводили в течение 6 ч, после чего из клеток была выделена мРНК и в реакции обратной транскрипции с помощью случайного праймера (random primer) синтезиро-

Table 2. Primers for the genes of cytokines and differentiation antigens of dendritic cells and the human *RPLP*0 gene used in the second series of experiments

Gene	Primer	Length, base	5′–3′ sequence	Optimum annealing temperature in PCR	Amplicon size, bp.
IFN-α	for	23	CAGAGTCACCCATCTCAGCAAGC	60	118
	rev	22	CAGCCCAGAGAGCAGCTTGACT		
IFN-β	for	21	CCTTTGCTCTGGCACAACAGG	58	189
	rev	23	CATTCAATTGCCACAGGAGCTTC		
IFN-γ	for	23	GACTTGAATGTCCAACGCAAAGC	58	140
	rev	23	CAGGACAACCATTACTGGGATGC		
IL-8	for	22	GCCAAGGGCCAAGAGAATATCC	58–60	177
	rev	22	GGCTAGCAGACTAGGGTTGCCA		
IL-10	for	23	ACGAAACTGAGACATCAGGGTGG	60	165
	rev	22	AATGGGGGTTGAGGTATCAGAGG		
MCP1	for	23	GCAGATGGTGGAGCTGAATATGC	60	174
	rev	23	GCTAAGCCACAGTTGCACTCATG		
VEGF	for	22	GAAGGAGCCTCCCTCAGGGTTT	60	161
	rev	23	GCGCAGAGTCTCCTCTTCCTTCA		
CD-25	for	23	GAATTTCTTGGTAAGAAGCCGGG	58	116
	rev	20	CTTCCAAAACGCAGGCAAGC		
CD-83	for	22	AAGGGGCAAAATGGTTCTTTCG	60	96
	rev	19	GCACCTGTATGTCCCCGAG		
RPLP0	for	23	AGGCCTTCTTGGCTGATCCATCT	58–60	135
	rev	22	TATCCTCGTCCGACTCCTCCGA		

вана кДНК. Анализ кДНК выполняли со специфическими парами праймеров, используя наборы реагентов М-443 «Синтол» и систему StepOnePlus (Applied Biosystems). Для нормирования в качестве внутреннего контроля использовали ген большой субъединицы P0 кислого рибосомного фосфорилированного белка (*RPLP0*), так как экспрессия данного гена была наиболее стабильной при всех вариантах обработки дендритных клеток. Результаты представлены на рис. 1 и 2.

Видно, что краткосрочная, 6-часовая инкубация ДК с ЛПС, являющимся «классическим» активатором, который стимулирует конечное созревание ДК, приводит к небольшому (в 1.5–3.3 раза) усилению экспрессии генов *CD83* (маркер зрелости), *CD25* (рецептор ИЛ-2, маркер активации), фактора транскрипции (*NF-κB*) и отдельных цитокинов (*ИФН-α*, *ИЛ-1α*, *ИЛ-1β*). За столь короткий временной интервал экспрессия проанализированных генов в ДК значимо не менялась после их обработки двуцепочечной ДНК естественным путем (т. е. без использования трансфецирующих агентов). Тем не менее на фоне предварительного блокирования хлорохином TLR9 сигнального пути ДНК активировала ДК, что проявлялось усилением синтеза мРНК генов *CD25* и *CD83* (в 6.7 и 2.6 раза соответственно), а также отдельных цитокинов (*ИФН-β* в 5.2 раза) и хемокинов (*ИЛ-8* в 1.6 раза). Полученные данные позволяют предположить, что блокирование TLR9 активирует в ДК альтернативные пути распознавания нуклеиновых кислот (возможно, через систему цитозольных сенсоров), что в свою очередь приводит к детекции двуцепочечной ДНК и последующему созреванию/активации дендритных клеток, а также усилению экспрессии генов *ИФН-β* и *ИЛ-8* – цитокинов/хемокинов, необходимых для запуска реакций врожденного иммунитета с участием нейтрофильных гранулоцитов.

Как и ожидалось, в эти сроки (после 6-часовой экспозиции) наиболее выраженный стимулирующий эффект ДНК на ДК человека регистрировался в случае направленной трансфекции клеток липофектамином 2000 в комплексе с Poly(dA : dT), а также в комплексе с двуцепочечной ДНК. Так, по сравнению с группой Lip0 комплекс липофектамина с Poly(dA : dT) активировал экспрессию *ФНО-α*, *ИФН-α*, *ИФН-β*, *ИЛ-6* и *ИЛ-8* в 16, 13, 82, 289 и 8 раз соответственно (см. рис. 1). В меньшей степени (в 1.7–3.6 раза) активировалась экспрессия *ИЛ-1β*, *CD25*, *CD83*, *RIG-I*, *MDA5* и *NF-κB* (см. рис. 1 и 2). В свою очередь обработка ДК липофектамином в комплексе с препаратом двуцепочечной ДНК приводила к выраженной активации экспрессии *ФНО-α*, *ИФН-α*, *ИФН-β* и *ИЛ-6* – в 9, 7, 46 и 102 раза соответственно (см. рис. 1). В меньшей степени (в 1.9–3.6 раза) активировалась экспрессия *ИЛ-8*, *CD25*, *CD83*, *RIG-I*, *MDA5* и *NF-κB* (см. рис. 1 и 2).

Таким образом, как Poly(dA : dT), так и двуцепочечная ДНК в комплексе с липофектамином активируют экспрессию практически одного и того же набора генов. Исключение составляют только *ИЛ-1α* и *ИЛ-1β*, на экспрессию которых препарат двуцепочечной ДНК практически не

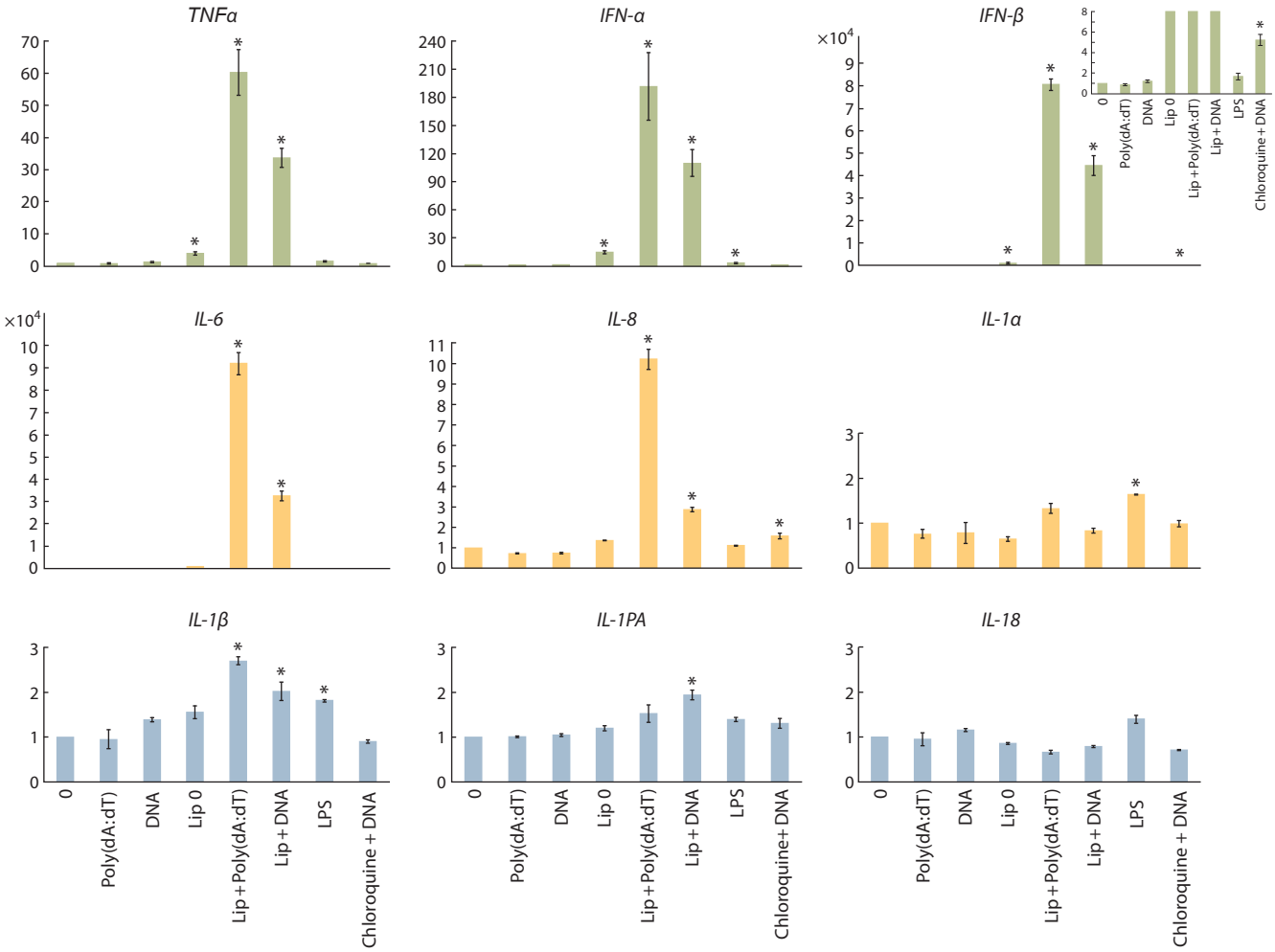


Fig. 1. Relative expression rates of cytokine genes in human dendritic cells.
Here and in Fig. 2: (0) intact DCs (control) and DCs after 6-h incubation with Poly(dA:dT), double-stranded DNA, lipofectamine (Lip0), transfection with Poly(dA:dT) (Lip + Poly(dA:dT)), transfection with double-stranded DNA (Lip + DNA), LPS, double-stranded DNA with chloroquine pretreatment. Y-Axis:gene expression in groups studied relative to the control group. * $p < 0.05$, significance of difference from the control group. The size of the additional block for *IFN-β* is chose so that the level of mRNA production with the chloroquine + DNA treatment could be quantitated.

оказывал влияния, а Poly(dA : dT) активировал их незначительно (в 2.1 и 1.7 раза по сравнению с обработкой липофектамином). Кроме того, по сравнению с двуцепочечной ДНК эффект Poly(dA : dT) был более выраженным (в 2–3 раза) в отношении генов цитокинов *ФНО-α*, *ИФН-α*, *ИФН-β*, *ИЛ-6* и *ИЛ-8* (см. рис. 1).

Следует отметить, что интерфероны первого типа (ИФН-α/β), провоспалительные цитокины (ФНО-α, ИЛ-6) а также CXC-хемокины (ИЛ-8) относятся к группе цитокинов так называемой первой волны. Они непосредственно участвуют в инициации реакций врожденного иммунитета (ФНО-α, ИФН-α/β), в рекрутировании в очаг повреждения/воспаления нейтрофильных гранулоцитов (ИЛ-8), в индукции синтеза гепатоцитами острофазовых белков (ИЛ-6). Кроме того, ИФН-α – один из главных инициаторов формирования адаптивного иммунного ответа Th1-направленности. ИФН-α способен также протектировать Т-клетки от апоптоза, а ИЛ-6 – ингибировать функциональную активность супрессорных CD4+CD25+ Т-регуляторных лимфоцитов. Немаловажно, что ИФН-α и ИЛ-6 стимулируют дифференцировку и созревание ДК из гемопоэтических предшественников (Zhang et al., 2010), обеспечивая пополнение пула антиген-презентирующих клеток в очаге повреждения/воспаления.

Таким образом, выявленная нами способность двуцепочечной ДНК и ее синтетического аналога Poly(dA : dT) усиливать в ДК экспрессию генов медиаторов первой волны, а также факторов сигналинга свидетельствует о выраженных иммуностимулирующих свойствах экстраклеточной ДНК.

Экспрессия генов цитокинов и антигенов дифференцировки ДК человека после 6- и 24-часовой экспозиции с двуцепочечной ДНК в условиях блокирования TLR9 сигнального пути

На втором этапе работы была проанализирована активация экспрессии генов интерферонов первого (*ИФН-α/β*) и второго (*ИФН-γ*) типа, цитокинов (*ИЛ-10*, *VEGF*), CXC и CC хемокинов (*ИЛ-8*, *MCP1*), а также антигенов диффе-

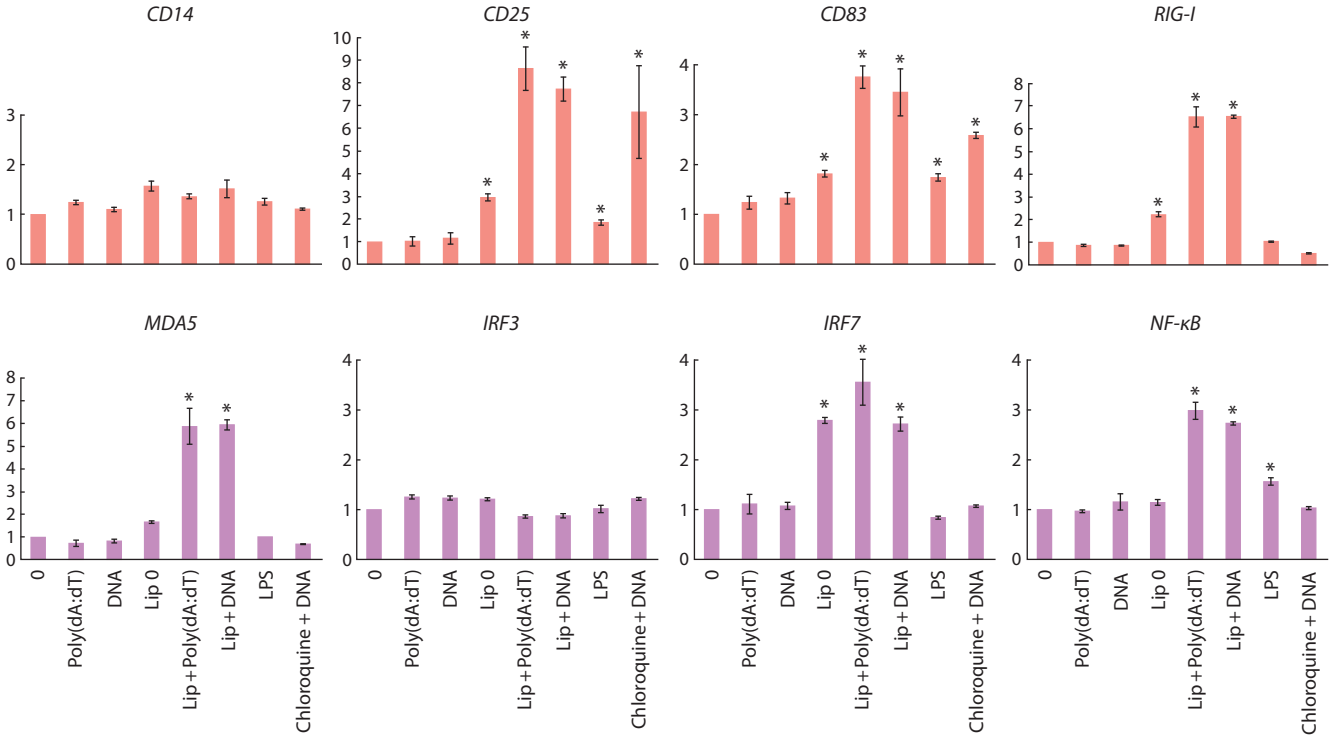


Fig. 2. Relative expression of genes for differentiation antigens (*CD14, CD83*), activation antigens (*CD25*), transcription factors (*IRF3, IRF7, NF-κB*), and transduction of the activation signal (*RIG-I, MDA5*) into human DCs.
Designations follow Fig. 1.

ренцировки (*CD83*) и активации (*CD25*) в ДК человека без и в условиях обработки хлорохином, после 6- и 24-часовой экспозиции с двуцепочечной ДНК без использования трансфецирующих агентов (липофектамина 2000).

Дендритные клетки были генерированы из моноцитов крови трех доноров в стандартных условиях с использованием ГМ-КСФ и ИФН-α (Alyamkina et al., 2010a). Полученные ДК были обработаны следующим образом: 1) контроль – интактные ДК; 2) ДК, обработанные хлорохином (100 мкМ); 3) ДК + двуцепочечная ДНК (10 мкг/мл); 4) ДК, обработанные хлорохином (100 мкМ), плюс двуцепочечная ДНК (10 мкг/мл). Дендритные клетки с добавлением соответствующих агентов инкубировали в течение 6 и 24 ч, после чего выделялась мРНК и в реакции обратной транскрипции с помощью случайного праймера синтезировалась кДНК. Real-time ПЦР проводили с помощью реагентов SYBR® Green PCR Master Mix на приборе Applied Biosystems®. Для нормирования в качестве внутреннего контроля использовали также ген большой субъединицы P0 кислого рибосомного фосфорилированного белка (*RPLP0*). Результаты представлены на рис. 3. В этой части работы для ПЦР-анализа были использованы другие, чем в первой части исследования, наборы специфических праймеров. Такой подход позволил в независимом формате оценить сравнительную экспрессию анализируемых генов, что увеличивает достоверность полученных результатов.

Обнаружено, что хлорохин сам по себе вызывает индукцию синтеза мРНК проанализированных цитокинов. Через 6 ч инкубации наблюдалось достоверное увеличение синтеза мРНК *ИЛ-8* и *CD83*. К 24 ч инкубации при воздействии хлорохина на ДК увеличивался синтез мРНК всех проанализированных генов (см. рис. 3).

Препарат ДНК в виде монопрепарата через 6 ч активирует синтез мРНК *ИФН-α*, *ИФН-β*, *ИФН-γ*, *ИЛ-8*, *ИЛ-10* и *VEGF*. Через 24 ч достоверное увеличение синтеза мРНК сохраняется только для генов *ИФН-α* и *ИЛ-8* (см. рис. 3).

В синергизме ДНК с хлорохином наблюдается увеличение синтеза мРНК *ИФН-α*, *ИФН-β*, *ИЛ-8*, *VEGF* и *CD83* через 6 ч инкубации, продолжающееся до 24 ч. Для генов *ИФН-γ*, *MCP1* и *CD25* достоверное увеличение синтеза мРНК наблюдается только к 24 ч инкубации. Наиболее значительный эффект отмечен для провоспалительного цитокина *ИФН-β*: через 24 ч после индукции в синергизме ДНК с хлорохином у всех трех доноров синтез мРНК вырос до значений, в 140–200 раз превышающих контрольный уровень (см. рис. 3).

Суммируя полученные данные, можно сказать, что обработка ДНК и хлорохином синергично усиливает синтез мРНК проанализированных цитокинов. При синергичном действии наиболее заметно активируются гены провоспалительных цитокинов *ИФН-α*, *ИФН-β*, *ИФН-γ* и *VEGF* к 24 ч индукции.

Обсуждение

В настоящем исследовании первоначально была оценена принципиальная возможность активации дендритных клеток человека, генерированных из моноцитов крови с помощью ГМ-КСФ и ИФН-α, в условиях краткосрочной 6-часовой экспозиции с двуцепочечной ДНК. Об изменении функционального статуса ДК судили по усилению экспрессии генов цитокинов и хемокинов (*ФНО-α*,

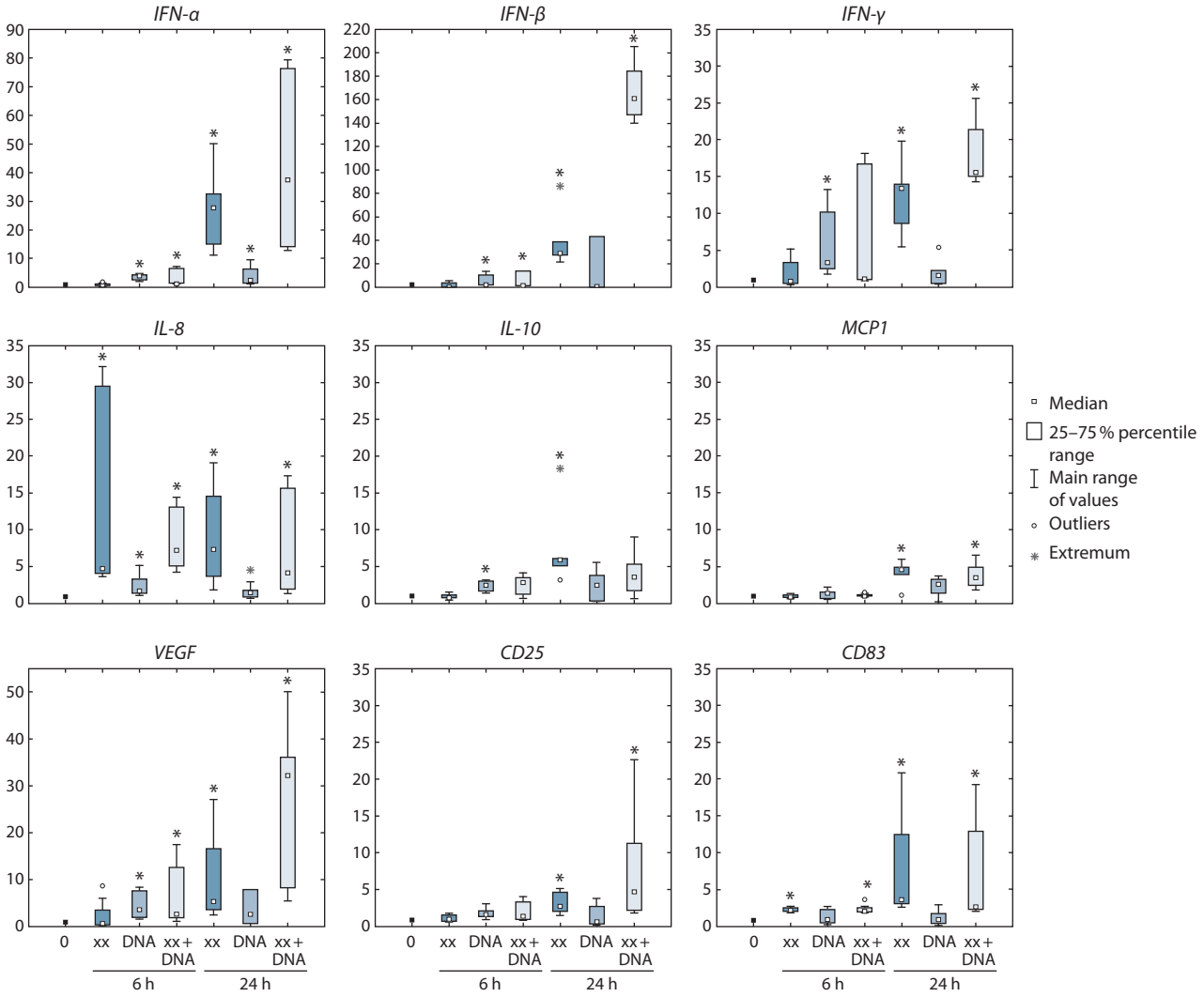


Fig. 3. Relative expression of genes for cytokines and differentiation antigens in human DCs after 6 and 24 hrs of incubation with double-stranded DNA.
(0) Control intact DCs and DCs 6- or 24-h incubation with chloroquine (chq), dsDNA, or dsDNA + chloroquine summarized for three donors.
Y-Axis: gene expression in groups studied divided by that in the control group. *Difference from the control group significant at $p < 0.05$.

ИФН-α, *ИФН-β*, *ИЛ-6*, *ИЛ-8*, *ИЛ-1α*, *ИЛ-1β*, *ИЛ-1РА*, *ИЛ-18*), а также генов, кодирующих антигены дифференцировки (*CD14*, *CD83*), активации (*CD25*), факторы транскрипции (*IRF3*, *IRF7*, *NF-κB*) и трансдукции активирующего сигнала (*RIG-I*, *MDA5*). Установлено, что за столь короткий временной интервал обработка ДК двуцепочечной ДНК естественным путем (без искусственной интернализации) значимо не влияет на уровень экспрессии проанализированных генов. Полученные данные не вызывают удивления, поскольку 6-часовая инкубация ДК с ЛПС, который является классическим дозревающим стимулом и часто используется в различных протоколах генерации ДК, также сопровождалась лишь незначительным (в 1.5–3.3 раза) усилением экспрессии *CD83*, *CD25*, *NF-κB* и отдельных цитокинов (*ИФН-α*, *ИЛ-1α*, *ИЛ-1β*), тогда как уровень остальных анализируемых генов значимо не менялся. Очевидно, изменения в экспрессии генов и последующая модификация фенотипа и функции ДК под влиянием двуцепочечной ДНК происходят на более поздних сроках, поскольку ранее нами показано, что в условиях 24-часовой инкубации препарат двуцепочечной ДНК человека (Панаген®) по своему стимулирующему действию на ДК был сопоставим с ЛПС и эффективно индуцировал дифференцировку/созревание ДК, а также усиливал их аллостимуляторную активность в смешанной культуре лимфоцитов (Alyamkina et al., 2010a, b).

Наиболее выраженный стимулирующий эффект ДНК на экспрессию генов в ДК человека в условиях 6-часовой инкубации регистрировался в случае интернализации двуцепочечной ДНК или ее синтетического аналога Poly(dA : dT) с помощью трансфецирующего агента липофектамина 2000 (см. рис. 1 и 2). В результате в ДК значимо повышалась экспрессия интерферонов первого типа (*ИФН-α/β*), провоспалительных цитокинов (*ФНО-α*, *ИЛ-6*) и CXC-хемокинов (*ИЛ-8*), а также факторов сигналинга (*RIG-I*, *MDA5*, *NF-κB*). Выявленные изменения

экспрессии генов в ДНК-активированных ДК свидетельствуют об их потенциальной готовности участвовать в качестве «профессиональных» антиген-презентирующих клеток в инициации реакций врожденного иммунитета, в рекрутировании в очаг повреждения/воспаления нейтрофильных гранулоцитов, в индукции острофазового ответа и последующем формировании адаптивного иммунитета в Th1-направлении. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о выраженных иммуностимулирующих свойствах экстраклеточной ДНК.

Другой актуальной биологической задачей в настоящем исследовании была оценка способности фрагментированной двуцепочечной ДНК активировать ДК человека без участия трансфецирующих факторов. При этом представлялось интересным оценить выраженность эффекта в динамике 6- и 24-часовой экспозиции. Дизайн исследования предполагал оценку активирующего влияния двуцепочечной ДНК без и в условиях блокирования TRL9 пути передачи сигнала специфическим ингибитором хлорохином.

Было обнаружено, что препарат двуцепочечной ДНК человека в сочетании с хлорохином имеет сложную картину индукции синтеза мРНК проанализированных цитокинов с явно выраженным синергичным эффектом.

Хлорохин известен прежде всего в качестве антималярийного агента (Schlesinger et al., 1988). Он представляет собой небольшое липофильное, отдающее протон слабое основание, которое способно свободно диффундировать через цитоплазматическую мембрану в депротонизированной форме (Schlesinger et al., 1988). В цитоплазме хлорохин достигает кислых цитоплазматических компартментов – эндосом, лизосом, аккумулируется в них и забирает протон из окружающей среды, становясь протонизированным. При этом происходит увеличение вакуолярной pH, что приводит к защелачиванию внутреннего содержимого эндосом (Krogstad, Schlesinger, 1987). Исследования этого многофункционального агента выявили следующие механизмы его воздействия на эукариотическую клетку. Достигая закисленных внутриклеточных компартментов, и в первую очередь эндосом, хлорохин пертурбирует органеллы, что вызывает нарушение их функций, одной из которых является инактивация TLR9 и связанная с его инактивацией невозможность индукции экспрессии генов провоспалительных цитокинов в ответ на интернализацию бактериальной ДНК, обогащенной неметилированными CpG динуклеотидами (Macfarlane, Manzel, 1998). Это свойство хлорохина используется в многочисленных исследованиях при необходимости выключения TLR9 сигнального пути (Huang et al., 2005; von Buttlar et al., 2014). Другое свойство хлорохина было обнаружено при его использовании в низких концентрациях. Оказалось, что стократное снижение концентрации хлорохина, слабо действующее на изменение pH внутриклеточных компарментов, также приводит к нарушению трансдукции сигнала, связанной с формированием TLR9-лиганд комплекса. При этом хлорохин способен напрямую взаимодействовать с чужеродной интернализованной двуцепочечной ДНК, успешно конкурируя в этом с TLR9 (Kuznik et al., 2011).

Анализируя эффекты хлорохина на ДК человека, мы обнаружили его прямое участие в активации экспрессии генов *ИФН-α/β*, *ИФН-γ*, *ИЛ-10*, *VEGF*, *ИЛ-8*, *MCP1*, а также маркера зрелых ДК (*CD83*), которое наиболее ярко проявлялось после 24-часовой инкубации. Можно предположить, что хлорохин, по-видимому, через механизм генерации ROS, в котором, как предполагается, задействована NOX (и ее активация хлорохином), активирует NF-κB и последующую экспрессию широкого спектра интерферонов, цитокинов и хемокинов (Park et al., 2003, 2004).

В этой связи наблюдаемое синергичное действие хлорохина и препарата ДНК может быть обусловлено дополнительным собственным воздействием хлорохина на продукцию провоспалительных цитокинов.

Так же, как и в первой серии экспериментов, наблюдается индукция цитокинов первой волны. Активно синтезируется мРНК трех интерферонов *ИФН-α/β/γ*, хемокина *ИЛ-8*. При этом к 24 часам экспозиции достоверно детектируется повышенный синтез мРНК *ИФН-α* и *ИЛ-8*. Оба цитокина – основные участники инициации реакции врожденного иммунного ответа. Именно ИФН-α и ИЛ-8 обеспечивают дифференцировку, созревание и миграцию ДК к поврежденным тканям или очагу воспаления (Zhang et al., 2010).

Следует отметить повышенный синтез мРНК *ИФН-γ* под воздействием препарата ДНК в первые 6 часов эксперимента. Известно, что генная платформа, активируемая *ИФН-γ*, обширна и включает гены многочисленных факторов иммунитета. Предполагается, что ранняя экспрессия гена этого цитокина служит пусковым фактором начала иммуностимулирующей реакции. Аналогичная картина активации гена *ИФН-γ* описана в работе (Huang et al., 2005), где максимально выраженный ответ на стимуляцию ДНК, находящейся в составе HKBA (heat-killed *B. abortus*) в организме экспериментальных животных, развивался к 6–8 часам индукции.

Можно полагать, что в случае наших экспериментов экстраклеточная self ДНК активирует синтез мРНК *ИФН-γ* и последующую ее экспрессию, синтез и секрецию цитокина. Далее по аутокринному и паракринному эффекту происходит кратная автоактивация и активация генов сопряженных факторов иммунитета, что приводит к развитию специфического иммунного ответа.

Так же, как и в первой серии экспериментов, при синергичном действии хлорохина и препарата ДНК значительно усиливается экспрессия генов всех проанализированных цитокинов и костимулирующих молекул, за исключением *ИЛ-10*, что еще раз свидетельствует о сложных внутриклеточных взаимодействиях антималярийного агента и фрагментов self ДНК.

Acknowledgments

The work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0003 and the Russian Foundation for Basic Research, projects 12-04-00954 and 16-34-00007. The authors are grateful to Drs D.E. Ivanoshchuk and P.S. Orlov for valuable advice.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Kiseleva E.V., Orishchenko K.E., Sakhno L.V., Gel'fgat E.L., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous allogenic fragmented double-stranded DNA is internalized into human dendritic cells and enhances their allostimulatory activity. Cell. Immunol. 2010a;262:120-126. DOI 10.1016/j.cellimm.2010.01.005.

Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Shilov A.G., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro. Cell. Immunol. 2010b; 266: 46-51. DOI 10.1016/j.cellimm.2010.08.011.

Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Gvozdeva T.S., Dolgova E.V., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Sidorov S.V., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effects of human exogenous DNA on production of perforin-containing CD8+ cytotoxic lymphocytes in laboratory setting and clinical practice. Cell. Immunol. 2012;276:59-66. DOI 10.1016/j.cellimm.2012.04.004.

Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Rogachev V.A., Ostanin A.A., Chernych E.R., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Intracellular systems for detection of exogenous nucleic acids and mechanisms triggering the immune response to DNA internalization. Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia). 2013;15(5):413-430. (in Russian)

Anker P. Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2000;906:5-7.

Barbalat R., Ewald S.E., Mouchess M.L., Barton G.M. Nucleic acid recognition by the innate immune system. Annu. Rev. Immunol. 2011;29:185-214. DOI 10.1146/annurev-immunol-031210-101340.

Barber G.N. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. Immunol. Rev. 2011a;243(1):99-108. DOI 10.1111/j.1600-065X.2011.01051.x.

Barber G.N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. Curr. Opin. Immunol. 2011b;23(1):10-20. DOI 10.1016/j.coi.2010.12.015.

Choi J.J., Reich C.F. III, Pisetsky D.S. The role of macrophages in the *in vitro* generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. Immunology. 2005;115(1):55-62. DOI 10.1111/j.1365-2567.2005.02130.x.

Decker P., Singh-Jasuja H., Haager S., Kötter I., Rammensee H.G. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. J. Immunol. 2005;174(6): 3326-3334.

Fernandes-Alnemri T., Yu J.W., Datta P., Wu J., Alnemri E.S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. Nature. 2009;458(7237):509-513. DOI 10.1038/nature07710.

Franco L.H., Wowk P.F., Silva C.L., Trombone A.P., Coelho-Castelo A.A., Oliver C., Jamur M.C., Moretto E.L., Bonato V.L. A DNA vaccine against tuberculosis based on the 65 kDa heat-shock protein differentially activates human macrophages and dendritic cells. Genet. Vaccines Ther. 2008;6:3. DOI 10.1186/1479-0556-6-3.

Giacona M.B., Ruben G.C., Iczkowski K.A., Roos T.B., Porter D.M., Sorenson G.D. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. Pancreas. 1998;17(1):89-97.

Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000;408(6813):740-745. DOI 10.1038/35047123.

Holmgren L., Szeles A., Rajnavölgyi E., Folkman J., Klein G., Ernberg I., Falk K.I. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. Blood. 1999;93(11):3956-3963.

Huang L.Y., Ishii K.J., Akira S., Aliberti J., Golding B. Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. J. Immunol. 2005;175(6):3964-3970. DOI 10.4049/jimmunol.175.6.3964.

Ishii K.J., Akira S. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. Trends Immunol. 2006;27(11):525-532. DOI 10.1016/j.it.2006.09.002.

Ishii K.J., Akira S. Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids. Curr. Opin. Immunol. 2008;20(5):524-529. DOI 10.1016/j.coi.2008.07.002.

Ishii K.J., Coban C., Kato H., Takahashi K., Torii Y., Takeshita F., Ludwig H., Sutter G., Suzuki K., Hemmi H., Sato S., Yamamoto M., Uematsu S., Kawai T., Takeuchi O., Akira S. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. Nat. Immunol. 2006;7(1):40-48. DOI 10.1038/ni1282.

Ishii K.J., Suzuki K., Coban C., Takeshita F., Itoh Y., Matoba H., Kohn L.D., Klinman D.M. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. J. Immunol. 2001;167(5):2602-2607.

Jiang W., Reich III C.F., Pisetsky D.S. Mechanisms of activation of the RAW264.7 macrophage cell line by transfected mammalian DNA. Cell. Immunol. 2004;229(1):31-40. DOI 10.1016/j.cellimm.2004.06.003.

Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity. 2011;34(5):637-650. DOI 10.1016/j.immuni.2011.05.006.

Kis-Toth K., Szanto A., Thai T.H., Tsokos G.C. Cytosolic DNA-activated human dendritic cells are potent activators of the adaptive immune response. J. Immunol. 2011;187(3):1222-1234. DOI 10.4049/jimmunol.1100469.

Krieg A.M. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? Nat. Med. 2003;9(7):831-835.

Krogstad D.J., Schlesinger P.H. The basis of antimalarial action: nonweak base effects of chloroquine on acid vesicle pH. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987;36(2):213-220.

Kuznik A., Bencina M., Svajger U., Jeras M., Rozman B., Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. J. Immunol. 2011;186(8):4794-4804. DOI 10.4049/jimmunol.1000702.

Lo Y.M., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., Redman C.W., Wainscoat J.S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997;350(9076):485-487. DOI 10.1016/S0140-6736(97)02174-0.

Macfarlane D.E., Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. J. Immunol. 1998;160(3):1122-1131.

Martin D.A., Elkon K.B. Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid dendritic cells to produce type I interferons predominantly through a toll-like receptor 9-independent pathway. Arthritis Rheum. 2006;54(3):951-962. DOI 10.1002/art.21677.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007;449(7164):819-826. DOI 10.1038/nature06246.

Ngan R.K., Yip T.T., Cheng W.W., Chan J.K., Cho W.C., Ma V.W., Wan K.K., Au J.S., Law C.K. Clinical role of circulating Epstein-Barr virus DNA as a tumor marker in lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004;1022:263-270. DOI 10.1196/annals.1318.041.

Orishchenko K.E., Ryzhikova S.L., Druzhinina Y.G., Ryabicheva T.G., Varaksin N.A., Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Strunov A.A., Kiseleva E.V., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Sidorov S.V., Mayorov V.I., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of human double-stranded DNA preparation on the production of cytokines by dendritic cells and peripheral blood cells from relatively healthy donors. Cancer Therapy. 2013;8:191-205.

Park J., Choi K., Jeong E., Kwon D., Benveniste E.N., Choi C. Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells. Glia. 2004;47(1):9-20. DOI 10.1002/glia.20017.

Park J., Kwon D., Choi C., Oh J.W., Benveniste E.N. Chloroquine induces activation of nuclear factor-kappaB and subsequent expression of pro-inflammatory cytokines by human astroglial cells. J. Neurochem. 2003;84(6):1266-1274.

Proskurina A.S., Gvozdeva T.S., Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Orishchenko K.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Sidorov S.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Leplina O.Y., Dvornichenko V.V., Ponomarenko D.M., Soldatova G.S., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Uchakin P.N., Zagrebelniy S.N., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Results of multicenter double-blind placebo-controlled phase II clinical trial of Panagen preparation to evaluate its leukostimulatory activity and formation of the adaptive immune response in patients with stage II–IV breast cancer. BMC Cancer. 2015;15(1):122. DOI 10.1186/s12885-015-1142-z.

Proskurina A.S., Gvozdeva T.S., Potter E.A., Dolgova E.V., Orishchenko K.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Sidorov S.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Leplina O.Y., Dvornichenko V.V., Ponomarenko D.M., Soldatova G.S., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Uchakin P.N., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Five-year disease-free survival among stage II–IV breast cancer patients receiving FAC and AC chemotherapy in phase II clinical trials of Panagen. BMC Cancer. 2016;16:651. DOI 10.1186/s12885-016-2711-5.

Rogachev V.A., Likhacheva A., Vratskikh O., Mechetina L.V., Sebeleva T.E., Bogachev S.S., Yakubov L.A., Shurdov M.A. Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell. Cancer Cell Int. 2006;6:23. DOI 10.1186/1475-2867-6-23.

Schlesinger P.H., Krogstad D.J., Herwaldt B.L. Antimalarial agents: mechanisms of action. Antimicrob. Agents Chemother. 1988;32(6): 793-798.

Sharma S., Fitzgerald K.A. Innate immune sensing of DNA. PLoS Pathog. 2011;7(4):e1001310. DOI 10.1371/journal.ppat.1001310.

Shirota H., Ishii K.J., Takakuwa H., Klinman D.M. Contribution of interferon-beta to the immune activation induced by double-stranded DNA. Immunology. 2006;118(3):302-310.

Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Olson-Sand A., Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. Clin. Chim. Acta. 2001;313(1-2):139-142.

Suzuki K., Mori A., Ishii K.J., Saito J., Singer D.S., Klinman D.M., Krause P.R., Kohn L.D. Activation of target-tissue immune-recognition molecules by double-stranded polynucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999;96(5):2285-2290.

Takeshita F., Ishii K.J. Intracellular DNA sensors in immunity. Curr. Opin. Immunol. 2008;20(4):383-388. DOI 10.1016/j.coi.2008.05.009.

Tamkovich S.N., Vlasov V.V., Lactionov P.P. Circulating deoxyribonucleic acids in blood and their using in medical diagnostics. Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology (Moscow). 2008;42(1):12-23. (in Russian)

Unterholzner L., Keating S.E., Baran M., Horan K.A., Jensen S.B., Sharma S., Sirois C.M., Jin T., Latz E., Xiao T.S., Fitzgerald K.A., Paludan S.R., Bowie A.G. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. Nat. Immunol. 2010;11(11):997-1004. DOI 10.1038/ni.1932.

von Buttlar H., Siegemund S., Büttner M., Alber G. Identification of Toll-like receptor 9 as parapoxvirus ovis-sensing receptor in plasmacytoid dendritic cells. PLoS ONE. 2014;9(8):e106188. DOI 10.1371/journal.pone.0106188.

Wang T., Liang Z.A., Sandford A.J., Xiong X.Y., Yang Y.Y., Ji Y.L., He J.Q. Selection of suitable housekeeping genes for real-time quantitative PCR in CD4(+) lymphocytes from asthmatics with or without depression. PLoS ONE. 2012;7(10):e48367. DOI 10.1371/journal.pone.0048367.

Würtele H., Little K.C., Chartrand P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. Gene Ther. 2003;10(21):1791-1799. DOI 10.1038/sj.gt.3302074.

Yasuda K., Ogawa Y., Yamane I., Nishikawa M., Takakura Y. Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways. J. Leukoc. Biol. 2005;77(1):71-79.

Yasuda K., Richez C., Uccellini M.B., Richards R.J., Bonegio R.G., Akira S., Monestier M., Corley R.B., Viglianti G.A., Marshak-Rothstein A., Rifkin I.R. Requirement for DNA CpG content in TLR9-dependent dendritic call activation induced by DNA-containing immune complexes. J. Immunol. 2009;183(5):3109-3117. DOI 10.4049/jimmunol.0900399.

Yoneyama M., Fujita T. Cytoplasmic double-stranded DNA sensor. Nat. Immunol. 2007;8(9):907-908. DOI 10.1038/ni0907-907.

Zhang R., Xing M., Ji X., Gu L., Yang X., Wang H., Jiang P. Interferon-alpha and interleukin-6 in SLE serum induce the differentiation and maturation of dendritic cells derived from CD34+ hematopoietic precursor cells. Cytokine. 2010;50(2):195-203. DOI 10.1016/j.cyto.2010.02.017.

Zhu F.G., Reich C.F., Pisetsky D.S. Effect of cytofectins on the immune response of murine macrophages to mammalian DNA. Immunology. 2003;109(2):255-262.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):728-734
DOI 10.18699/VJ17.290

Практическое руководство по оценке морфологии гранул картофельного крахмала методом микроскопирования

В.К. Хлесткин[1, 2] ✉, Т.В. Эрст[1]

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

Картофельный крахмал – ценное и доступное техническое сырье для целого ряда отраслей промышленности. Для селекции растений, продуцирующих крахмал с оптимальными для переработки свойствами, необходимы эффективные методы оценки физико-химических параметров большого количества образцов крахмала. Соответственно, данные по изменчивости тех или иных фенотипических признаков имеют важное значение как для развития фундаментальных работ по идентификации локусов генома, отвечающих за широкий спектр характеристик крахмала картофеля, так и для прикладных работ по ускоренной селекции новых сортов технического назначения. Оценка размеров крахмальных гранул при помощи микроскопии – один из самых доступных и потому распространенных методов фенотипирования. Нами разработан состоящий из четырех этапов подход к оценке геометрических параметров гранул крахмала: первый этап – выделение крахмала из клубня, второй – получение микрофотографий образцов крахмала, третий – обработка и анализ полученных изображений в свободно распространяемой программе ImageJ, четвертый – построение графиков распределения гранул крахмала по геометрическим параметрам. Показано, что гранулы крахмала различных сортов и гибридов картофеля различаются по морфологии и могут быть дифференцированы методом микроскопии с получением данных о диаметре Фере и округлости частиц. Так, моды диаметра Фере гранул крахмала сортов Алена, Невский и гибрида 785/8-5 составляют 5, 22 и 67 микрон соответственно. В распределении гранул крахмалов этих сортов и гибрида по округлости наблюдаются лишь незначительные отличия. Микрофотографирование гранул крахмала с последующей обработкой изображений представляет собой доступный, экономичный, простой и эффективный подход к фенотипированию сортов и гибридов картофеля *Solanum tuberosum* L. по физико-химическим параметрам крахмала. Этот метод может применяться для ускоренного анализа большого числа образцов на ограниченном количестве природного материала, в том числе в полевых и хозяйственных лабораториях.

Ключевые слова: крахмал; морфология; микроскопирование; диаметр Фере; округлость.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Хлесткин В.К., Эрст Т.В. Практическое руководство по оценке морфологии гранул картофельного крахмала методом микроскопирования. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):728-734. DOI 10.18699/VJ17.290

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Khlestkin V.K., Erst T.V. A practical guide to the starch granules' morphology study by microscopy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):728-734. DOI 10.18699/VJ17.290 (in Russian)

Received 23.07.2017
Accepted for publication 18.09.2017
© AUTHORS, 2017

A practical guide to the starch granules' morphology study by microscopy

V.K. Khlestkin[1, 2] ✉, T.V. Erst[1]

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

Potato starch is a valuable and affordable technical raw material for a number of industries. For selection of plants producing starch with optimal processing properties effective methods for physicochemical parameters evaluation of a large number of starch samples are needed. Thus, variability of phenotypic traits data are important both for fundamental works on identification of genomic loci responsible for a wide range of potato starch characteristics as well as for applied accelerated selection of new varieties for technical use. Estimating the morphology of starch granules by microscopy is one of the most accessible and therefore widespread methods of phenotyping. We developed a four-step approach to the estimation of the geometric parameters of starch granules. It includes an isolation of starch from the tuber (stage1), the preparation of micrographs of starch samples (stage 2), processing and analysis of the images obtained in the freely distributed ImageJ program (stage 3), and the construction of distribution curve for starch granules by geometric parameters (stage 4). It was shown that the starch granules of different varieties and hybrids of potato differ in morphology and can be differentiated by microscopy with obtaining data on the Feret's diameter and the circularity of the particles. Thus, typical values of the Feret's diameter of starch granules of "Alena" and "Nevsky" varieties and 785/8-5 hybrid are 5, 22 and 67 microns, respectively. The distributions on circularity of starch granules of these varieties and the hybrid have only minor differences. Light optical microscopy of starch granules followed by digital image analysis is an affordable, economical, simple and effective approach to phenotyping the varieties and hybrids of potato *Solanum tuberosum* L. on the physicochemical parameters of starch. The approach may be applied for accelerated analysis of a large number of samples on a limited amount of natural material in the field and countryside economic laboratories.

Key words: starch; morphology; microscopy; Feret's diameter; circularity.

✉ e-mail: khlestkin@bionet.nsc.ru

Картофельный крахмал, нативный или переработанный, – ценное и доступное техническое сырье для пищевой, целлюлозно-бумажной, текстильной, химической, строительной и ряда других отраслей промышленности. Для эффективной реализации потенциала картофельного крахмала необходима работа по селекции, инвентаризации и тестированию особых сортов картофеля *Solanum tuberosum* L., способных выступить продуцентами подходящего по физико-химическим свойствам технического крахмала, а также дальнейшей его переработке в продукты с высокой добавленной стоимостью.

На данный момент в мире селекционная и семеноводческая работа переходит на новый технологический уровень. При этом в оценке множества сортов и гибридов картофеля центральную роль играют высокоэффективные поточные методы фенотипирования с низкой себестоимостью, способные дать надежную информацию о полезных признаках растения используя ограниченное количество материала и доступное для удаленных и полевых локаций оборудование. Так, эколого-географические испытания сортов картофеля, проводимые в 2016–2017 гг. в России, подразумевают в том числе и анализ свойств крахмала, полученного из шестидесяти сортов картофеля, выращенных в пяти различных географических локациях.

Несмотря на то что гены, которые кодируют основные ферменты, участвующие в биосинтезе и метаболизме крахмала, в настоящее время выделены и охарактеризованы (Хлесткин и др., 2017), остается неясной роль конкретных структурных генов (а возможно, и участие еще не выявленных регуляторных генов) в формировании тех или иных характеристик крахмала. Поэтому данные по изменчивости фенотипических признаков имеют важное значение как для развития фундаментальных работ по идентификации локусов генома, отвечающих за широкий спектр характеристик крахмала картофеля, так и для прикладных работ по ускоренной селекции новых сортов технического назначения.

Оценка морфологии гранул картофельного крахмала

Гранула картофельного крахмала представляет собой образование размером примерно 5–100 мкм, как правило, овальной формы. Гранула состоит из кристаллических слоев, образованных за счет особой упаковки концевых линейных полисахаридных цепей амилопектина, и из аморфных слоев, образованных амилозой и фрагментами, в которых происходит разветвление цепей амилопектина.

В биосинтезе крахмала в клубнях картофеля принимают участие около двадцати ферментов. Около десяти из них действуют непосредственно внутри или на поверхности крахмальной гранулы, находящейся в пластиде, поэтому морфология крахмальной гранулы связана с активностью некоторых генов биосинтеза крахмала, а также, возможно, с рядом регуляторных участков генома. Таким образом, задача высокопроизводительного фенотипирования сортов и гибридов картофеля по морфологическим признакам крахмальных гранул является актуальной с точки зрения применения современных методов геномной и/или маркер-ориентированной селекции для направленного создания сортов с заданными свойствами крахмала.

Оценка размеров крахмальных гранул при помощи микроскопии – один из самых доступных и потому распространенных методов фенотипирования. Однако в большинстве случаев исследователи ограничиваются качественным описанием формы гранул, иногда проводят наблюдение оптических свойств гранул – окраски после обработки раствором йода либо двулучепреломления в поляризованном свете (Karlsson et al., 2007), без статистического анализа полученных изображений (Blennow et al., 2003). Заметим, что в отличие от более сложных и дорогих подходов (Wilson et al., 2006; Romano et al., 2016), с помощью микроскопии можно провести анализ размеров большой выборки гранул за ограниченное время (Li et al., 2011).

Размер гранул важен для ряда технических и пищевых применений картофельного крахмала: если в пищевой индустрии ценятся сорта с крупными гранулами крахмала, то многие технические решения требуют сортов, содержащих мелкие гранулы (de Vetten, 2004). При этом наряду с диаметром или площадью гранулы необходимо сразу получать информацию, так или иначе характеризующую ее форму. Частицы, имеющие одинаковый наибольший диаметр, могут значительно различаться по форме – от идеально круглых до вытянутых или волокнообразных, поэтому нужны дополнительные данные, дающие представление об их форме.

Отметим, что в силу своей доступности, экономичности и объективности в области фенотипирования растений активно развиваются методы, связанные с цифровым анализом изображений (см., например, (Si et al., 2017)). В ходе работы по фенотипированию сортов и гибридов картофеля по физико-химическим признакам крахмала нами разработан подход, позволяющий быстро оценить не только размер гранул, но и их округлость, которая также является важным техническим параметром. В целом для автоматического цифрового анализа микрофотографий доступны более 30 морфологических характеристик. Кроме диаметра и округлости гранул, автоматически может оцениваться площадь изображения гранул, площадь выпуклой оболочки, периметр, отношение площади к периметру, количество включений, координаты центра масс, удлинение, извилистость и другие характеристики.

Первый этап. Выделение крахмала из клубней разных сортов и гибридов картофеля

Картофельный крахмал из клубней сортов и гибридов картофеля из коллекции «ГенАгро» ФИЦ ИЦиГ СО РАН выделяли стандартным методом, основанным на гравитационном осаждении гранул крахмала в воде (см., например, (Chung et al., 2014)).

Второй этап. Получение микрофотографий гранул крахмала

Основные задачи на этом этапе – получить корректное фотографическое изображение гранул крахмала, пригодное для дальнейшей цифровой обработки. Необходимо избегать как скученности гранул крахмала с образованием кластеров, так и излишней разреженности изображений, которая может существенно уменьшить выборку измеря-

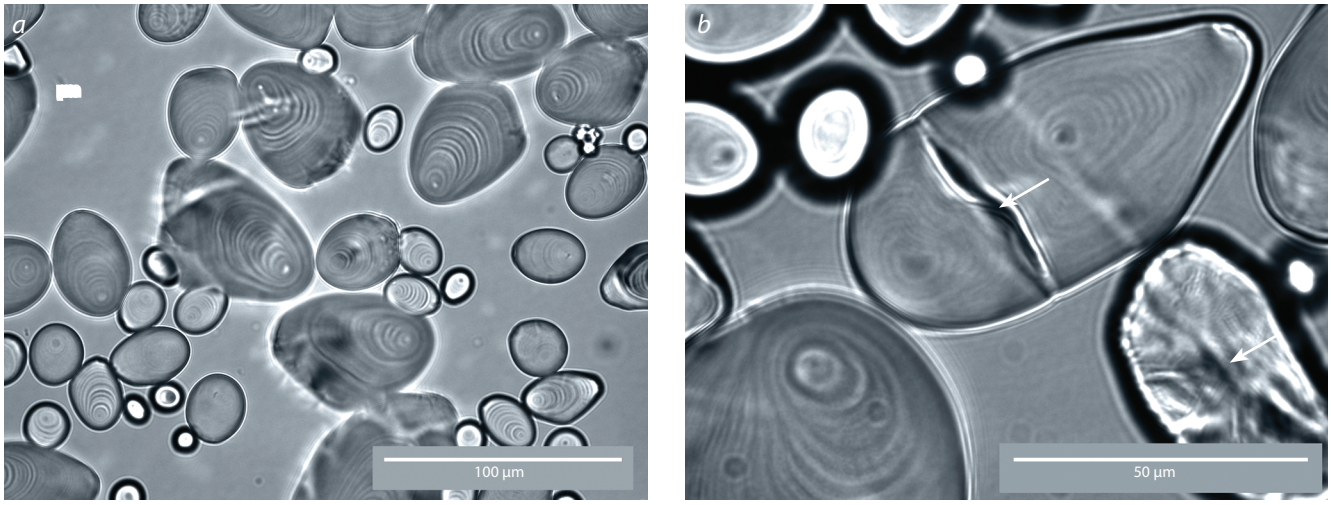


Fig. 1. Light microscopy image of potato starch granules (Alena cultivar).
Magnification: (*a*) ×252, (*b*) ×630. Arrows indicate abnormal granules with corrupted concentric layers.

емых объектов. Желательно обеспечить также хорошую контрастность изображения. Наиболее простой и удобной для оператора формой образца является дисперсия крахмальных гранул в жидкой среде, помещенная между стандартными предметным и покровным стеклами. Хорошая смачиваемость гранул крахмала водой и их относительно невысокая плотность (1.54 г/см^3) (Isleib, 1958) позволяют использовать воду в качестве среды и отказаться от применения диспергирующих агентов и регуляторов вязкости. Водная суспензия гранул с концентрацией 0.5 % и объемом 20 мкл, нанесенная на предметное стекло, обеспечивает удобную для последующей обработки плотность расположения гранул в освещенном поле: так, чтобы они не перекрывали друг друга.

Для получения репрезентативной выборки проводилось фотографирование не менее четырех различных участков светового поля, чтобы в сумме получить изображение 1500–2500 частиц. При этом неплохие результаты дает съемка в проходящем свете методом светлого поля: все гранулы видны, имеют четкие границы, хорошо выраженную морфологию. При увеличении более чем в 200 раз различается структура гранул с концентрическими чередующимися слоями разной кристалличности вокруг единого центра формирования слоев (рис. 1, *а*). Можно также увидеть и оценить наличие аномальных гранул, в которых произошло нарушение слоистой структуры в ходе их образования (рис. 1, *б*).

В случаях, когда микроскопирование гранул крахмала проводится не для изучения деталей их строения, а для оценки их морфологии, рекомендуется получить как можно более контрастное изображение, используя, например, раствор йода (можно взять аптечный раствор йода, разбавленный смесью спирта и воды (1 : 1) в 200 раз). У сортов с обычным содержанием амилозы (~20–30 %) гранулы приобретают темно-синюю окраску, фотографии становятся более контрастными, позволяя достоверно оценить количество, форму и размер гранул. При этом не окрашиваются и не учитываются при подсчете и анализе органические примеси некрахмальной природы, случайно попавшие в образец при обработке.

Третий этап. Обработка микрофотографий гранул крахмала в программе ImageJ

Полученные микрофотографии крахмала удобно обрабатывать в программе ImageJ (ImageJ, 2017). В приложении имеется набор стандартных инструментов, позволяющий изменять контрастность изображений, резкость, сглаживание, обнаруживать границы и выполнять другие повседневные задачи.

Сначала проводится калибровка программы, например по шкале, сфотографированной в микроскоп через тот же объектив, что и исследуемые образцы (операции «Установить шкалу» (Analyze → Set scale)). Далее можно работать с микрофотографиями гранул крахмала, как с неокрашенными йодом, так и с окрашенными. Для сравнения приведен результат обработки фотографии неокрашенных гранул крахмала в программе ImageJ при помощи последовательности операций «Заполнение областей» (Process → Binary → Fill holes) (рис. 2) и фотография окрашенных гранул крахмала того же сорта без обработки (рис. 3). Видно, что при обработке фотографии неокрашенных гранул некоторые из них не были распознаны как замкнутый объект и, соответственно, будут некорректно учтены программой при подсчете и измерении. Заметим, что большая часть гранул была некорректно распознана из-за того, что они не полностью попали в область фотографирования и находятся у края изображения. При автоматическом распознавании можно не принимать во внимание эти краевые гранулы (в ImageJ предусмотрена такая возможность). Далее мы будем описывать работу только с окрашенными образцами крахмала.

Для проведения подсчета и анализа формы гранул проще работать с 8-битным изображением (Image → Type → 8 bit). Установим пределы распознавания (Image → Adjust → Threshold…) и воспользуемся командой «Применить» (Apply). На полученном изображении видно, какие

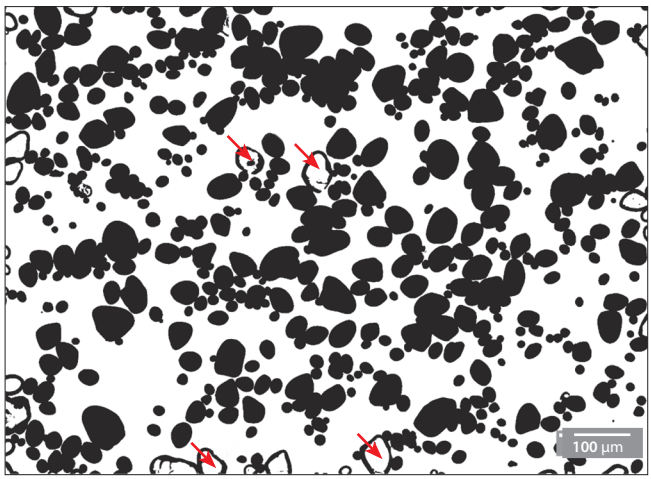


Fig. 2. Light microscopy image of potato starch granules (Alena cultivar), magnification ×63. The image was edited with the ImageJ program, and the Process → Binary → Fill holes option was applied. Arrows point to some incorrectly recognized granules.

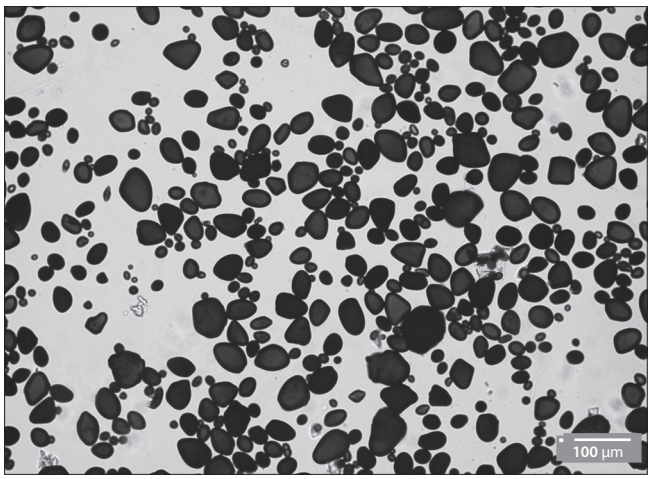


Fig. 3. Image of iodine-stained potato starch granules (Alena cultivar), magnification ×63.

именно частицы будут распознаны для подсчета и анализа. Если границы распознавания выставлены правильно, будут подсчитаны только гранулы крахмала, но не примесные частицы с другими цветовыми характеристиками.

Как видно, две или несколько гранул могут соприкасаться так, что их изображение распознается как единое поле. Для разделения таких полей на отдельные частицы воспользуемся опцией «Водораздел» (Process → Binary → Watershed), которая создает разделительные линии толщиной 1 пиксель между предполагаемыми отдельными частицами.

Теперь зададим параметр для измерения (Analyze → Set measurements…), отметив соответствующие характеристики. В нашем случае были выбраны «Площадь» (Area), «Характеристики формы» (Shape descriptors), «Диаметр Фере» (Feret's diameter).

Запуск процесса измерения осуществляется опцией «Анализировать частицы…» (Analyze → Analyze particles…). В меню надо указать предельные величины площади учитываемых силуэтов на изображении (мы устанавливали величины от 5 мкм^2 до бесконечности). Для этого поставим «галочку» напротив «Показывать результаты» (Display results), чтобы результаты появились на экране в виде таблицы, и напротив «Исключить краевые» (Exclude on edges), чтобы не учитывать частично видимые гранулы по краям изображения. После этого нажатием кнопки «OK» получаем таблицу с результатами измерений в окне «Результаты» (Results).

Четвертый этап. Минимальная статистическая обработка полученных данных

Программа ImageJ предоставляет некоторые возможности по статистической обработке данных. Так, прямо в окне «Результаты» (Results) в меню «Распределение…» (Results → Distribution…) можно задать требуемые параметры и получить результат в графическом виде.

В нашем случае данные, полученные при анализе нескольких изображений для каждого образца, были скопированы в файл Excel и обработаны с помощью пакета «Анализ данных». Для анализа можно использовать любую предназначенную для этого программу, но поскольку этот протокол рассчитан для работы в любых, в том числе полевых и слабооснащенных лабораториях, имеет смысл пользоваться наиболее распространенным и знакомым программным продуктом, нередко установленным на компьютере «по умолчанию».

В качестве примера были взяты образцы крахмала сортов Алена, Невский и гибрида 785/8-5. Здесь и далее для каждого образца проанализированы четыре микрофотографии с разных его участков на предметном стекле (250–350 гранул в каждом изображении). Полученные кривые распределения по максимальным диаметрам Фере показаны на рис. 4. Диаметр Фере – это расстояние между касательными к контуру изображения, проведенными параллельно направлению просмотра. В нашем случае для каждой гранулы автоматически выбиралась максимальная величина диаметра Фере и их совокупность представлялась в виде кривой, характерной для рассматриваемого образца крахмала. Видно, что крахмалы сорта Невский и гибрида 785/8-5 имеют преимущественно мономодальное распределение максимальных диаметров Фере с модами 22 и 67 мкм соответственно. Гранулы крахмала сорта Алена распределены более равномерно, от 3 до 85 мкм, со значительным содержанием мелкой фракции и модой 5 мкм. Средние величины максимальных диаметров Фере указаны в таблице.

Округлость гранул оценивалась по формуле

$$\text{Округлость} = 4\pi \times \frac{\text{Площадь изображения гранулы}}{(\text{Периметр изображения гранулы})^2}.$$

Значение округлости, равное 0, формально соответствует бесконечно вытянутому многоугольнику, значение, равное 1, соответствует идеальному кругу.

По графику округлости гранул (рис. 5) можно отметить, что крахмал сорта Алена имеет немногим более высокую моду округлости и более узкое распределение. Гранулы

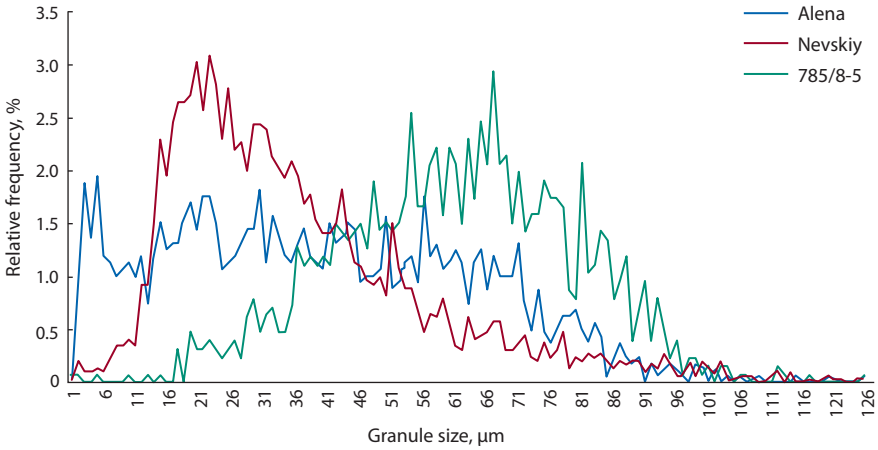


Fig. 4. Distribution of starch granules from Alena and Nevskiy cvs. and from hybrid 785/8-5 by maximum Feret diameters.

Mean values of maximum Feret diameters and rotundity and their standard deviations

Variety, hybrid	Mean values, M ± SEM	
	maximum Feret diameter, μm	rotundity
Alena	37.58 ± 20.09	0.78 ± 0.15
Nevskiy	25.64 ± 21.69	0.85 ± 0.08
785/8-5	52.21 ± 14.68	0.85 ± 0.04

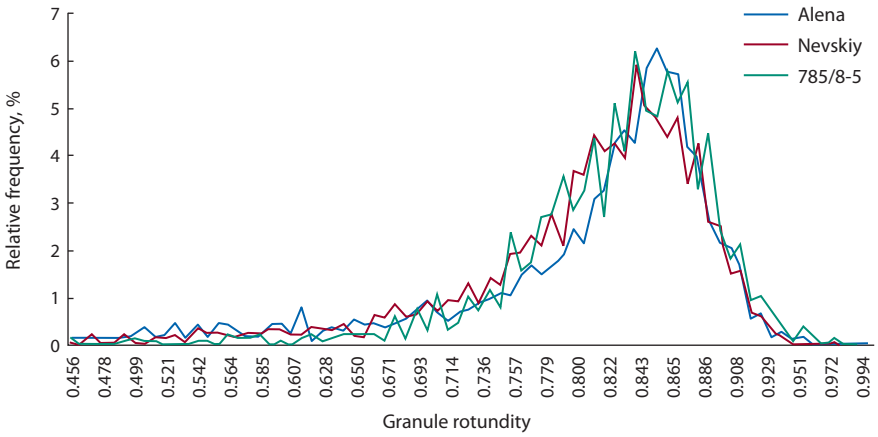


Fig. 5. Distribution of starch granules from Alena and Nevskiy cvs. and from hybrid 785/8-5 by rotundity.

крахмала сорта Невский и гибрида 785/8-5 менее округлые и отличаются несколько большим содержанием фракций 0.75–0.82. Средние величины округлости гранул крахмала приведены в таблице.

Описанный метод фенотипирования сортов и гибридов картофеля по микрофотографическим изображениям крахмала в сочетании со статистической обработкой будет в числе других использован при исследовании коллекции картофеля «ГенАгро» ФИЦ ИЦиГ СО РАН для выявления контрастных форм и связи с соответствующими генными сетями биосинтеза крахмала для дальнейшего применения в маркер-ориентированной селекции картофеля на полезные технологические признаки.

Протокол выделения крахмала из клубней картофеля

1. Отобрать два-три характерных для данного сорта или гибрида клубня картофеля без повреждений (средний вес одного клубня составляет примерно 90 г).
2. Клубни отмыть от земли, высушить после мытья, взвесить.
3. Измельчить на механической терке или соковыжималке, дважды пропустив биомассу клубня через устройство.
4. Отфильтровать полученную массу через тканевый фильтр (диаметр отверстий не менее 250 мкм), отжать.
5. Отфильтрованную массу, оставшуюся на ткани, перенести в мерный стакан с дистиллированной водой. Соотношение массы к объему воды примерно 1 : 2.
6. Взболтать несколько раз в течение 15 мин, отфильтровать полученную взвесь через тканевый фильтр (диаметр отверстий не менее 250 мкм), отжать.
7. Отфильтрованную массу, оставшуюся на ткани, опять поместить в мерный стакан с таким же количеством воды.
8. Взболтать несколько раз в течение 15 мин, отфильтровать полученную взвесь через тканевый фильтр (диаметр отверстий не менее 250 мкм), отжать.
9. Оставшуюся на фильтре мезгу высушить при комнатной температуре, взвесить.
10. Фильтрат оставить в покое при комнатной температуре на 90 мин, при этом происходит осаждение крахмала.
11. Декантировать жидкость, оставляя крахмал на дне.
12. Добавить к крахмалу ~300 мл воды, взболтать, оставить на 90 мин.
13. Декантировать жидкость, оставляя крахмал на дне.
14. Добавить к крахмалу 200 мл воды, взболтать, оставить на 90 мин.
15. Декантировать жидкость.
16. Влажный крахмал перенести на чашку Петри, высушить при комнатной температуре, периодически перемешивая.
17. Взвесить высушенный крахмал, определить препаративный выход (типичный выход – 10–20 % от массы исходного картофеля).

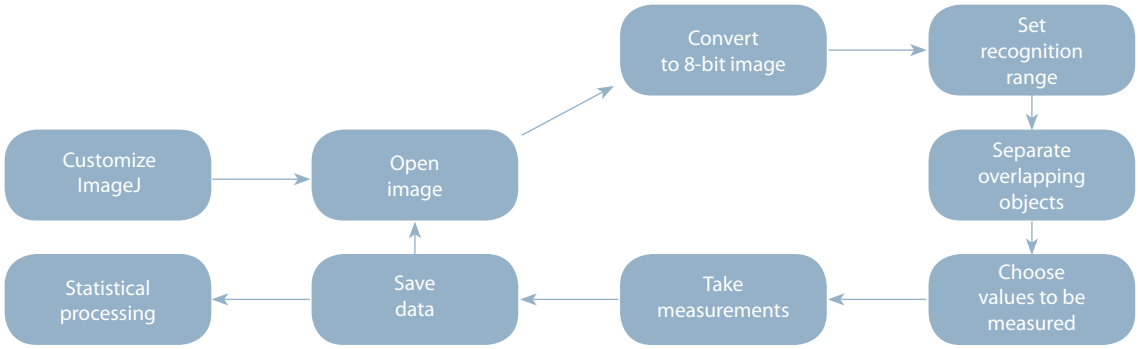


Fig. 6. Flow chart of image processing according to the protocol for microscopic assessment of potato starch granule morphology, steps 6–14.

Протокол оценки морфологии гранул картофельного крахмала методом микроскопирования (рис. 6)

1. Шпателем измельчить 5 мг крахмала, поместить в пробирку и добавить 1 мл дистиллированной воды.
2. К полученной смеси добавить 50 мкл раствора йода в водно-спиртовой смеси (можно использовать разбавленный в 200 раз смесью воды и спирта (1:1) аптечный раствор йода). Встряхнуть на шейкере.
3. Пипетированием взболтать содержимое пробирки до состояния суспензии и отсутствия осадка окрашенного крахмала на дне, нанести 20 мкл суспензии на предметное стекло и накрыть.
4. Получить не менее четырех микрофотографий с разных участков образца крахмала (250–350 гранул в каждом изображении).
5. Откалибровать ImageJ для работы с изображениями в микрометрах.
6. Открыть изображение гранул крахмала.
7. Выполнить преобразование в 8-битный рисунок (Image → Type → 8 bit).
8. Установить «Пределы распознавания…» (Image → Adjust → Threshold…), нажать «Применить» (Apply).
9. Разделить соприкасающиеся частицы «Водораздел» (Process → Binary → Watershed).
10. Выбрать измеряемые параметры (Analyze → Set measurements…).
11. Провести измерение (Analyze → Analyze particles…).
12. Скопировать или сохранить результаты измерений из получившейся таблицы в формате, читаемом программой для последующей обработки, например Excel.
13. Повторить шаги 6–12 для остальных изображений этого же образца.
14. При необходимости организовать данные в графическом виде.

Необходимые материалы и оборудование

1. Вода дистиллированная и набор лабораторной посуды для выделения крахмала.
2. Микроскоп с возможностью получения фотографических изображений гранул крахмала. В данной работе проводилась съемка в проходящем свете методом светлого поля. Использовался прямой исследовательский микроскоп Axio Scope A1 (Carl ZEISS), объектив – A-Plan 10x/0.25, CCD камера – AxioCam ICc 3, Адаптор – TV 2/3″C 0.63x, программное обеспечение ZEN, общее увеличение 10 (объектив) ×10 (окуляр) × 0.63 (адаптор).
3. Программа ImageJ для подсчета и измерения гранул крахмала.

Заключение

Гранулы картофельного крахмала различных сортов и гибридов различаются по морфологии и могут быть исследованы методом микроскопии. Так, типичные величины диаметра Фере гранул крахмала сортов Алена, Невский и гибрида 785/8-5 составляют 5, 22 и 67 мкм соответственно. Микрофотографирование гранул крахмала с последующей обработкой микрофотографий представляет собой доступный, экономичный, простой и эффективный подход к фенотипированию сортов и гибридов картофеля *Solanum tuberosum* L. по физико-химическим параметрам крахмала, который может применяться для ускоренного анализа большого числа образцов на ограниченном количестве природного материала, в том числе в полевых и хозяйственных лабораториях.

Acknowledgments

The development of the protocol for assessment of the morphology of starch granules was supported by State Budgeted Project 0324-2017-0001, additional subproject on bioresource collections. Microimaging, computerized processing, and analysis of starch samples were supported by the Russian Foundation for Basic Research, project RFFI-NSO 17-44-540510. Potato samples were received from the collection of Shared Access Center Agro, ICG, Novosibirsk. The authors are grateful to the staff of the Shared Access Center for Microscopic Analysis of Biological Objects, Siberian Branch of the RAS, and, personally, to Dr. T.E. Aleshina for assistance in the photography of starch samples.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Blennow A., Hansen M., Schulz A., Jurgensen K., Donald A.M., Sanderson J. The molecular deposition of transgenically modified starch in the starch granule as imaged by functional microscopy. J. Struct. Biology. 2003;143:229-241. DOI 10.1016/j.jsb.2003.08.009.

Chung H.-J., Li X.-Q., Kalinga D., Lim S.-T., Yada R., Liu Q. Physicochemical properties of dry matter and isolated starch from potatoes grown in different locations in Canada. Food Res. Int. 2014;57:89-94. DOI 10.1016/j.foodres.2014.01.034.

ImageJ. An open platform for scientific image analysis. Available at: http://imagej.net/Welcome. (Accessed 24.07.2017

Isleib D.R. Density of potato starch. Am. Potato J. 1958;35(3):428-429. DOI 10.1007/BF02851300.

Karlsson M.E., Leeman A.M., Björck I.M.E., Eliasson A.-C. Some physical and nutritional characteristics of genetically modified potatoes varying in amylose/amylopectin ratios. Food Chem. 2007;100: 136-146. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.09.032.

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

Li X.-Q., Zhang J., Luo S., Liu G., Murphy A., Leclerc Y., Xing T. Effects of sampling methods on starch granule size measurement of potato tubers under a light microscope. Int. J. Plant Biol. 2011;2(e5): 14-18. DOI 10.4081/pb.2011.e5.

Romano A., Mackie A., Farina F., Aponte M., Sarghini F., Masi P. Characterization, in vitro digestibility and expected glycemic index of commercial starches as uncooked ingredients. J. Food Sci. Technol. 2016;53(12):4126-4134. DOI 10.1007/s13197-016-2375-9.

Si Y., Sankaran S., Knowles R., Pavek M.J. Potato tuber length-width ratio assessment using image analysis. Am. J. Potato Res. 2017; 94(1):88-93. DOI 10.1007/s12230-016-9545-1.

de Vetten N.C.M.H. Method for modifying the size and/or morphology of starch granules. Pat. EP1473307A1, 2004.

Wilson J.D., Bechtel D.B., Todd T.C., Seib P.A. Measurement of wheat starch granule size distribution using image analysis and laser diffraction technology. Cereal Chemistry. 2006;83(3):259-268. DOI 10.1094/CC-83-0259.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):735-741
DOI 10.18699/VJ17.29-o

Эффекты ингибирования звеньев ренин-ангиотензиновой системы головного мозга у крыс НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертонией

Л.О. Климов[1, 2] ✉, М.А. Рязанова[1], Л.А. Федосеева[1], А.Л. Маркель[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

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) – одна из основных систем, регулирующих артериальное давление и водно-солевой гомеостаз организма и участвующих в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Ангиотензиновые пептиды – продукты ферментативного гидролиза ангиотензиногена – могут синтезироваться как в кровяном русле, так и в тканях, в том числе в различных отделах головного мозга. Исследования локальных тканевых РАС в контексте артериальной гипертонии ведутся уже достаточно давно. Показано, что стойкое повышение уровня артериального давления (АД) часто ассоциировано с изменениями в работе центральной (мозговой) РАС в различных моделях гипертонической болезни (ГБ) и у людей. Тем не менее до сих пор до конца не ясно, являются ли данные изменения сами по себе достаточными для формирования гипертензивного статуса и можно ли использовать звенья центральной РАС в качестве мишеней для терапии гипертонической болезни. В работе исследовано влияние длительного ингибирования РАС головного мозга на артериальное давление и экспрессию генов РАС в тканях головного мозга и почке у крыс с наследственной стресс-индуцированной артериальной гипертонией (линия НИСАГ). Ингибирование проводили с использованием широко распространенных фармакологических агентов – лозартана и беназеприла. Для доставки препаратов в боковой желудочек мозга использовали осмотические минипомпы. Эксперимент продолжался 13 дней. Показано, что длительное ингибирование центральной РАС, в частности рецептора ангиотензина II первого типа, у крыс НИСАГ способно приводить к снижению АД и значительным изменениям в уровне экспрессии генов мозговой РАС. При этом содержание мРНК генов РАС почки у крыс НИСАГ не изменяется. Таким образом, показано, что мозговая РАС играет важную роль в патогенезе и поддержании гипертензивного статуса при стресс-индуцированной форме ГБ.

Ключевые слова: гипертония; крысы НИСАГ; центральная РАС; экспрессия мРНК генов; артериальное давление.

Effects of brain renin-angiotensin system inhibition in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension

L.O. Klimov[1, 2] ✉, M.A. Ryazanova[1], L.A. Fedoseeva[1], A.L. Markel[1, 2]

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

The renin-angiotensin system (RAS) is one of the main systems regulating arterial pressure and water-salt homeostasis of the body and is involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Angiotensin peptides – products of enzymatic hydrolysis of angiotensinogen – can be synthesized not only in the blood stream, but also in tissues, including various regions of the brain. Studies of local tissue RAS in the context of arterial hypertension have been conducted for a long time. It has been shown that a steady arterial pressure increase is often associated with changes in the functioning of the central (brain) RAS in various animal models of hypertensive disease and in humans. Nevertheless, it is still not completely clear whether these changes alone are sufficient for the formation of hypertensive status, and whether the components of the central RAS can be used as targets for the treatment of hypertensive disease. Effects of prolonged inhibition of the brain RAS on blood pressure and expression of RAS genes in brain and kidney tissues in ISIAH (inherited stress-induced arterial hypertension) rats were studied. Inhibition was performed using widely used pharmacological agents, losartan and benazepril. Osmotic minipumps were used to deliver drugs to the lateral ventricle of the brain. It was shown that prolonged inhibition of the central RAS, AT1 receptors in particular, can lead to a decrease in blood pressure and significant changes in the level of expression of brain RAS genes in ISIAH rats. The mRNA level of RAS genes in the kidney does not significantly change due to this inhibition. Thus, the participation of the central RAS in the pathogenesis and maintenance of hypertensive status during stress induced form of hypertensive disease in ISIAH rats was confirmed.

Key words: hypertension; ISIAH rats; central RAS; mRNA expression; blood pressure.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Климов Л.О., Рязанова М.А., Федосеева Л.А., Маркель А.Л. Эффекты ингибирования звеньев ренин-ангиотензиновой системы головного мозга у крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертонией (НИСАГ). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):735-741. DOI 10.18699/VJ17.29-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Klimov L.O., Ryazanova M.A., Fedoseeva L.A., Markel A.L. Effects of brain renin-angiotensin system inhibition in rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):735-741. DOI 10.18699/VJ17.29-o (in Russian)

Received 07.06.2017
Accepted for publication 26.06.2017
Online 02.10.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: maple1708@mail.ru

Гипертоническая болезнь (ГБ) – одно из наиболее распространенных хронических заболеваний у взрослых и пожилых людей во всем мире. Данная патология не только снижает качество жизни больных, но и сопровождается повышением риска развития таких осложнений, как мозговой инсульт, инфаркт миокарда, тромбоз сосудов, нефросклероз и др. Сложность проблемы, стоящей перед исследователями, заключается в том, что ГБ – мультифакторная патология. Она может развиваться вследствие разных генетических и средовых причин, которые к тому же могут действовать как изолированно, так и во взаимодействии друг с другом. Гены и среда примерно в одинаковой степени ответственны за вероятность развития ГБ в человеческой популяции.

Крысы с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертонией (НИСАГ/ISIAH) представляют одну из наиболее удобных моделей для изучения развития ГБ человека, так как эта линия моделирует развитие гипертензии вследствие воздействия психоэмоционального стресса. Крысы НИСАГ имеют специфические для ГБ морфологические изменения органов, в том числе изменения морфологии почек и гипертрофию левого желудочка сердца (Markel, 1992). У крыс НИСАГ в плазме крови также изменен профиль реакции на стресс катехоламинов и кортикостероидов (Антонов и др., 2015).

Исследования ключевых генов, способных приводить к формированию ГБ, показали, что они участвуют в регуляции функции основных физиологических систем контроля артериального давления (АД), и прежде всего ренин-ангиотензиновой системы (РАС) (Unger, 2002). Действующим агентом РАС является ангиотензин II (Ang II). Компоненты системы синтезируются практически во всех тканях организма, поэтому важен не только факт их синтеза и количество того или иного компонента, но и локализация, так как локальные «тканевые» РАС могут в значительной степени оказывать влияние на работу ключевых органов регуляции АД. Особое значение имеет РАС головного мозга.

Наличие отдельных компонентов РАС в тканях ЦНС было известно с 1970-х гг. В 1978 г. D. Ganten и G. Speck доказали возможность синтеза Ang II непосредственно в тканях головного мозга и была сформулирована концепция автономной мозговой РАС (Ganten, Speck, 1978). РАС мозга в определенном смысле независима от состояния системной РАС, поскольку основные циркулирующие в крови компоненты данной системы не способны преодолевать гематоэнцефалический барьер (Young, Davisson, 2015). Компоненты РАС активно синтезируются в циркумвентрикулярной области, а также в структурах продолговатого мозга, в особенности в ростральной вентролатеральной (RVLM) и каудальной вентролатеральной (CVLM) областях, и ядре одиночного пути (NTS) (McKinley et al., 2003). Несмотря на то что со времени открытия центральной РАС прошло уже много лет, представления о ее функциях до сих пор до конца не исследованы, также расширяются представления о количестве генов, вовлеченных в ее работу. Помимо этого, имеются данные о взаимодействии центральной РАС и множества других регуляторных систем внутри различных отделов головного мозга (Goyal et al., 2010; Grobe et al., 2010; Hilzendeger et al., 2012). Ang II, синтезируемый в тканях головного мозга, обладает множеством эффектов. Он взаимодействует с рецепторами нескольких типов, и эти взаимодействия лежат в основе осуществления большого числа нейрофизиологических событий и процессов, как физиологических, так и патологических: стресс, память, инсульт, болезнь Альцгеймера, алкоголизм, депрессия (Wright, Harding, 2013). Так же как и системная, мозговая РАС связана с регуляцией АД и развитием гипертонической болезни. Однако до сих пор не ясно, каким образом изменения в работе центральной РАС связаны с развитием стресс-индуцированной формы ГБ и, главное, посредством взаимодействия с какими генетико-физиологическими системами эти изменения реализуются.

Экспериментально показано, что большая часть изменений в работе центральной РАС, ассоциированных с повышением АД, в той или иной степени связана с повышенной стимуляцией рецепторов ангиотензина II первого типа (AT1) или с их увеличенной концентрацией (Reja et al., 2006; Bader, 2010). В результате такие изменения в ключевых по отношению к контролю АД структурах головного мозга могут приводить к активации симпатической нервной системы (Huang et al., 2006; Bader, 2010). Так возникает важный для практической медицины вопрос: возможно ли с помощью долговременной блокады звеньев РАС головного мозга снижать уровень АД при стресс-зависимой артериальной гипертонии, моделью которой являются крысы линии НИСАГ.

Материалы и методы

В работе использованы шестимесячные крысы-самцы НИСАГ. Крыс содержали в условиях конвенционального вивария для экспериментальных животных ИЦИГ СО РАН с 12-часовым циклом день-ночь и неограниченным доступом к воде и пище. Крысы, поступившие в опыт, находились в индивидуальных клетках не менее трех дней до начала эксперимента.

Животных, которым были имплантированы минипомпы, разделили на три группы (по пять крыс в каждой группе): 1) контрольная группа крыс НИСАГ, получавших искусственную спинно-мозговую жидкость (приготовлена по методике, рекомендованной производителем осмотической минипомпы http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html); 2) экспериментальная группа № 1 крысы НИСАГ, получавшие раствор лозартана – блокатора рецепторов AT1A (Cozaar®; Merck Sharp&Dohme) в искусственной спинно-мозговой жидкости в количестве 1 мг/кг веса животного в день; 3) экспериментальная группа № 2 крысы НИСАГ, получавшие раствор беназеприла – ингибитора ACE (Fortekor®; Novartis Sante Animale S.A.S.) в искусственной спинно-мозговой жидкости в количестве 250 мкг/кг веса животного в день. Дозировка лозартана выбрана в соответствии с результатами работ (Kishi et al., 2015); беназеприла – рассчитана как эквимолярная по отношению к известной эффективной концентрации его аналога каптоприла (Okuno et al., 1983). Срок хронического введения препаратов составил 13 дней.

За неделю до измерения систолического АД животных помещали в отдельные клетки. Систолическое АД измеряли косвенно методом хвостовой манжеты под действием

Primers used in the work

Gene	Primer sequence	$T_{annealing}$, °C	$T_{detection}$, °C
Rpl30	F-5′-ATGGTGGCTGCAAAGAAGAC-3′ R-5′-CAAAGCTGGACAGTTGTTGG-3′	61–64	84
Ace	F-5′-ATGGTACAGAAGGGCTGGAA-3′ R-5′-TTGTAGAAGTCCCACGCAGA-3′	62	88
Ace2	F-5′-TGCCGACCAAAGCATTAAAG-3′ R-5′-TCTCTCATGGCATAGGCAAC-3′	63	84
Agt	F-5′-CCTCGCTCTCTGGACTTATC-3′ R-5′-CAGACACTGAGGTGCTGTTG-3′	63	87
Agtr1a	F-5′-AAATGAGCACGCTTTCTTACCG-3′ R-5′-TGAGGCAGGGTGAATGGTCC-3′	63	86
Agtr2	F-5′-ACAAACCGGCAGATAAGCAT-3′ R-5′-GAGAGGAAGGGTTGCCAAAA-3′	63	83
Ren	F-5′-CCTGGGAGTCAAAGAGAAGA-3′ R-5′-ACAGGTCATCGTTCCTGAAG-3′	64	84

эфирного наркоза, чтобы исключить влияние психологического стресса, вызванного процедурой измерения. АД у каждого животного было измерено за один-два дня до операции, на седьмой день после имплантации насоса и на тринадцатый день. На следующий день после второго измерения крысы были подвергнуты эвтаназии.

Координаты для установки канюли были подобраны в соответствии с координатами атласа мозга крысы (Paxinos, Watson, 2007) и впоследствии проверены экспериментально на аналогичных по весу и возрасту крысах НИСАГ. Сверление трепанационного отверстия производили на 1.0 мм каудальнее от Брегмы и 1.0 мм латеральнее от сагиттального шва. Канюлю (внешний диаметр иглы = 0.36 мм; длина от плоскости прикрепления к черепу = 5 мм) погружали в трепанационное отверстие перпендикулярно плоскости черепа на глубину 5.0 мм.

Эвтаназию осуществляли путем мгновенной декапитации. Биологический материал – образцы почек, гипоталамуса и продолговатого мозга – быстро выделяли и помещали в жидкий азот, а затем хранили при –70 °C до выделения РНК.

Выделение мРНК, последующее получение кДНК и полуколичественный анализ содержания исходной мРНК исследуемых генов с помощью RT-PCR проводили аналогично методике, описанной в (Klimov et al., 2016). Характеристики использованных праймеров приведены в таблице.

Результаты и обсуждение

У исследуемых крыс НИСАГ блокада мозговых рецепторов ангиотензина II 1A типа AT1A приводит к достоверному снижению АД относительно контрольных животных, получавших плацебо (искусственную спинномозговую жидкость). В то же время применение ингибитора ACE не оказывало сколько-нибудь заметного действия на АД (рис. 1) по сравнению с контрольными животными. Нужно отметить, что достоверный эффект снижения АД у крыс экспериментальной группы, получавших блокатор ангиотензинового рецептора, наблюдался как спустя семь

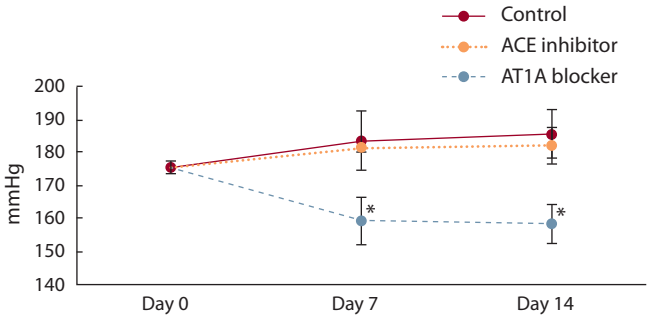


Fig. 1. Systolic blood pressure (mmHg) in ISIAH rats in the experiment on RAS blocker injection.

Asterisks mark the values of the experimental groups differing significantly (p <0.05) from rats in the control group, which received artificial cerebrospinal fluid.

дней после начала инфузии, так и через тринадцать дней эксперимента.

Результаты этого опыта в целом согласуются с данными исследователей, которые работают на других животных моделях гипертонической болезни. Так, в эксперименте, проведенном коллективом T. Nakata (2001), показано, что введение блокатора рецептора AT1A в боковой желудочек мозга с помощью минипомп в различных дозах вызывает эффект снижения АД у крыс Wistar с гипертонией, индуцированной введением нитро-L-аргинин-метилового эфира. Похожие результаты получены и на другой известной генетической модели гипертонии – крысах SHRSP, у которых интрацеребровентрикулярное введение блокатора ангиотензиновых рецепторов лозартана в течение 14 дней вызвало достоверное снижение АД более чем на 40 мм рт. ст. (Kishi et al., 2015). Показано также, что введение лозартана в паравентрикулярное ядро гипоталамуса способно компенсировать прессорные эффекты, вызываемые введением Ang II в данную структуру и, таким образом, ингибировать его гипертензивное действие (Qi et al., 2013).

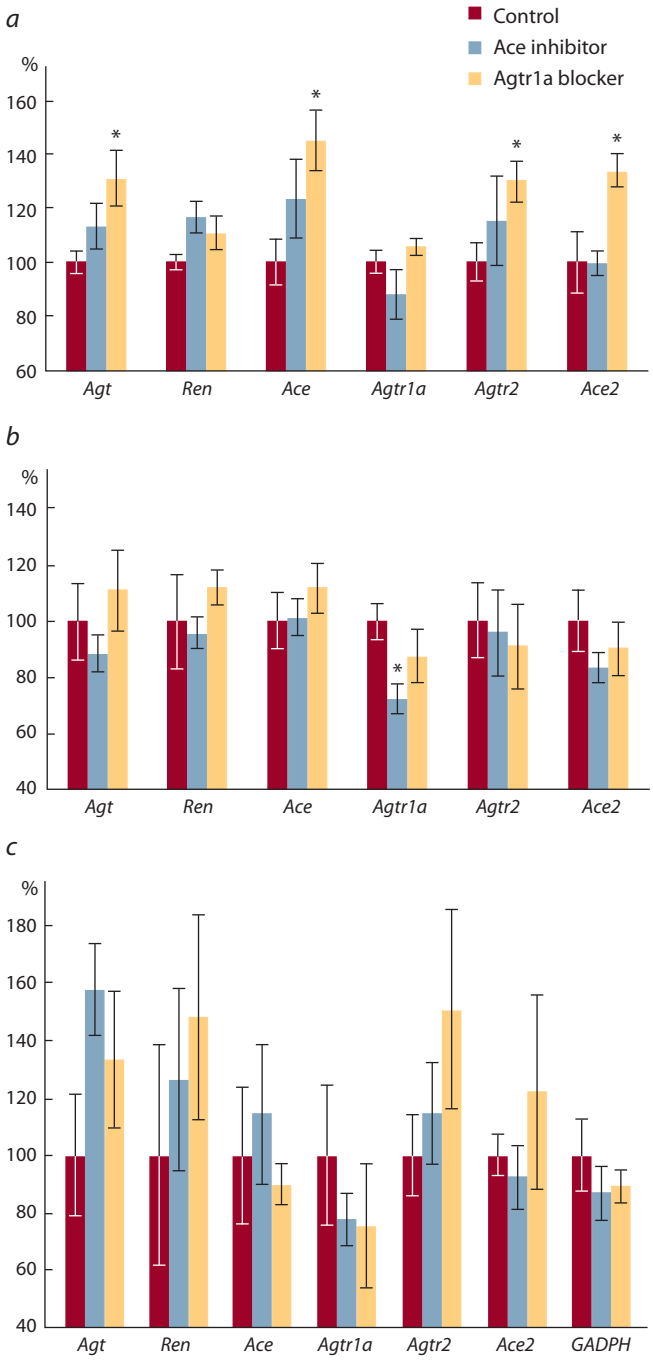


Fig. 2. Relative contents of mRNAs of RAS genes in ISIAH rats after prolonged RAS blocker injection into the lateral ventricles of the brain as percentages of the level in the control group: (*a*) medulla oblongata, (*b*) hypothalamus, (*c*) kidneys.

Asterisks mark the values of the experimental groups differing significantly ($p < 0.05$) from rats in the control group.

Что касается ингибирования АСЕ, которое не привело к снижению АД, то этот результат может быть связан с развитыми компенсаторными реакциями, возникающими в ответ на ингибирование АСЕ у крыс НИСАГ, а именно с активацией АСЕ-независимых механизмов генерации Ang II. К таковым можно отнести конверсию Ang I в Ang II химазой, обнаруженной в тканях мозга многих млекопитающих, в том числе гипертензивных крыс SHR (Yoshida et al., 2014). В результате такого альтернативного пути может генерироваться достаточное количество Ang II для стимуляции рецепторов AT1A и поддержания АД на повышенном у гипертензивных крыс уровне.

В нашем эксперименте длительное введение блокатора AT1A в боковой желудочек мозга с помощью осмотических минипомп привело к достоверному повышению в продолговатом мозге уровней мРНК генов *Agt*, *Ace*, *Agtr2* и *Ace2* на 31, 45, 30 и 34 % относительно контрольной группы соответственно (рис. 2, *а*).

Аналогичное введение ингибитора АСЕ не вызвало в продолговатом мозге достоверных изменений в уровнях мРНК исследуемых генов. Введение блокатора AT1A в боковой желудочек не приводило к достоверным изменениям в гипоталамусе. Аналогичное введение ингибитора АСЕ снизило уровень мРНК гена рецептора *Agtr1a* в гипоталамусе на 28 % (рис. 2, *б*).

В поддержании уровня АД, которое является одной их основных характеристик для организма, важнейшую роль играет так называемая «установочная точка» (set point) в центральном мозговом механизме регуляции АД. Известно, что базовой структурой головного мозга в осуществлении барорефлекса являются ядра одиночного пути продолговатого мозга (Zanutto et al., 2010). У большинства исследованных видов животных уровень АД стремится к конкретным значениям, характерным для определенных условий. Как у зрелых крыс неселекционированной популяции Вистар, так и у человека в норме уровень систолического АД находится в районе 120 мм рт. ст. Отклонения от нормальных условий, такие как эмоциональный стресс, смена солевой диеты и прочие средовые факторы, могут в той или иной степени обратимо влиять на уровень АД. Именно обратимость таких воздействий дает возможность считать, что существует определенная система, регулирующая уровень АД по его отклонению от базовой установочной точки, которая и реализуется в виде барорефлекса. При этом положение set point детерминировано генетически, но может изменяться под влиянием некоторых воздействий (Tank et al., 2001).

Есть данные о том, что изменение установочной точки барорефлекса напрямую связано с изменением уровня Ang II в тканях мозга, в частности в продолговатом мозге (Saigusa, Arita, 2014). Так, хроническое повышение экспрессии мРНК *Agt* и *Ren* с помощью искусственного встраивания дополнительных копий этих генов вело к хроническому увеличению частоты сердечных сокращений у мышей (Merrill et al., 1996). Активация симпатической нервной системы (СНС) после введения в боковые желудочки Ang II выявлена и у кроликов (Gao et al., 2005). Установлено, что микроинъекция Ang II в ядро одиночного пути продолговатого мозга крыс SHR и нормотензивных крыс вызывает дозозависимое повышение АД и частоты сердечных сокращений. Одновременно с этим значительно снижалась и чувствительность барорефлекса у крыс SHR. А длительное повышение уровня Ang II ингибировало барорецепторную функцию как у нормотензивных, так и у гипертензивных (SHR) крыс (Casto, Phillips, 1986).

Ранее мы показали, что у взрослых крыс НИСАГ (6 мес.) экспрессия основных компонентов РАС в продолговатом

мозге и гипоталамусе находится на уровне нормотензивного контроля. В то же время у молодых крыс НИСАГ (1.5 мес.) в гипоталамусе обнаружили высокий уровень экспрессии мРНК *Agt* и *Agtr1a*, а в продолговатом мозге – высокий уровень экспрессии мРНК *Agt* и *Agtr2* (Климов и др., 2012). Таким образом, существует генетически детерминированная отправная точка для хронического нейрогенно обусловленного увеличения уровня АД у крыс НИСАГ.

В нашем эксперименте длительное интрацеребровентрикулярное введение блокаторов Agtr1a привело к тому, что АД через семь дней было снижено относительно контрольной группы на 23 мм рт. ст. и в конце эксперимента – на 27 мм рт. ст. В результате такого изменения экспрессия мРНК четырех генов РАС в продолговатом мозге у животных экспериментальной группы была изменена, в том числе экспрессия мРНК *Agt* и *Ace*. Предположительно, это продиктовано необходимостью вернуться к характерным для взрослых крыс НИСАГ значениям АД, обусловленным измененным относительно нормотензивных крыс положением установочной точки.

Помимо сдвига установочной точки барорефлекса существует еще одна группа Ang II – зависимых механизмов, связанных с активацией СНС. В нее входят механизмы, затрагивающие функцию RVLM (Dampney et al., 2002). Это прежде всего активация СНС посредством накопления активных форм кислорода (Zimmerman et al., 2004; Hirooka, 2011; Gabor, Leenen, 2012). Еще один процесс активации центров СНС реализуется через Ang II – индуцированное ингибирование ГАМК-эргического торможения нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса. Активация таких нейронов, в свою очередь, приводит к возбуждению нейронов RVLM. Механизм реализуется через чувствительные к коклюшному токсину $G_{i/o}$-белки (Chen, Pan 2007; Carlson, Wyss, 2008).

Упоминания заслуживает и тот факт, что Ang II, находящийся в системном кровотоке, тоже способен влиять на структуры мозга и активировать СНС. Так, системный Ang II может действовать на мозг через участки, не защищенные гематоэнцефалическим барьером. Ангиотензин-зависимые нейронные пути, опосредующие такую активацию, протекают от нейронов в циркумвентрикулярных органах, таких как субфорникальный и сосудистый органы терминальной пластинки, которые расположены вне гематоэнцефалического барьера, до паравентрикулярного ядра в гипоталамусе и далее проецируются в RVLM (Cato, Toney, 2005; Leenen, 2014).

По-видимому, один или несколько из названных выше механизмов реализуется у крыс НИСАГ, вызывая либо сдвиг установочной точки барорефлекса в сторону ее повышения, либо хроническую активацию СНС и, как следствие, повышение тонуса сосудов и гипертонию.

Что касается отмеченной нами активации так называемого антигипертензивного плеча РАС (Ferreira et al., 2010), а именно генов *Ace2* и *Agtr2*, то это может быть связано с компенсаторными реакциями на накопление Ang II. Известно, что как блокада АТ1, так и ингибирование ACE ведут к накоплению в тканях субстратов ACE2: Ang I и Ang II, и в результате это приводит к усилению синтеза ACE2 (Ishiyama et al., 2004; Huang et al., 2010). Повышенный уровень экспрессии рецепторов АТ2 также может возникать в процессе компенсации чрезмерных прессорных эффектов, вызываемых высокой концентрацией Ang II (Gao, Zucker, 2011).

Еще одной особенностью эффектов центрального ингибирования стало отсутствие каких-либо достоверных различий, выявленных в работе РАС почки (см. рис. 2, *в*). Известно несколько основных механизмов контроля синтеза ренина почкой. Крысы линии НИСАГ относятся к низкорениновой форме гипертонии (Amstislavsky et al., 2006). Существуют данные о том, что в норме почечная перфузия и, соответственно, стимуляция механорецепторов почки – один из основных механизмов регуляции продукции системного ренина (Crowley et al., 2005; Ferrario, 2006; Atlas, 2007). В то же время в случае низкорениновой формы гипертонии такая регуляция может быть нарушена. Так, у крыс гипертензивной низкорениновой линии Lyon (LH) в ответ на снижение почечного перфузионного давления почка не увеличивает секрецию ренина *in vitro* (Medeiros et al., 1994). Возможным объяснением может служить то, что в зрелом возрасте у гипертензивных крыс активация рениновой системы почки посредством стимуляции ее собственных механорецепторов ослаблена вследствие смещения установочной точки внутри почки и не является ключевым механизмом для поддержания гипертензивного статуса (Федосеева и др., 2011). В то же время высокая вариабельность признака, установленная в ходе эксперимента, не дает возможности утверждать об этом с большой степенью уверенности.

В заключение хотелось бы в первую очередь ответить на вопрос, который поставлен в начале статьи. Действительно, звенья каскада мозговой РАС могут быть эффективными мишенями для ингибирования с целью снижения АД у крыс линии НИСАГ с гипертонией, индуцированной стрессом. Такой мишенью может быть рецептор Ang II – AT1A. Данный факт подтверждает большой вклад нейрогенных факторов, в том числе изменений в работе РАС головного мозга, в возникновение стресс-индуцированной формы ГБ.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0002 and the Russian Foundation for Basic Research, projects 13-04-01492 and 16-04-00763 (the preparation of experimental animals).

The authors are grateful to E.V. Antonov for methodological assistance in the preparation for cannulation.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Amstislavsky S., Welker P., Frühauf J.-H., Maslova L., Ivanova L., Jensen B., Markel A.L., Bachmann S. Renal and endocrine changes in rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH). Histochem. Cell Biol. 2006;125(6):651-659.

Antonov Ye.V., Alexandrovich Yu.V., Seryapina A.A., Klimov L.O., Markel A.L. Stress and arterial hypertension: ISIAH rat strain. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):455-459. DOI 10.18699/VJ15.060. (in Russian)

Atlas S.A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. J. Manag. Care Pharm. 2007; 13(8):S9-S20.

Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2010;50: 439-465.

Carlson S.H., Wyss J.M. Neurohormonal regulation of the sympathetic nervous system: New Insights into central mechanisms of action. Curr. Hypertens. Rep. 2008;10(3):233-240.

Casto R., Phillips M.I. Angiotensin II attenuates baroreflexes at nucleus tractus solitarius of rats. Am. J. Physiol. 1986;250(2):R193-R198.

Cato M.J., Toney G.M. Angiotensin II excites paraventricular nucleus neurons that innervate the rostral ventrolateral medulla: an in vitro patch-clamp study in brain slices. J. Neurophysiol. 2005;93(1):403-413. DOI 10.1152/jn.01055.2003.

Chen Q., Pan H.L. Signaling mechanisms of angiotensin II-induced attenuation of GABAergic input to hypothalamic presympathetic neurons. J. Neurophysiol. 2007;97(5):3279-3287.

Crowley S.D., Gurley S.B., Oliverio M.I., Pazmino A.K., Griffiths R., Flannery P.J., Spurney R.F., Kim H.S., Smithies O., Le T.H., Coffman T.M. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. J. Clin. Invest. 2005;115(4):1092-1099.

Dampney R., Coleman M., Fontes M., Hirooka Y., Horiuchi J., Li Y.W., Polson J., Potts P., Tagawa T. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2002;29(4):261-268.

Fedoseeva L.A., Ryazanova M.A., Antonov E.V., Dymshits G.M., Markel A.L. Renin-angiotensin system gene expression in the kidney and in the heart in hypertensive ISIAH rats. Biochemistry (Moscow). Suppl. Series B: Biomedical Chemistry. 2011;5(1):37-43.

Ferrario C.M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease – therapeutic implications of more than a century of research. J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. 2006;7(1):3-14.

Ferreira A.J., Santos R.A.S., Bradford C.N., Mecca A.P., Sumners C., Katovich M.J., Raizada M.K. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. Hypertension. 2010;55(2):207-213.

Gabor A., Leenen F.H.H. Central neuromodulatory pathways regulating sympathetic activity in hypertension. J. Appl. Physiol. 2012; 113(8):1294-1303. DOI 10.1152/japplphysiol.00553.2012.

Ganten D., Speck G. The brain renin-angiotensin system: a model for the synthesis of peptides in the brain. Biochem. Pharmacol. 1978; 27(20):2379-2389.

Gao L., Wang W., Li Y.L., Schultz H.D., Liu D., Cornish K.G., Zucker I.H. Sympathoexcitation by central ANG II: roles for AT1 receptor upregulation and NAD(P)H oxidase in RVLM. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005;288(5):H2271-H2279.

Gao L., Zucker I.H. AT2 receptor signaling and sympathetic regulation. Curr. Opin. Pharmacol. 2011;11(2):124-130. DOI 10.1016/j.coph.2010.11.004.

Goyal R., Goyal D., Leitzke A., Gheorghe C.P., Longo L.D. Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy. Reprod. Sci. 2010;17(3):227-238. DOI 10.1177/1933719109351935.

Grobe J.L., Grobe C.L., Beltz T.G., Westphal S.G., Morgan D.A., Xu D., de Lange W.J., Li H., Sakai K., Thedens D.R., Cassis L.A., Rahmouni K., Mark A.L., Johnson A.K., Sigmund C.D. The brain renin-angiotensin system controls divergent efferent mechanisms to regulate fluid and energy balance. Cell Metab. 2010;12(5):431-442. DOI 10.1016/j.cmet.2010.09.011.

Hilzendeger A.M., Morgan D.A., Brooks L., Dellsperger D., Liu X., Grobe J.L., Rahmouni K., Sigmund C.D., Mark A.L., A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2012;303(2): H197-H206. DOI 10.1152/ajpheart.00974.2011.

Hirooka Y. Oxidative stress in the cardiovascular center has a pivotal role in the sympathetic activation in hypertension. Hypertens. Res. 2011;34(4):407-412. DOI 10.1038/hr.2011.14.

Huang B.S., Cheung W.J., Wang H., Tan J., White R.A., Leenen F.H.H. Activation of brain renin-angiotensin-aldosterone system by central sodium in Wistar rats. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2006; 291(3):H1109-H1117. DOI 10.1152/ajpheart.00024.2006.

Huang M., Li X., Meng Y., Xiao B., Ma Q., Ying S., Wu P., Zhang Z. Upregulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 in hepatic fibrosis by ACE inhibitors. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2010; 37(1):e1-e6. DOI 10.1111/j.1440-1681.2009.05302.x.

Ishiyama Y., Gallagher P.E., Averill D.B., Tallant E.A., Brosnihan K.B., Ferrario C.M. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. Hypertension. 2004;43:970-976. DOI 10.1161/01.HYP.0000124667.34652.1a.

Kishi T., Hirooka Y., Sunagawa K. Brain angiotensin II type 1 receptor blockade improves dairy blood pressure variability via sympatho-inhibition in hypertensive rats. Int. J. Hypertension. 2015;1-7. DOI 10.1155/2015/759629.

Klimov L.O., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., Redina O.E. Genome-wide transcriptome analysis of hypothalamus in rats with Inherited stress-induced arterial hypertension. BMC Genet. 2016; 17(1):13. DOI 10.1186/s12863-015-0307-8.

Klimov L.O., Fedoseeva L.A., Ryazanova M.A., Dymshits G.M., Markel A.L. Expression of renin-angiotensin system genes in brain structures of ISIAH rats with stress-induced arterial hypertension. Bull. Exp. Biol. Med. 2013;154(3):357-360.

Leenen F.H.H. Actions of circulating angiotensin II and aldosterone in the brain contributing to hypertension. Am. J. Hypertens. 2014; 27(8):1024-1032. DOI 10.1093/ajh/hpu066.

Markel A.L. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. Genetic Hypertension Colloque INSERM. 1992;(218):405-407.

McKinley M.J., Albiston A.L., Allen A.M., Mathai M.L., May C.N., McAllen R.M., Oldfield B.J., Mendelsohn F.A.O., Chai S.Y. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2003;35(6):901-918. DOI 10.1016/S1357-2725(02)00306-0.

Medeiros I.A., Zhang B.L., Bertolino S., Sassard J. Pressure control of renal renin release in Lyon hypertensive rats. J. Hypertens. 1994; 12(8):871-877.

Merrill D.C., Thompson M.W., Carney C.L., Granwehr B.P., Schlager G., Robillard J.E., Sigmund C.D. Chronic hypertension and altered baroreflex responses in transgenic mice containing the human renin and human angiotensinogen genes. J. Clin. Invest. 1996;97(4): 1047-1055. DOI 10.1172/JCI118497.

Nakata T., Takeda K., Harada S., Oguni A., Hatta T., Kawa T., Itoh H., Sasaki S., Nakagawa M. Role of the central nervous system in the development of hypertension produced by chronic nitric oxide blockade in rats. Hypertens. Res. 2001;24(1):39-45. DOI 10.1291/hypres.24.39.

Okuno T., Nagahama S., Lindheimer M.D., Oparil S. Attenuation of the development of spontaneous hypertension in rats by chronic central administration of captopril. Hypertension. 1983;5(5):653-662. DOI 10.1161/01.HYP.5.5.653.

Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic Coordinates. N. Y.: Elsevier, 2007.

Qi J., Zhang D.M., Suo Y.P., Song X.A., Yu X.J., Elks C., Lin Y.X., Xu Y.Y., Zang W.J., Zhu Z., Kang Y.M. Renin-angiotensin system modulates neurotransmitters in the paraventricular nucleus and contributes to angiotensin II-induced hypertensive response. Cardiovasc. Toxicol. 2013;13(1):48-54. DOI 10.1007/s12012-012-9184-9.

Reja V., Goodchild A.K., Phillips J.K., Pilowsky P.M. Upregulation of angiotensin AT1 receptor and intracellular kinase gene expression in

hypertensive rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2006;33(8):690-695. DOI 10.1111/j.1440-1681.2006.04420.x.

Saigusa T., Arita J. ANG II Modulates both slow and rapid baroreflex responses of barosensitive bulbospinal neurons in the rabbit rostral ventrolateral medulla. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2014;306(8): R538-R551. DOI 10.1152/ajpregu.00285.2013.

Tank J., Jordan J., Diedrich A., Stoffels M., Franke G., Faulhaber H.D., Luft F.C., Busjahn A. Genetic influences on baroreflex function in normal twins. Hypertension. 2001;37(3):907-910. DOI 10.1161/01.HYP.37.3.907.

Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. Am. J. Cardiol. 2002;89(2A):3A-9A; DOI 10.1016/S0002-9149(01)02321-9.

Wright J.W., Harding J.W. The brain renin-angiotensin system: A diversity of functions and implications for CNS diseases. Pflugers Arch. 2013;465(1):133-151. DOI 10.1007/s00424-012-1102-2.

Yoshida M., Watanabe Y., Yamanishi K., Yamashita A., Yamamoto H., Okuzaki D., Shimada K., Nojima H., Yasunaga T., Okamura H., Matsunawga H., Yamanishi H. Analysis of genes causing hypertension and stroke in spontaneously hypertensive rats: Gene expression profiles in the brain. Int. J. Mol. Med. 2014;33(4):887-896. DOI 10.3892/ijmm.2014.1631.

Young C.N., Davisson R.L. Angiotensin-II, the brain, and hypertension: an update. Hypertension. 2015;66(5):920-926. DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.03624.

Zanutto B.S., Valentinuzzi M.E., Segura E.T. Neural set point for the control of arterial pressure: role of the nucleus tractus solitarius. Biomed. Eng. Online. 2010;9:4. DOI 10.1186/1475-925X-9-4.

Zimmerman M.C., Lazartigues E., Sharma R.V., Davisson R.L. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. Circ. Res. 2004; 95(2):210-216. DOI 10.1161/01.RES.0000135483.12297.e4.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):742-749
DOI 10.18699/VJ17.30-o

Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности

Р.Н. Мустафин[1] ✉, Э.К. Хуснутдинова[1, 2]

[1] Башкирский государственный университет, Уфа, Россия
[2] Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Анализ литературных данных дает возможность предположить, что основой эпигенетических преобразований геномов в онтогенезе являются особенности распределения, количества и состава мобильных генетических элементов. Транспозоны составляют большую часть геномов многоклеточных эукариот, эволюционное сохранение данных структур сопряжено с двумя универсальными механизмами управления дифференцировки клеток – процессингом некодирующих РНК и регуляцией сплайсинга. Данные универсальные механизмы первоначально были направлены на защиту от вирусов и мобильных генетических элементов, однако в дальнейшем кооперация защитных систем с механизмами управления взаимосвязи клеток и их дифференцировкой стала причиной возникновения и эволюции многоклеточных. В пользу этого говорят эволюционное сохранение комплекса взаимосвязанных ферментов Drosha, Dicer, Argonaut, RdRP и их гомологов практически у всех многоклеточных, а также отсутствие данных ферментов у одноклеточных. Интроны происходят от мобильных генетических элементов, в распространении и регуляции интронов важную роль играют транспозоны с их продуктами экспрессии. Транспозоны регулируют экспрессию генов *in cis* и *in trans*, а также опосредованно путем продукции малых РНК, влияющих на собственную активность мобильных генетических элементов, как путем изменения метилирования ДНК и модификацией гистонов, так и посттранскрипционно. Кроме того, транспозоны рассматриваются в качестве важных источников длинных некодирующих РНК, участвующих в регуляции дифференцировки клеток. Закономерное изменение активности транспозонов в онтогенезе тканеспецифично и стадиеспецифично и сопряжено с экспрессией специфических некодирующих РНК транспозонного происхождения, изменяющих активность генов при дифференцировке клеток. Предполагается, что видоспецифические особенности активации транспозонов при каждом последующем делении клеток проходят эволюционный отбор и используются в качестве ключевых регуляторов роста и развития организма. Начиная с первого деления зиготы, расположение и состав транспозонов в геноме влияют на их наследуемую активацию в каждом последующем клеточном делении. Это вызывает изменение экспрессии определенных генов и дифференцировку клеток, в результате чего развивается целостный многоклеточный организм.

Ключевые слова: альтернативный сплайсинг; интроны; мобильные генетические элементы; некодирующие РНК; система РНК-интерференции; транспозоны; процессинг.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;2017;21(6):742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-o

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;2017;21(6):742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-o (in Russian)

Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity

R.N. Mustafin[1] ✉, E.K. Khusnutdinova[1, 2]

[1] Bashkir State University, Ufa, Russia
[2] Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Ufa, Russia

We hypothesized that the basis of epigenetic regulation of genomes in ontogenesis is the specificity of the distribution, number and composition of transposons. Transposons constitute the major part of the genomes of multicellular eukaryotes. The evolutionary preservation of transposons is associated with universal mechanisms for controlling cell differentiation: processing of non-coding RNAs and splicing regulation. These universal mechanisms were originally aimed at protecting against viruses and transposons. The cooperation of these protective systems with mechanisms for controlling the interrelation of cells and their differentiation became the basis for the emergence and evolution of multicellular eukaryotes. The evolutionary conservation of a complex enzymes Drosha, Dicer, Argonaut, RdRP and their homologues in all multicellular eukaryotes, and their absence in unicellular organisms supports this assumption. Introns originated from mobile genetic elements. Transposons played an important role in the propagation of introns in evolution and their regulation in ontogenesis. Transposons regulate the expression of genes *in cis* and *in trans*, and also indirectly by the production of small RNAs that affect their own activity, both by altering the DNA methylation and modifying histones, and at the posttranscriptional level. Tissue-specific and stage-specific changes in the activity of transposons in ontogenesis are associated with the expression of transposon-derived noncoding RNAs and altering the activity of genes, which leads to cell differentiation. We proposed that the species-specific features of activation of transposons for each subsequent cell division undergo evolutionary selection and are key regulators of the growth and development of the organism. We proposed that transposons in the genome affect their inherited activation in each subsequent cell division, which causes a change in cell differentiation.

Key words: alternative splicing; introns; mobile genetic elements; noncoding RNA; RNA interference; transposons; processing.

Received 30.05.2017
Accepted for publication 07.07.2017
Online 02.10.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: ruji79@mail.ru

В настоящее время эпигенетику принято считать наукой о наследуемых свойствах организма, не связанных с изменением собственно нуклеотидной последовательности ДНК. К числу известных эпигенетических механизмов относятся энзиматическое метилирование ДНК, гистоновый код и замалчивание генов малыми РНК (Ванюшин, 2013). Однако за последние годы накапливается все больше данных, позволяющих предположить, что основой эпигенетической наследственности являются конкретные структуры генома, связанные с некодирующей ДНК в межгенных и интронных областях. Причиной любых эпигенетических процессов должны быть изменения материальной структуры, для которой наиболее подходят состав, распределение и количество транспозонов (TE – transposable elements), специфичные для особей одного вида. В пользу данного предположения свидетельствует выявление у многоклеточных животных после оплодотворения яйцеклетки во вновь образованной зиготе глобального эпигенетического перепрограммирования генома, при котором вплоть до стадии бластоцисты обнаруживается глобальное деметилирование генома эмбриона, при котором стираются импринты мужских и женских геномов. Дифференцировка клеток внутренней клеточной массы с образованием трех зародышевых листков сопровождается установлением характерного для каждого из них паттерна метилирования (Баранов, Кузнецова, 2007). То есть метки метилирования вначале удаляются, после чего тканеспецифично и стадиеспецифично распределяются. За процесс перераспределения меток метилирования должны отвечать конкретные структуры. В то же время установлены тканеспецифические и стадиеспецифические особенности экспрессии некодирующих РНК (Dimmeler, Nicotera, 2013; Du et al., 2013; Samantarrai et al., 2013; Ong et al., 2015; Shen et al., 2015), регуляции альтернативных сплайсинговых вариантов генов (Feschotte, 2008; Belancio et al., 2010; Luco et al., 2011; Dumesic, Madhani, 2013), а также характер активации транспозонов (Ostertag et al., 2002; Prak et al., 2003; Muotri et al., 2005; Van den Hurk et al., 2007; Coufal et al., 2009; Macia et al., 2011; Marchetto et al., 2013). Транспозоны играют важную роль в генезе микроРНК (Borchert et al., 2011; Yuan et al., 2011; Gim et al., 2014; Platt et al., 2014; Qin et al., 2015), siРНК (Shabalina, Koonin, 2008; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2016), piРНК (Biryukova, Ye, 2015), lncРНК (Singh, Rath, 2012; Hadjiargyrou, Delihas, 2013; Johnson, Guigo, 2014) и регуляции сплайсинга (Luco et al., 2011). Так как регуляция сплайсинга, микроРНК, siРНК, piРНК, lncРНК имеет важное значение в онтогенетической регуляции развития органов и тканей, можно предположить, что транспозоны – материальная основа эпигенетической наследственности.

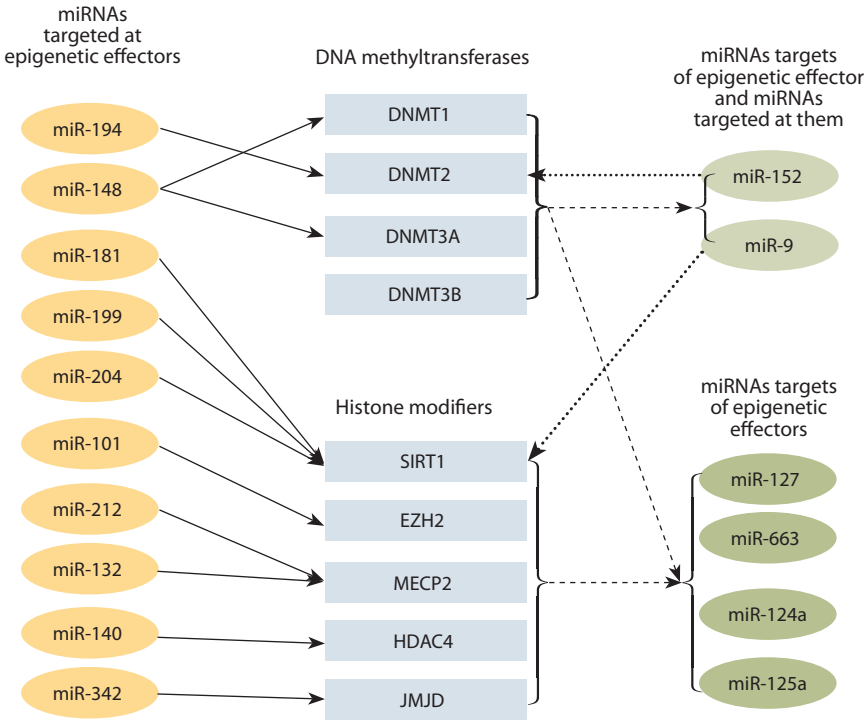
Влияние некодирующих РНК на дифференцировку клеток, метилирование ДНК и модификацию гистонов

Длинные некодирующие (lncРНК) и малые некодирующие (нкРНК) РНК регулируют активность генов не только посттранскрипционно, но и путем воздействия на модификацию гистонов и целевое метилирование ДНК (Zhang et al., 2015). Показано, что siРНК, происходящие от TE, могут способствовать метилированию ДНК и деметилированию лизина 9 в гистоне H3, изменяя активность TE и экспрессию генов (Xu et al., 2013; Zhang et al., 2016). Помимо siРНК, микроРНК также могут эпигенетически модулировать множество генов путем контролирования уровней первичных эпигенетических регуляторов – ДНК-метилтрансферазы (DNMT) и гистоновой деацетилазы (HDAC). Например, мишенью *miR-320* служит метил-CpG-связывающий белок-2 (MECP2), усиливающий клеточную пролиферацию. Взаимосвязь некоторых микроРНК с DNMT и HDAC представлена на рисунке (Samantarrai et al., 2013). Члены семейства miR-29 воздействуют на ДНК-метилтрансферазы DNMT3A и DNMT3B, подавляя метилирование и туморогенез путем защиты от *de novo* метилирования. miR-29 вовлечены также в деметилирование ДНК, влияя на метилцитозин диоксидазу 1 (TET1) и тимин-ДНК-гликозилазу (TDG) (Morita et al., 2013). Связывание некоторых микроРНК, таких как miR-155-5p, с DNMT1 ведет к ингибированию ее ферментативной активности (Zhang et al., 2015).

Доказано, что нкРНК регулируют развитие и дифференциацию стволовых клеток, воздействуя на образование органов и тканей многоклеточного организма путем регуляции экспрессии белок-кодирующих генов (Ong et al., 2015). Видоспецифическая экспансия специфических малых нкРНК оказывает выраженное влияние на онтогенез; кластеры малых нкРНК играют фундаментальную роль в развитии эмбриональных клеток, при этом регуляция эффективности транскрипции и стабильности микроРНК происходит тканеспецифично (Du et al., 2013). У дрозофилы выявлена микроРНК *miR-130a*, оказывающая воздействие на предопределенный размер органов (Shen et al., 2015). Обнаружена также микроРНК *miR-25*, способная обратно репрограммировать зрелые фибробласты мышей и человека в полипотентные стволовые клетки (Lu et al., 2012). Показано изменение экспрессии определенных малых нкРНК видоспецифически и тканеспецифически в различные стадии онтогенетического развития. Например, в коре головного мозга человека с возрастом усиливается активность микроРНК *miR-33b*, *miR-34*, *miR-181*, *miR-1271*. У мышей при старении в головном мозге возрастает экспрессия *miR-22*, *miR-101a*, *miR-720*, *miR-721*, в ткани печени – *miR-29*, *miR-30d*, *miR-34a* – и другие тканеспецифические особенности экспрессии микроРНК (Dimmeler, Nicotera, 2013). Имеется ряд работ, свидетельствующих как о закономерных перемещениях TE в раннем эмбриональном развитии многоклеточных животных *in vivo*, так и об их активации в разные периоды онтогенеза (Ostertag et al., 2002; Prak et al., 2003; Muotri et al., 2005; Van den Hurk et al., 2007; Coufal et al., 2009; Macia et al., 2011; Marchetto et al., 2013). Учитывая важную роль TE в качестве источников малых нкРНК, можно предположить, что сложившиеся в эволюции видоспецифические особенности активации транспозонов являются основой для эпигенетического регулирования геномов делящихся клеток, способствуя их дифференцировке с развитием целостного организма.

Транспозоны как источники некодирующих РНК

Транспозоны у многоклеточных эукариот составляют значительную долю геномов и служат причиной их



Crosslinking network of miRNAs and epigenetic effectors according to Samantarrai et al. (2013).

крупных размеров, значительно превышающих таковые у прокариот. Наименьший размер эукариотического генома определен у *Encephalitozoon intestinalis* (2.3 мегабазы), который в 70000 раз меньше размера генома другого эукариотического организма – *Paris japonica* (150000 мегабаз) (Elliott, Gregory, 2015). У прокариот размер наиболее крупного генома у *Myxococcus xanthus* (9.5 мегабазы) превышает размер наименьшего генома *Micoplasma genitalium* (0.58 мегабазы) всего в 16 раз (Патрушев, Минкевич, 2007). ТЕ занимают большую часть геномов растений – у некоторых представителей до 90 % всей ДНК. У животных ТЕ также распространены, например у мыши ТЕ составляют 40 %, у дрозофилы – 15–22, у нематоды – 12, у кур – 8.6 % генома (Yuan et al., 2011). У растений наиболее значимая фракция ТЕ геномов представлена LTR-содержащими ТЕ и ассоциируется с увеличением размеров геномов (например, у *Zea mays* за счет LTR размер генома увеличен в два раза за три миллиона лет). LTR-содержащие ТЕ занимают более 58 % всего генома *Allium cepa*, более 76 – *Hordeum vulgare* и более 91 % – *Asparagus officinalis* (Kubiak, Makalowska, 2017). Предполагается, что ТЕ занимают значительно большую долю в генезе последовательностей геномов, однако вследствие их высокой мутабельности распознать многие участки ДНК как результат инсерции мобильных элементов часто не удается. Например, в работе (de Koning et al., 2011) при анализе генома человека с помощью олигонуклеотидов, узнающих фрагменты ТЕ, накопленные за сотни миллионов лет эволюции, обнаружено, что ТЕ составляют более 60 % генома, тогда как, согласно современным методам исследования, ТЕ обнаруживают лишь в 45 % генома человека.

У эукариот ТЕ – важнейшая движущая сила эволюции, участвующая в построении межгенных участков и интронов. Последовательности ТЕ-происхождения выявляются в экзонах белок-кодирующих генов (Yuan et al., 2011). Кроме того, имеется ряд примеров использования геномами «хозяев» последовательностей ТЕ для участия в важных этапах онтогенеза. Например, гены RAG, полученные от древнего ТЕ, применяются для V(D)J рекомбинации (Lescale, Deriano, 2016). Белки HDP1 и HDP2, участвующие в активном деметилировании ДНК путем ацетилтрансферазного воздействия на гистоны, одомашнены из транспозазы и ДНК-связывающего белка, кодируемых транспозоном суперсемейства *Harbinger* (Duan et al., 2017). Белки Env оболочки эндогенных ретровирусов одомашнены для формирования объединенного клеточного слоя плаценты на поверхности матки (Dupressoir et al., 2012).

ТЕ служат важнейшим источником малых интерферирующих РНК (siРНК) у животных и растений. Более того, siРНК ТЕ-происхождения воздействуют на РНК-направленное метилирование ДНК (RdDM), вызывая сайленсинг не только ТЕ, но и белок-кодирующих генов, в том числе транскрипционных факторов, оказывая важное влияние на онтогенетическое развитие (Shabalina, Koonin, 2008; Zhang et al., 2016). Основными источниками piРНК, например, у насекомых, также оказались транспозоны (Biryukova, Ye, 2015). Происхождение некоторых микроРНК от геномных повторов в смысловых и антисмысловых направлениях впервые выявлено на *Arabidopsis thaliana* (Llave et al., 2002). У животных первые RdmiRs (repeat-derived miRNAs) выявлены N.R. Smalheiser и V.I. Torvik (2005). Позднее J. Piriyapongsa с коллегами (2007) обнаружили 55 микроРНК ТЕ-происхождения у человека. В настоящее время получено множество доказательств, что микроРНК могут происходить от ТЕ у животных и растений. Например, в работе (Yuan et al., 2011) выявлено 226 RdmiRs в геноме человека, 115 – в геноме резуса, 141 – в геноме мыши. G.M. Borchert с коллегами (2011) сообщили об обнаружении 2392 микроРНК ТЕ-происхождения. 374 микроРНК ТЕ-происхождения описаны у летучей мыши, 128 – у собаки и 124 – у лошади (Platt et al., 2014). J. Gim с коллегами (2014) описали 1900 микроРНК ТЕ-происхождения, а S. Qin с коллегами (2015) – 409 ТЕ-микроРНК.

Таким образом, ТЕ служат важнейшими источниками нкРНК, участвующих в специфической регуляции активности генов, управляя дифференцировкой клеток в зависимости от ткани и стадии онтогенеза. Учитывая регуляторное влияние самих ТЕ *in cis* и *in trans* (Belancio et al., 2010; Kitkumthoron, Mutirangura, 2011; Fi-

natto et al., 2015) на гены и возможность саморегуляции продуктами собственной экспрессии (малые нкРНК), можно предположить, что ТЕ являются материальной основой эпигенетической наследственности – их распределение, состав и количество, специфичное для геномов одного вида, регулируют поэтапную активацию и сайленсинг специфических генов, способствующих дифференцировке клеток в зависимости от ткани, стадии развития и пространственного расположения, отражаясь на фенотипических особенностях. В пользу данного предположения говорит наследуемая активация ТЕ в онтогенезе и даже их перемещение на ранних этапах эмбрионального развития. Вероятно, что кооперация ТЕ с универсальными системами процессинга малых нкРНК и регуляции сплайсинга стала причиной возникновения многоклеточных эукариот в эволюции, о чем свидетельствует, например, отсутствие гомологов Drosha и Pasha у одноклеточных эукариот, тогда как они обнаруживаются даже у наиболее примитивных многоклеточных, например у типа *Cnidaria* (Moran et al., 2013), у представителей которых выявляются также консервативные для многих многоклеточных животных микроРНК *miR-100*, *miR-2022*, *miR-2023*, *miR-2030*, *miR-2036* (Liew et al., 2014). У прокариот нет системы, гомологичной эукариотической системе РНК-интерференции (RNAi), но они обладают независимо развитыми аналогичными механизмами защиты от экспрессии ТЕ (Shabalina, Koonin, 2008).

Изменение активности транспозонов в онтогенезе

Доказано, что ТЕ влияют на экспрессию близлежащих генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Многие промоторы и сигналы полиаденилирования генов человека и мыши произошли от ТЕ – их инсерции способствовали созданию линии дифференцировки специфических паттернов экспрессии генов. ТЕ, приобретающие регуляторную функцию, образуют кластеры вокруг генов, вовлеченных в развитие и транскрипционную регуляцию. Около 25 % промоторов в геноме человека содержат последовательности транспозонов. ТЕ создают сырье, из которого *cis*-регуляторные элементы эволюционируют *de novo* при точечных мутациях. Кроме того, *cis*-элементы предрасположены в последовательностях ТЕ (Feschotte, 2008). L1-элементы регулируют экспрессию генов *in cis* в соответствии с транскрипционной активностью промотора L1, 5′UTR которого контролируется метилированием и транскрибируется в прямом и обратном направлениях. Гипометилированные L1 могут контролировать экспрессию гена *in trans*, например в некоторых раковых клетках ингибирование обратной транскриптазы L1 может изменять экспрессию множества генов (Kitkumthoron, Mutirangura, 2011). В *Alu*-элементах появляются *cis*-регуляторные сигналы после их инсерции при аккумулировании мутаций, обретая способность воздействовать на многие гены. Например, у человека под регуляторным влиянием *Alu*-ассоциированных CpG-областей находится около 1000 генов (Belancio et al., 2010). LTR-элементы также регулируют активацию белок-кодирующих генов *in cis* (Finatto et al., 2015). LTR содержат сильные промоторы и энхансеры транскрипции, а также регуляторные последовательности для связывания с транскрипционными факторами, включая рецепторы стероидов и факторы процессинга. При инсерции LTR могут выполнять роль альтернативных промоторов и участвовать в регуляции сплайсинга РНК (Киселев, 2013).

Многочисленные экспериментальные исследования доказали закономерные наследуемые транспозиции различных ТЕ (LINE, *Alu*, SVA) в раннем эмбриогенезе мышей и человека *in vivo*, в зависимости от характера дифференцировки и вида ткани (Ostertag et al., 2002; Prak et al., 2003; Muotri et al., 2005; Van den Hurk et al., 2007; Coufal et al., 2009; Macia et al., 2011; Marchetto et al., 2013), что говорит о возможной роли данных явлений в качестве регулятора экспрессии генов. Сам характер транспозиций ТЕ, начиная с первого деления зиготы, с дальнейшей дифференцировкой вновь образованных клеток может быть унаследован видоспецифически и зависеть от количества, состава и распределения ТЕ в геноме. Аккумулирование инсерций в эмбриональных стволовых клетках человека доказано в экспериментах *in vitro*. Данные перемещения способствовали сайленсингу одних генов и активации других, что оказывало регуляторное воздействие для специфической дифференцировки клеток для выполнения определенных функций (Garcia-Perez et al., 2007). Помимо эмбрионального развития, ТЕ сохраняют высокий потенциал транспозиций в полипотентных стволовых клетках, что необходимо для их трансформации с дифференцировкой за счет избирательной регуляции специфических генов (Wissing et al., 2012; Klawitter et al., 2016). Более того, перемещения ТЕ происходят в различных клетках организма на протяжении всего онтогенеза, при этом вариации в одном организме формируют генетически различающиеся соматические клетки с геномным мозаицизмом в разных тканях. Доказано, что закономерные перемещения ТЕ имеют важное значение в нейрогенезе человека (Faulkner, 2011) и грызунов (Richardson et al., 2014). Выявлено, что у исследуемых линий мышей геномы клеток печени крупнее, чем в других органах. Данные изменения связаны с перемещениями ТЕ со стадиеспецифическими особенностями с пиком активности в 5 нед (Lee et al., 2012). Тканеспецифическое изменение размеров геномов под влиянием поэтапных наследуемых перемещений ТЕ выявлено, помимо печени, в клетках сердца исследуемых мышей в возрасте 29 нед, а также в коже и головном мозге мышей в возрасте 6 нед. При этом показано, что данные закономерные перемещения ТЕ способствовали специфическим преобразованиям в функционировании генома, необходимым для дифференцировки клеток при формировании органов и тканей (Lee et al., 2015). Многочисленные исследования доказали также характерную для вида наследуемую активацию определенных ТЕ в онтогенезе, что говорит об их возможном значении в регуляции экспрессии генов, необходимой для дифференцировки клеток при формировании органов и тканей (Prak et al., 2003; Van den Hurk et al., 2007; Coufal et al., 2009; Macia et al., 2011; Guo et al., 2016; Klawitter et al., 2016; Zakrzewski et al., 2017). Учитывая важнейшую роль ТЕ в генезе некодирующих РНК, регулирующих экспрессию генов, можно предположить, что ТЕ, являясь материальной основой эпигенетической наследственно-

сти, эволюционно запрограммированы на уровне вида на последовательный каскад транспозиций и/или их активаций в каждом клеточном делении. Данный закономерный цикл активации мобильных генетических элементов ведет к формированию целостного организма. Тканеспецифическая динамическая экспрессия РНК LINE-элементов с их мозаичным распределением представляет собой стационарный геномный поток при развитии млекопитающих. Показана выраженная экспрессия РНК P1-LINE в различных тканях и органах крыс с тканеспецифическим и динамическим паттерном в виде длинных некодирующих РНК (lncРНК) и малых нкРНК (Singh, Rath, 2012). Транспозоны – важный источник lncРНК, они формируют основу целевого распада мРНК через короткие несовершенные спаривания нуклеотидов. У человека тысячи lncРНК связаны с LTR-элементами, обеспечивающими их регуляторными сигналами (Hadjiargyrou, Delihas, 2013). Около 41 % экзонов генов lncРНК непосредственно образованы из ТЕ, а 83 % экзонов lncРНК имеют предположительное ТЕ-происхождение в связи с содержанием фрагментов их последовательностей (Johnson, Guigo, 2014). В пользу регуляторной роли закономерных наследуемых транспозиций и активации ТЕ в онтогенезе свидетельствуют высокие тканеспецифические особенности экспрессии lncРНК, влияющие на характер дифференцировки тканей (Ramsay et al., 2017).

Взаимосвязь сплайсинга с транспозонами и некодирующими РНК

В возникновении интронов важную роль играли ТЕ, способствуя их распространению в геномах (Lee, Stevens, 2016). Показано, например, что короткие неавтономные ТЕ независимо генерировали тысячи интронов у зеленых и бурых водорослей. Каждый ТЕ содержит один сайт сплайсинга, другой сайт кооптируется из последовательности гена, дублированной при инсерции ТЕ, способствуя идеальному сплайсингу (Huff et al., 2016). Взаимосвязь интронов с ТЕ существует даже у прокариот. У бактерий обнаружены химерные элементы IStrons, состоящие из интронов группы I и IS-элементов. В данных структурах интроны группы I, сами являющиеся мобильными генетическими элементами, обеспечивают IStron самосплайсирующейся способностью. При этом сплайсинг возможен по альтернативным путям (Tourasse et al., 2014). У животных гены микроРНК расположены в основном внутри интронов белок-кодирующих генов, зачастую формируя кластеры с транскрипцией в единый первичный транскрипт. В образовании микроРНК у многоклеточных животных, помимо Drosha-опосредованного механизма, применяется альтернативный путь с участием сплайсинга подходящих РНК, транскрибированных из интронов (миртронов), которые имитируют структурные особенности пре-микроРНК (Shabalina, Koonin, 2008). Учитывая важную роль ТЕ как источников микроРНК и их участие в распространении интронов, можно предположить, что в регуляции сплайсинга большое значение могут иметь специфические особенности активации ТЕ в онтогенезе, выработанные эволюционно на уровне вида. В пользу данного предположения говорит выявление множества высококонсервативных ТЕ в качестве альтернативных сплайсинговых экзонов или транскрипционных энхансеров, вводящих преждевременные стоп-кодоны и инициирующих нонсенс-опосредованный распад. Введение преждевременных стоп-кодонов и инициация нонсенс-опросредованного распада способствуют гомеостазу мРНК в клетке (Feschotte, 2008). Имеется ряд свидетельств о способности ТЕ регулировать сплайсинг, вызывая тканеспецифическую и стадиеспецифическую экспрессию определенных генов при дифференцировке клеток (Feschotte, 2008; Belancio et al., 2010; Dumesic, Madhani, 2013). Последовательности транспозонов содержат акцепторные и донорные сайты сплайсинга, данные сайты могут быть использованы во время транскрипции, что может способствовать изменению экспрессии генов (Belancio et al., 2010). Транскрипты ТЕ могут использоваться в качестве субстратов для продукции малых нкРНК из-за их тенденции фиксироваться в сплайсосомах. Имеется общая значимость объединенного с сплайсосомой биогенеза малых нкРНК для других систем регуляции работы генома. В качестве субстратов для биогенеза siРНК используются не полностью сплайсированные прекурсоры мРНК, и транскрипты ТЕ-происхождения считаются триггерами для РНК-сайленсинга в процессе сплайсинга в ядре (Dumesic, Madhani, 2013). Обнаружено также, что сплайсинг интронов способен подавлять систему RNAi, в частности, у *Arabidopsis* библиотеки малых нкРНК значительно обогащены для безинтронных генов. Экспериментально доказано, что внедрение интрона в трансген понижает РНК-сайленсинг в четыре раза (Christie et al., 2011).

Основная часть первичных транскриптов многоклеточных содержит более одного интрона и способна к альтернативному сплайсингу, в результате которого образуются различные мРНК из одного гена, что используется в дифференцировке клеток (Ulrich, Wahl, 2017). Поэтому количество генов, способных к альтернативному сплайсингу, возрастает при эволюционной диверсификации типов клеток в связи с усложнением программ развития (Bush et al., 2017). Помимо специфической продукции малых нкРНК, в тканеспецифической дифференцировке огромное значение имеет регуляция альтернативного сплайсинга, в которой важную роль также играют ТЕ. Традиционно считается, что альтернативный сплайсинг регулируется сплайсинговыми энхансерами и сайленсерами. Данные короткие консервативные последовательности РНК, обычно длиной 10 нуклеотидов, локализуются в экзонах или интронах и действуют либо изолированно, либо в виде кластеров. Функция указанных РНК заключается в стимуляции или ингибировании использования сайтов путем стимуляции или ингибирования использования сайтов сплайсинга посредством специфического связывания с такими регуляторными белками, как SR или малые ядерные рибонуклеопротеины (snRNP) (Pastor et al., 2009; Luco et al., 2011). Интересно, что источниками сплайсинговых энхансеров и сайленсеров также могут служить ТЕ (Lei, Vorechovsky, 2005). Например, выявлено, что из последовательности *Alu* экспрессируются сплайсинговые энхансеры, действующие за счет привлечения U1 snRNP (Pastor et al., 2009). Показано также, что подмножество SR-белков активирует криптический 3′-сайт сплайсинга в смысловом повторе *Alu*, локализованном в интроне 4 гена

LST1 человека. Использование данного криптического сайта сплайсинга контролируется сопоставляющимися сплайсинговыми сайленсерами и энхансерами, происходящими от *Alu* (Lei, Vorechovsky, 2005). На основании этого можно предположить, что малые нкРНК также могут выступать в качестве энхансеров и сайленсеров сплайсинга. В связи с наличием большого количества доказательств важного значения ТЕ в качестве источника малых нкРНК, выработанная в эволюции последовательность онтогенетической активации ТЕ может быть основой важнейших путей геномных преобразований при дифференцировке клеток (Borchert et al., 2011; Yuan et al., 2011; Xu et al., 2013; Gim et al., 2014; Platt et al., 2014; Biryukova, Ye, 2015; Qin et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Заключение

Получены многочисленные экспериментальные данные, позволяющие предположить, что в основе возникновения и эволюции многоклеточных эукариот ключевую роль играли универсальные системы процессинга малых нкРНК и регуляции сплайсинга. Данные универсальные механизмы имеют непосредственную связь с ТЕ (Lei, Vorechovsky, 2005; Feschotte, 2008; Shabalina, Koonin, 2008; Pastor et al., 2009; Belancio et al., 2010; Borchert et al., 2011; Yuan et al., 2011; Singh, Rath, 2012; Dumesic, Madhani, 2013; Hadjiargyrou, Delihas, 2013; Xu et al., 2013; Gim et al., 2014; Johnson, Guigo, 2014; Platt et al., 2014; Biryukova, Ye, 2015; Qin et al., 2015; Huff et al., 2016; Lee, Stevens, 2016; Zhang et al., 2016) и первоначально были направлены на защиту генома хозяев от чужеродных генетических последовательностей и мобильных генетических элементов (Shabalina, Koonin, 2008). Однако кооперация универсальных систем процессинга малых нкРНК и регуляции сплайсинга, помимо защиты от ТЕ с возможностью дифференцированного регулирования функциями генов, способствовала координации работы клеток в многоклеточных организмах. Большое количество инсерций различных ТЕ в геномах эукариот в эволюции способствовало усовершенствованию взаимосвязи универсальных систем регуляции онтогенеза с работой различных генов, что содействовало последовательной регуляции экспрессии определенных генов с фенотипическими проявлениями в виде формирования органов, тканей и целостного организма. ТЕ обладают способностью саморегуляции с чувствительностью к стрессу (Zhou, Kishima, 2017) и хозяин-опосредованным механизмам контроля экспрессии (Pizarro, Cristofari, 2016). ТЕ-опосредованный контроль экспрессии осуществляется благодаря образованию усеченных супрессорных копий для транспозаз-опосредованной ауторегуляции, использованию собственных антисмысловых промоторов, регуляторных факторов хозяина и образованию нкРНК из транспозонных последовательностей (Shabalina, Koonin, 2008; Borchert et al., 2011; Yuan et al., 2011; Singh, Rath, 2012; Hadjiargyrou, Delihas, 2013; Xu et al., 2013; Gim et al., 2014; Johnson, Guigo, 2014; Platt et al., 2014; Biryukova, Ye, 2015; Qin et al., 2015; Zhang et al., 2016). Хозяин-опосредованный контроль связан с воздействием эпигенетических факторов, таких как модификации гистонов, регуляторами которых являются сами ТЕ (Miousse et al., 2015), а также нкРНК ТЕ-происхождения (Shabalina, Koonin, 2008; Borchert et al., 2011; Yuan et al., 2011; Singh, Rath, 2012; Hadjiargyrou, Delihas, 2013; Xu et al., 2013; Gim et al., 2014; Johnson, Guigo, 2014; Platt et al., 2014; Biryukova, Ye, 2015; Qin et al., 2015; Zhang et al., 2016). На возможность формирования саморегуляторной системы ТЕ, способствующей росту и развитию организма, указывает чувствительность ТЕ к воздействию стероидных гормонов (Киселев, 2013). Учитывая важную роль ТЕ в формировании геномов, генезе некодирующих РНК, влияющих на метилирование ДНК и модификации гистонов (Upadhyay et al., 2017), можно предположить, что видоспецифические особенности расположения, количества и состава ТЕ служат основой эпигенетической наследственности.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Baranov V.S., Kuznetsova T.V. Tsitogenetika embrionalnogo razvitiya cheloveka [Cytogenetics of Human Embryonic Development]. St.-Petersburg, 2007. (in Russian)

Belancio V.P., Roy-Engel A.M., Deininger P.L. All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. Semin. Cancer. Biol. 2010;20(4): 200-210.

Biryukova I., Ye T. Endogenous siRNA and piRNAs derived from transposable elements and genes in the malaria vector mosquito Anopheles gambiae. BMC Genomics. 2015;16:278.

Borchert G.M., Holton N.W., Williams J.D., Hernan W.L., Bishop I.P., Dembosky J.A., Elste J.E., Gregoire N.S., Kim J.A., Koehler W.W., Lengerich J.C., Medema A.A., Nguyen M.A., Ower G.D., Rarick M.A., Strong B.N., Tardi N.J., Tasker N.M., Wozniak D.J., Gatto C., Larson E.D. Comprehensive analysis of microRNA genomic loci identifies pervasive repetitive-element origins. Mob. Genet. Elements. 2011;1(1):8-17.

Bush S.J., Chen L., Tovar-Corona J.M., Urrutia A.O. Alternative splicing and the evolution of phenotypic novelty. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Bilol. Sci. 2017;372(1713):pii:20150474.

Christie M., Croft L.J., Carroll B.J. Intron splicing suppresses RNA silencing in Arabidopsis. Plant. J. 2011;68(1):159-167.

Coufal N.G., Garcia-Perez J.L., Peng G.E., Yeo G.W., Mu Y., Lovci M.T., Morell M., O'Shea K.S., Moran J.V., Gage F.H. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. Nature. 2009; 460(7259):1127-1231.

de Koning A.P., Gu W., Castoe T.A., Batzer M.A., Pollock D.D. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. PLoS Genet. 2011;7(12):e1002384.

Dimmeler S., Nicotera P. MicroRNAs in age-related diseases. EMBO Mol. Med. 2013;5(2):180-190.

Du Z., Yang C., Rothschild M.F., Ross J. Novel microRNA families expanded in the human genome. BMC Genomics. 2013;14:98-105.

Duan C.G., Wang X., Xie S., Pan L., Miki D., Tang K., Hsu C.C., Lei M., Zhong Y., Hou Y.J., Wang Z., Zhang Z., Mangrauthia S.K., Xu H., Zhang H., Dilkes B., Tao W.A., Zhu J.K. A pair of transposon-derived proteins function in a histone acetyltransferase complex for active DNA demethylation. Cell Res. 2017;27(2):226-240.

Dumesic P.A., Madhani H.D. The spliceosome as a transposon sensor. RNA Biol. 2013;10(11):1653-1660.

Dupressoir A., Lavialle C., Heidmann T. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. Placenta. 2012;33(9):663-671.

Elliott T.A., Gregory T.R. Do larger genomes contain more diverse transposable elements? BMC Evol. Biol. 2015;15(1):69-81.

Faulkner G.J. Retrotransposons: mobile and mutagenic from conception to death. FEBS Lett. 2011;585(11):1589-1594.

Feschotte C. The contribution of transposable elements to the evolution of regulatory networks. Nat. Rev. Genet. 2008;9(5):397-405.

Finatto T., de Oliveira A., Chaparro C., da Maia L.C., Farias D.R., Woyann L.G., Mistura C.C., Soares-Bresolin A.P., Llauro C., Panaud O., Picault N. Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. Rice. 2015; 8(13). DOI 10.1186/s12284-015-0045-6.

Garcia-Perez J.L., Marchetto M.C., Muotri A.R., Coufal N.G., Gage F.H., O'Shea K.S., Moran J.V. LINE-1 retrotransposition in human embryonic stem cells. Hum. Mol. Genet. 2007;16(13):1569-1577.

Gim J., Ha H., Ahn K., Kim D.S., Kim H.S. Genome-wide identification and classification of microRNAs derived from repetitive elements. Genomics Inform. 2014;12(4):261-267.

Guo W., Zhang M.Q., Wu H. Mammalian non-CG methylations are conserved and cell-type specific and may have been involved in the evolution of transposon elements. Sci. Rep. 2016;6:32207-32219.

Hadjiargyrou M., Delihas N. The Intertwining of transposable elements and non-coding RNAs. Int. J. Mol. Sci. 2013;14(7):13307-13328.

Huff J.T., Zilberman D., Roy S.W. Mechanism for DNA transposons to generate introns on genomic scales. Nature. 2016;538(7626):533-536.

Johnson R., Guigo R. The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. RNA. 2014;20(7): 959-976.

Kiselev O.I. Endogenous retroviruses: structure and functions in the human genome. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 2013; 1:102-115. (in Russian)

Kitkumthorn N., Mutirangura A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. Clin. Epigenet. 2011;2:315-330.

Klawitter S., Fuchs N.V., Upton K.R., Munoz-Lopez M., Shukla R., Wang J., Garcia-Canadas M., Lopez-Ruiz C., Gerhardt D.J., Sebe A., Grabundaija I., Merkert S., Gerdes P., Pulgarin J.A., Bock A., Held U., Witthuhn A., Haase A., Sarkadi B., Lower J., Wolvetang E.J., Martin U., Ivics Z., Izsvak Z., Garcia-Perez J.L., Faulkner G.J., Schumann G.G. Reprogramming triggers endogenous L1 and Alu retrotransposition in human induced pluripotent stem cells. Nat. Commun. 2016;7:10286-10301.

Kubiak M.R., Makalowska I. Protein-coding genes' retrocopies and their functions. Viruses. 2017;9(4):pii:E80.

Lee K.H., Chiu S., Lee Y.K., Greenhalgh D.G., Cho K. Age-dependent and tissue-specific structural changes in the C57BL/6J mouse genome. Exp. Mol. Pathol. 2012;93(1):167-172.

Lee K.H., Yee L., Lim D., Greenhalgh D., Cho K. Temporal and spatial rearrangements of a repetitive element array on C57BL/6J mouse genome. Exp. Mol. Pathol. 2015;98(3):439-445.

Lee S., Stevens S.W. Spliceosomal intronogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016;113(23):6514-6519.

Lei H., Vorechovsky I. Identification of splicing silencers and enhancers in sense Alus: a role for pseudoacceptors in splice site repression. Mol. Cell. Biol. 2005;25(16):6912-6920.

Lescale C., Deriano L. The RAG recombinase: Beyond breaking. Mech. Ageing Dev. 2016;16:30263-30269. DOI 10.1016/j.mad.2016.11.003.

Liew Y.J., Aranda M., Carr A., Baumgarten S., Zoccola D., Tambutte S., Allemand D., Micklem G., Voolstra C.R. Identification of microRNA in the coral Styphora pistillata. PLoS One. 2014;9(3):e91101.

Llave C., Kasschau K.D., Rector M.A., Carrington J.C. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. 2002;14(7):1605-1619.

Lu D., Davis M.P., Abreu-Goodger C., Wang W., Campos L.S., Siede J., Vigorito E., Skarnes W.C., Dunham I., Enright A.J., Liu P. MiR-25 regulates Wwp2 and Fbxw7 and promotes reprogramming of mouse fibroblast cells to iPSCs. PLoS One. 2012;7(8):e40938.

Luco R.F., Allo M., Schor I.E., Kornblihtt A.R., Misteli T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. Cell. 2011;144(1):16-26.

Macia A., Munoz-Lopez M., Cortes J.L., Hastings R.K., Morell S., Lucena-Aguilar G., Marchal J.A., Badge R.M., Garcia-Perez J.L. Epigenetic control of retrotransposons expression in human embryonic stem cells. Mol. Cell. Biol. 2011;31(2):300-316.

Marchetto M.C., Narvaiza I., Denli A.M., Benner C., Lazzarini T.A., Nathanson J.L., Paguola A.C., Desai K.N., Herai R.H., Weitzman M.D., Yeo G.W., Muotri A.R., Gage F.H. Differential L1 regulation in pluripotent stem cells of humans and apes. Nature. 2013; 503(7477):525-529.

Miousse I.R., Chalbot M.G., Lumen A., Ferguson A., Kavouras I.G., Koturbash I. Response of transposable elements to environmental stressors. Mutat. Res. Rev. Mutat. Res. 2015;765:19-39.

Moran Y., Praher D., Fredman D., Technau U. The evolution of microRNA pathway protein components in Cnidaria. Mol. Biol. Evol. 2013;30(12):2541-2552.

Morita S., Horii T., Kimura M., Ochiya T., Tajima S., Hatada I. miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases. Int. J. Mol. Sci. 2013;14:14647-14658.

Muotri A.R., Chu V.T., Marchetto M.C., Deng W., Moran J.V., Gage F.H. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. Nature. 2005;435(7044):903-910.

Ong S., Lee W.H., Kodo K., Wu J.C. MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells. Adv. Drug Deliv. Rev. 2015;88:3-15.

Ostertag E.M., De Berardinis R.J., Goodier J.L., Zhang Y., Yang N., Gerton G.L., Kazazian H.H., Jr. A mouse model of human L1 retrotransposition. Nat. Genet. 2002;32(4):655-660.

Pastor T., Talotti G., Lewandowska M.A., Pagani F. An Alu-derived intronic splicing enhancer facilitates intronic processing and modulates aberrant splicing in ATM. Nucleic Acids Res. 2009;37(21):7258-7267.

Patrushev L.I., Minkevich I.G. The problem of the eukaryotic genome size. Uspekhi biologicheskoi khimii = Advances of Biological Chemistry. 2007;47:293-370. (in Russian)

Piriyapongsa J., Marino-Ramirez L., Jordan I.K. Origin and evolution of human microRNAs from transposable elements. Genetics. 2007; 176(2):1323-1337.

Pizarro J.G., Cristofari G. Post-transcriptional control of LINE-1 retrotransposition by cellular host factors in somatic cells. Front. Cell. Dev. Biol. 2016;4:14-23.

Platt R.N., Vandeweqe M.W., Kern C., Schmidt C.J., Hoffmann F.G., Ray D.A. Large number of novel miRNAs originate from DNA transposons and are coincident with a large species radiation in bats. Mol. Biol. Evol. 2014;31(6):1536-1545.

Prak E.T., Dodson A.W., Farkash E.A., Kazazian H.H. Jr. Tracking an embryonic L1 retrotransposition event. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003;100(4):1832-1837.

Qin S., Jin P., Zhou X., Chen L., Ma F. The role of transposable elements in the origin and evolution of microRNAs in human. PLoS One. 2015;10(6):e0131365.

Ramsay L., Marchetto M.C., Caron M., Chen S.H., Busche S., Kwan T., Pastinen T., Gage F.H., Bourgue G. Conserved expression of transposon-derived non-coding transcripts in primate stem cells. BMC Genomics. 2017;18(1):214-226.

Richardson S.R., Morell S., Faulkner G.J. L1 retrotransposons and somatic mosaicism in the brain. Annu. Rev. Genet. 2014;48:1-27.

Samantarrai D., Dash S., Chhetri B., Mallick B. Genomic and epigenomic cross-talks in the regulatory landscape of miRNAs in breast cancer. Mol. Cancer Res. 2013;11(4):315-328.

Shabalina S.A., Koonin E.V. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. Trends Ecol. Evol. 2008;23(10):578-587.

Shen S., Guo X., Yan H., Lu Y., Ji X., Li L., Liang T., Zhou D., Feng X.H., Zhao J.C., Yu J., Gong X.G., Zhang L., Zhao B. A miR-130a-YAP positive feedback loop promotes organ size and tumorogenesis. Cell Res. 2015;25:997-1012.

Singh D.K., Rath P.C. Long interspersed nuclear elements (LINEs) show tissue-specific, mosaic genome and methylation-unrestricted, widespread expression of noncoding RNAs in somatic tissues of the rat. RNA Biol. 2012;9(11):1380-1396.

Smalheiser N.R., Torvik V.I. Mammalian microRNAs derived from genomic repeats. Trends Genet. 2005;21(6):322-326.

Tourasse N.J., Stabell F.B., Kolsto A.B. Survey of chimeric IStron elements in bacterial genomes: multiple molecular symbioses between

group I intron ribozymes and DNA transposons. Nucleic Acids Res. 2014;42(20):12333-12351.

Ulrich A.K.C., Wahl M.C. Human MFAP1 is a cryptic ortholog of the Saccharomyces cerevisiae Spp381 splicing factor. BMC Evol. Biol. 2017;17:91-107.

Upadhyay U., Srivastava S., Khatri I., Nanda J.S., Subramanian S., Arora A., Singh J. Ablation of RNA interference and retrotransposons accompany acquisistion and evolution of transposases to heterochromatin protein CENPB. Mol. Biol. Cell. 2017;28(8):1132-1146.

Van den Hurk J.A., Meij I.C., Seleme M.C. L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. Hum. Mol. Genet. 2007;16(13):1587-1592.

Vanyushin B.F. Epigenetics today and tomorrow. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(4/2):805-832. (in Russian)

Wissing S., Munoz-Lopez M., Macia A., Yang Z., Montano M., Collins W., Garcia-Perez J.L., Moran J.V., Greene W.C. Reprogramming somatic cells into iPS cell activates LINE-1 retroelement mobility. Hum. Mol. Genet. 2012;21(1):208-218.

Xu C., Tian J., Mo B. siRNA-mediated DNA methylation and H3K9 dimethylation in plants. Protein Cell. 2013;4(9):656-663.

Yuan Z., Sun X., Liu H., Xie J. MicroRNA genes derived from repetitive elements and expanded by segmental duplication events in mammalian genomes. PLoS One. 2011;6(3):e17666.

Zakrzewski F., Schmidt M., Van Lijsebettens M., Schmidt T. DNA methylation of retrotransposons, DNA transposons and genes in sugar beet (Beta vulgaris L.). Plant J. 2017; DOI 10.1111/tpj.13526.

Zhang G., Esteve P., Chin H.G., Terragni J., Dai N., Correa Jr. I.R., Pradhan S. Small RNA-mediated DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 inhibition leads to aberrant DNA methylation. Nucleic Acids Res. 2015;43(12):6112-6124.

Zhang H., Tao Z., Hong H., Chen Z., Wu C., Li X., Xiao J., Wang S. Transposon-derived small RNA is responsible for modified function of WRKY45 locus. Nat. Plants. 2016;2:16016-16023.

Zhou H., Kishima Y. Alternative plant host defense against transposon activities occurs at the post-translational stage. Plant Signal. Behav. 2017;e1318238. DOI 10.1080/15592324.2017.

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 Scopus, Zoological Record (Web of Science), Ebsco, DOAJ, Urlich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.
Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.
Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.
Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.
Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.
Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 19.10.2017. Выход в свет 31.10.2017. Формат 60 × 84 $^1/_8$. Усл. печ. л. 17,44.
Уч.-изд. л. 18,5. Тираж 200 экз. Заказ № 235. Цена свободная.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.