

Научный рецензируемый журнал

# ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

## Учредители

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

## Главный редактор

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

## Заместители главного редактора

*Н.А. Колчанов* – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

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

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

## Ответственный секретарь

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

## Редакционный совет

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

## Редакционная коллегия

*Т.Г. Амстиславская* – д-р биол. наук (Россия)  
*Е.Е. Андронов* – канд. биол. наук (Россия)  
*Ю.С. Аульченко* – д-р биол. наук (Россия)  
*Д.А. Афонников* – канд. биол. наук, доцент (Россия)  
*Е.В. Березиков* – канд. биол. наук, проф. (Нидерланды)  
*С.А. Боринская* – д-р биол. наук (Россия)  
*П.М. Бородин* – д-р биол. наук, проф. (Россия)  
*Т.А. Гавриленко* – д-р биол. наук (Россия)  
*В.Н. Даниленко* – д-р биол. наук, проф. (Россия)  
*С.А. Демаков* – д-р биол. наук (Россия)  
*Е.А. Долгих* – д-р биол. наук (Россия)  
*Ю.М. Константинов* – д-р биол. наук, проф. (Россия)  
*О. Кребс* – д-р биол. наук, проф. (Германия)  
*И.Н. Лаврик* – канд. хим. наук (Германия)  
*Д. Ларкин* – д-р биол. наук (Великобритания)  
*Л.А. Лутова* – д-р биол. наук, проф. (Россия)  
*В.Ю. Макеев* – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)  
*М.П. Мошкин* – д-р биол. наук, проф. (Россия)  
*Е. Песцова* – д-р биол. наук (Германия)  
*Н.А. Проворов* – д-р биол. наук, проф. (Россия)  
*Д.В. Пышный* – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)  
*А.В. Ратушный* – канд. биол. наук (США)  
*М.Г. Самсонова* – д-р биол. наук (Россия)  
*Е. Турусбеков* – канд. биол. наук (Казахстан)  
*М. Чен* – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)  
*Ю. Шавруков* – д-р биол. наук (Австралия)

Scientific Peer Reviewed Journal

# VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 8 times annually

## Founders

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

## Editor-in-Chief

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

## Deputy Editor-in-Chief

*N.A. Kolchanov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*I.N. Leonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*N.B. Rubtsov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

## Executive Secretary

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

## Editorial council

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

## Editorial board

*D.A. Afonnikov*, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia  
*T.G. Amstislavskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*E.E. Andronov*, Cand. Sci. (Biology), Russia  
*Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*E.V. Berezikov*, Professor, Cand. Sci. (Biology), Netherlands  
*S.A. Borinskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*P.M. Borodin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*M. Chen*, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China  
*V.N. Danilenko*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*S.A. Demakov*, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*E.A. Dolgikh*, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*T.A. Gavrilenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*Yu.M. Konstantinov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*O. Krebs*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany  
*D. Larkin*, Dr. Sci. (Biology), Great Britain  
*I.N. Lavrik*, Cand. Sci. (Chemistry), Germany  
*L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*V.Yu. Makeev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia  
*M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*E. Pestsova*, Dr. Sci. (Biology), Germany  
*N.A. Provorov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*D.V. Pyshnyi*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia  
*A.V. Ratushny*, Cand. Sci. (Biology), United States  
*M.G. Samsonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia  
*Y. Shavrukov*, Dr. Sci. (Biology), Australia  
*E. Turuspekov*, Cand. Sci. (Biology), Kazakhstan

7

ОТ РЕДАКТОРА

## Генофонд и селекция растений

8

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

IRAP-анализ для оценки генетической стабильности эндемичных и исчезающих видов флоры Западного Кавказа в коллекции *in vitro*

И.И. Супрун, В.И. Маляровская, И.В. Степанов, Л.С. Самарина

15

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Генотипическая изменчивость *Pinus sylvestris* L. по признаку засухоустойчивости

Е.Ю. Аминева, А.П. Гуреев, Т.М. Табацкая, О.С. Машкина, В.Н. Попов

24

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Проблемы сохранения *in vitro* гермоплазмы цитрусовых

В.М. Горшков, Л.С. Самарина, Р.В. Кулян, В.И. Маляровская, А.В. Рындин, Р.С. Рахмангулов, Ю.Л. Орлов (на англ. языке)

## Актуальные технологии генетики растений

29

ОБЗОР

Текущие достижения в области модификации генов культурных растений с использованием системы CRISPR/Cas

А.М. Короткова, С.В. Герасимова, Е.К. Хлесткина (на англ. языке)

38

ОБЗОР

Прогресс в секвенировании геномов растений – направления исследований

М.К. Брагина, Д.А. Афонников, Е.А. Салина

49

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Простой и эффективный метод экстракции полярных метаболитов из листьев гуара (*Suatopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) для GC-MS метаболомного анализа

С.Б. Теплякова, А.Л. Шаварда, Т.В. Шеленга, Е.А. Дзюбенко, Е.К. Потокина

## Генетика животных

55

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние мутации lethal yellow ( $A^Y$ ) и изменений фотопериода на поведение мыши

Е.Ю. Баженова, Д.В. Фурсенко, Н.В. Хоцкин, И.Е. Сорокин, А.В. Куликов (на англ. языке)

62

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Половые различия в экспрессии мышечных генов, вовлеченных в окисление липидов и захват глюкозы, у голодавших мышей

Н.А. Феофанова, Т.В. Яковлева, Е.Н. Макарова, Н.М. Бажан (на англ. языке)

## Медицинская генетика

67

ОБЗОР

Роль метилирования ДНК в нарушении костного метаболизма

Б.И. Ялаев, А.В. Тюрин, Р.Я. Мирзалиева, Р.И. Хусаинова

75

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Частота распределения генотипов полиморфизма *IL4* (rs 2243250) при псориазе и псориазическом артрите

А.А. Барило, М.В. Смольникова, С.В. Смирнова

81

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние облучения и наночастиц оксида марганца на гликолиз клеток глиомы человека U-87 MG

Н.Б. Илларионова, Д.В. Петровский, И.А. Разумов, Е.Л. Завьялов

## Клеточная биология

86

ОБЗОР

Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов

Т.И. Дьячук, О.В. Хомякова, В.Н. Акинина, И.А. Кибкало, А.В. Поминов

95

ОБЗОР

Реорганизация хроматина  
в процессе эритроидной  
дифференцировки

*А.А. Хабарова, А.С. Рыжкова, Н.Р. Баттулин*

## Биоинформатика и системная биология

100

ОБЗОР

Системный подход к моделированию  
развития листостебельных грибных  
инфекций пшеницы

*С.В. Николаев, У.С. Зубаирова, Е.С. Сколотнева,  
Е.А. Орлова, Д.А. Афонников*

110

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Статистическая и графическая  
(GGE biplot) оценка адаптивной  
способности и стабильности  
селекционных линий ячменя  
озимого

*В.Н. Гудзенко*

## Исправление

119

Исправление к статье «Влияние  
погодно-климатических условий  
на содержание белка и масла  
в семенах сои на Северном Кавказе»

*Л.Ю. Новикова, И.В. Сеферова, А.Ю. Некрасов,  
И.Н. Перчук, Т.В. Шеленга, М.Г. Самсонова,  
М.А. Вишнякова*

- 7 FROM THE EDITOR
- Plant gene pool and breeding**
- 8 ORIGINAL ARTICLE  
IRAP-analysis for evaluating the genetic stability of endemic and endangered species of the Western Caucasus flora in the collection *in vitro*  
*I.I. Suprun, V.I. Malyarovskaya, I.V. Stepanov, L.S. Samarina*
- 15 ORIGINAL ARTICLE  
Genotypic variability of *Pinus sylvestris* L. on the drought-resistance attribute  
*E.Yu. Amineva, A.P. Gureev, T.M. Tabatskaya, O.S. Mashkina, V.N. Popov*
- 24 ORIGINAL ARTICLE  
Challenges of *in vitro* conservation of *Citrus* germplasm resources  
*V.M. Gorshkov, L.S. Samarina, R.V. Kulyan, V.I. Malyarovskaya, A.V. Ryndin, R.S. Rakhmangulov, Y.L. Orlov*
- Mainstream technologies in plant genetics**
- 29 REVIEW  
Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system  
*A.M. Korotkova, S.V. Gerasimova, E.K. Khlestkina*
- 38 REVIEW  
Progress in plant genome sequencing: research directions  
*M.K. Bragina, D.A. Afonnikov, E.A. Salina*
- 49 ORIGINAL ARTICLE  
A simple and efficient method to extract polar metabolites from guar leaves (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) for GC-MS metabolome analysis  
*S.B. Teplyakova, A.L. Shavarda, T.V. Shelenga, E.A. Dzyubenko, E.K. Potokina*

## Animal genetics

- 55 ORIGINAL ARTICLE  
Effect of lethal yellow ( $A^Y$ ) mutation and photoperiod alterations on mouse behavior  
*E.Y. Bazhenova, D.V. Fursenko, N.V. Khotskin, I.E. Sorokin, A.V. Kulikov*
- 62 ORIGINAL ARTICLE  
Sex differences in the expression of lipid oxidation and glucose uptake genes in muscles of fasted mice  
*N.A. Feofanova, T.V. Yakovleva, E.N. Makarova, N.M. Bazhan*

## Medical genetics

- 67 REVIEW  
The role of DNA methylation in the disorders of bone metabolism  
*B.I. Yalaev, A.V. Tyurin, R.Y. Mirgalieva, R.I. Khusainova*
- 75 ORIGINAL ARTICLE  
The frequency of distribution of the genotypes of the *IL4* polymorphism (rs 2243250) in psoriasis and psoriatic arthritis  
*A.A. Barilo, M.V. Smolnikova, S.V. Smirnova*
- 81 ORIGINAL ARTICLE  
Effects of radiation and manganese oxide nanoparticles on human glioblastoma cell line U-87 MG glycolysis  
*N.B. Illarionova, D.V. Petrovski, I.A. Razumov, E.L. Zavyalov*

## Cell biology

- 86 REVIEW  
Microspore embryogenesis *in vitro*: the role of stresses  
*T.I. Djatchouk, O.V. Khomyakova, V.N. Akinina, I.A. Kibkalo, A.V. Pominov*

95

REVIEW

**Reorganisation of chromatin during erythroid differentiation**

*A.A. Khabarova, A.S. Ryzhkova, N.R. Battulin*

**Bioinformatics and systems biology**

100

REVIEW

**A system approach to the modeling of fungal infections of the wheat leaf**

*S.V. Nikolaev, U.S. Zubairova, E.S. Skolotneva, E.A. Orlova, D.A. Afonnikov*

110

ORIGINAL ARTICLE

**Statistical and graphical (GGE biplot) evaluation of the adaptive ability and stability of winter barley breeding lines**

*V.N. Gudzenko*

**Erratum**

119

**Erratum to: “Impact of weather and climate on seed protein and oil content of soybean in the North Caucasus”**

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

Уважаемые коллеги, дорогие читатели! Предлагаем Вашему вниманию первый в этом году выпуск «Вавиловского журнала генетики и селекции». В него вошли шесть разделов, содержащих оригинальные исследования и обзорные статьи в области генетики растений и животных, медицинской генетики, клеточной биологии и биоинформатики.

В экспериментальных статьях рубрики «Генофонд и селекция растений» представлены результаты изучения генетического разнообразия растительного мира нашей страны. Отличительной особенностью работ является то, что они выполнены с привлечением арсенала современных биотехнологических подходов и молекулярно-цитологических методов анализа растительного генома.

Рубрика «Актуальные технологии генетики растений» включает два обзора и одно экспериментальное исследование. В статье А.М. Коротковой с соавторами обсуждаются последние достижения в области геномного редактирования генома сельскохозяйственных видов растений с использованием системы CRISPR/Cas. Обзор М.К. Брагиной с соавторами посвящен современным методам и подходам, используемым для секвенирования геномов как модельных видов растений, так и сельскохозяйственных культур. В оригинальном исследовании данной рубрики на примере зернобобовой культуры гуара описываются разработка и применение метаболомного анализа в качестве методического подхода для решения научных задач и в прикладных селекционных исследованиях.

Раздел «Генетика животных» состоит из двух экспериментальных статей. В первой работе с использованием мо-

дели мыши представлены результаты влияния мутации lethal yellow ( $A^Y$ ) на тревожность и другие расстройства депрессивного характера, во второй проведено изучение половых особенностей экспрессии генов метаболизма глюкозы и жиров в скелетных мышцах в ответ на голод.

Обзорная статья и два оригинальных исследования вошли в рубрику «Медицинская генетика». В обзорной статье Б.И. Ялаева с соавторами обобщены и систематизированы данные о роли эпигенетических механизмов, таких как ДНК-метилирование, в костном метаболизме в норме и патологии при формировании остеопороза. В одной из оригинальных работ приведены результаты изучения полиморфных участков генов цитокинов для поиска генов-кандидатов развития и клинического течения псориазиса и псориатического артрита.

Раздел «Клеточная биология» включает две обзорные статьи. Обзор литературных данных посвящен влиянию различных стрессовых факторов в индукции микроспорового эмбриогенеза у растений. Рассматриваются механизмы влияния стрессов на клеточном и молекулярном уровне и способы повышения потенциала микроспорового эмбриогенеза для получения двойных гаплоидов сельскохозяйственных видов растений. В другой статье на примере реорганизации хроматина в процессе эритроидной дифференцировки обсуждаются вопросы организации и регуляции генома в пространстве, включая взаимодействие регуляторных элементов на различных уровнях упаковки хроматина.

В заключительном разделе «Биоинформатика и системная биология» представлены обзорная статья, в которой описаны математические модели развития грибных инфекций на примере болезней ржавчины у пшеницы, и оригинальное исследование, рассматривающее вопросы повышения экологической адаптивности сортов ячменя. Для оценки экологической пластичности и адаптивности предложено использовать модель GGE biplot, позволяющую визуализировать распределение генотипов и сред испытаний в пространстве главных компонент. Сочетание статистических параметров и визуализация методом GGE biplot способствуют максимальной информативности для оценки и выявления ценных генотипов среди селекционных линий.

*Академик В.К. Шумный*

## IRAP-анализ для оценки генетической стабильности эндемичных и исчезающих видов флоры Западного Кавказа в коллекции *in vitro*

И.И. Супрун<sup>1</sup>, В.И. Маляровская<sup>2</sup>, И.В. Степанов<sup>1</sup>, Л.С. Самарина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур, Сочи, Россия

<sup>2</sup> Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства и виноделия, Краснодар, Россия

e-mail: supruni@mail.ru; malyarovskaya@yandex.ru

Характеристика генетического разнообразия является одной из главных составляющих создания коллекций геноресурсов. Молекулярные маркеры – наиболее эффективный инструмент характеристики и оценки генетического разнообразия. IRAP (inter-retrotransposons amplified polymorphism) маркеры рекомендовали себя как одни из наиболее эффективных для характеристики и оценки геноресурсных коллекций растений, подтверждения генетической стабильности сохраняемых *in vitro* сортов и видов. В связи с этим целью настоящей работы – подобрать IRAP ДНК-праймеры для оценки генетической стабильности трех редких и исчезающих видов растений Западного Кавказа, сохраняемых в коллекции *in vitro*. Выполнена апробация 16 IRAP-праймеров на исследуемых видах: синеголовник приморский (*Eryngium maritimum* L.), подснежник Воронова (*Galanthus woronowii* Losinsk.) и колокольчик твердолистный (*Campanula sclerophylla* Kolak). Результаты апробации маркеров позволили выявить наиболее перспективные для использования в анализе генетической стабильности растения-регенеранты. У синеголовника приморского по 8 из 16 использованных в работе IRAP-праймеров были получены ПЦР-продукты. В ходе апробации на образцах подснежника Воронова фрагменты амплификации были обнаружены у 8 из 16 IRAP-праймеров, при этом число фрагментов варьировало от 2 до 12. У колокольчика твердолистного в выборке из 16 апробированных IRAP-праймеров у 9 была установлена амплификация. Количество фрагментов у образцов, в зависимости от маркера, варьировало от 1 до 11. Результаты генотипирования регенерантов сопоставлялись с данными по маточным растениям, экспланты которых были введены в стерильную культуру и размножены *in vitro*. Всего в работе было задействовано по 60 регенерантов для каждого из видов природной флоры Западного Кавказа. Полученные в ходе генотипирования сведения позволяют предположить отсутствие генетических изменений в процессе консервации *in vitro* у всех изученных видов. Расширенная выборка регенерантов для каждого вида была проанализирована для определения генетической стабильности с использованием ранее апробированных ISSR-маркеров. Эти результаты свидетельствуют о низкой вероятности возникновения генетических изменений в процессе размножения и сохранения *in vitro* трех исследуемых видов.

Ключевые слова: *Eryngium*; *Galanthus*; *Campanula*; IRAP; сохранение геноресурсов; генетическое разнообразие.

**Для цитирования:** Супрун И.И., Маляровская В.И., Степанов И.В., Самарина Л.С. IRAP-анализ для оценки генетической стабильности эндемичных и исчезающих видов флоры Западного Кавказа в коллекции *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):8-14. DOI 10.18699/VJ19.455

## IRAP-analysis for evaluating the genetic stability of endemic and endangered species of the Western Caucasus flora in the collection *in vitro*

I.I. Suprun<sup>1</sup>, V.I. Malyarovskaya<sup>2</sup>, I.V. Stepanov<sup>1</sup>, L.S. Samarina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Sochi, Russia

<sup>2</sup> North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making, Krasnodar, Russia

e-mail: supruni@mail.ru; malyarovskaya@yandex.ru

The characterization of genetic diversity is one of the main components of the genetic resources collection and management. Molecular markers are the most effective tool for characterizing and assessing genetic diversity in plant collections. IRAP (inter-retrotransposons amplified polymorphism) markers have proven to be some of the most effective for characterizing and evaluating germplasm, confirming the genetic fidelity of *in vitro* preserved cultivars and species. In this regard, the aim of this work is to test several IRAP primers to identify genetic polymorphism and study the genetic fidelity of three rare and endemic flora species of the Western Caucasus during *in vitro* conservation. Approbation of 16 IRAP-primers on the investigated species was carried

out for *Eryngium maritimum* L., *Galanthus woronowii* Losinsk. and *Campanula sclerophylla* Kolak. The results made it possible to select the most efficient of them for genetic fidelity analysis of micropropagated plants. Out of 16 IRAP primers 8 amplified PCR products in *Eryngium maritimum*. In *Galanthus woronowii* as well 8 of 16 IRAP primers resulted in the amplification with the number of DNA fragments ranging from 2 to 12. In *Campanula sclerophylla* 9 of 16 IRAP primers amplified 1 to 11 fragments, depending on the marker. The results of the genotyping of regenerants were compared with data on stock *in situ* plants, which were the source of explants for *in vitro* conservation. In total, 60 regenerants for each species of the natural flora of the Western Caucasus were involved in the study. The results obtained demonstrated no genetic changes of the regenerants in all the studied species. These results were confirmed using ISSR analysis of an extended sample set of microplants for each species. The results obtained can serve as evidence of a low probability of genetic disorders during *in vitro* propagation and conservation of the species *Eryngium maritimum* L., *Galanthus woronowii* Losinsk. and *Campanula sclerophylla* Kolak.

Key words: *Eryngium*; *Galanthus*; *Campanula*; IRAP; germplasm conservation; biodiversity.

**For citation:** Suprun I.I., Malyarovskaya V.I., Stepanov I.V., Samarina L.S. IRAP-analysis for evaluating the genetic stability of endemic and endangered species of the Western Caucasus flora in the collection *in vitro*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):8-14. DOI 10.18699/VJ19.455 (in Russian)

## Введение

Характеристика растительных генетических ресурсов – важная задача сохранения биоразнообразия, позволяющая принимать технически обоснованные решения при выборе образцов для долгосрочных природоохранных мероприятий. Понимание генетического разнообразия видов, представленных в генофонде, важно для разработки надежных стратегий консервации и для эффективного использования генофонда в конкретных селекционных программах (Ferreira, 2006). Сохранение генетических ресурсов в природной агроэкосистеме, в которой они эволюционировали (*in situ*), в настоящее время рассматривается как дополнение к стратегиям, основанным на создании дублирующих генбанков (*ex situ*), с целью предотвращения генетической эрозии растительных ресурсов (Negri et al., 2000; Lucchin et al., 2003). *In vitro* депонирование гермоплазмы является частью консервации генетических ресурсов *ex situ* и, как известно, обладает рядом преимуществ. Однако при долговременном субкультивировании в течение нескольких лет необходимы проверка и подтверждение генетической стабильности эксплантов (Liu, Yang, 2012; Супрун и др., 2014а). Кроме того, для грамотного сохранения биоразнообразия эндемичных видов растений в *ex situ* коллекциях необходимы популяционные исследования внутривидового разнообразия с использованием молекулярно-генетических маркеров (Ferreira, 2006). Молекулярная характеристика – эффективный инструмент для определения разнообразия путем генотипирования отдельных геномов и гаплотипирования индивидуальных генов, выявления генетической стабильности в процессе консервации (Lanteri, Varcaccia, 2006). Известно несколько типов молекулярных маркеров, но наиболее информативными, полиморфными и воспроизводимыми из них признаны SSR и SNP (Börner et al., 2012). Кроме них, высоким полиморфизмом и надежностью для характеристики внутри- и межвидового биоразнообразия отличаются ISSR- и IRAP-маркеры.

IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) маркеры – сравнительно новый тип маркеров, разработанный на основе LTR-последовательностей ретротранспозов. Несмотря на то, что ретротранспозоны рассеяны по геному, они также могут встречаться кластеризованно. Этот

феномен кластеризации делает возможным использование IRAP-метода маркирования, который детектирует инсерционный полиморфизм путем амплификации участка ДНК между двумя ретротранспозонами (Kalendar et al., 2011). IRAP-праймеры успешно использовались для определения генетического разнообразия внутри видов *Vicia faba* (Tomás et al., 2016), *Monilophthora perniciososa* (Santana et al., 2012), межвидового разнообразия капусты (*Brassica* sp.) (Mahjoob et al., 2016), ячменя (*Hordeum* sp.) (Singh et al., 2017), для оценки генетической стабильности культивируемых *in vitro* растений полыни горькой (*Artemisia absinthium*) (Kour et al., 2014), альбиции ленкоранской (*Albizia julibrissin*) (Rahmani et al., 2015), а также для популяционных исследований геноресурсных коллекций (Боронникова, 2009; Боронникова, Календарь, 2010).

Сохранение эндемичных и исчезающих видов Западного Кавказа *ex situ* ведется на базе Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур (г. Сочи) с 2003 г. (Рындин и др., 2015). В течение последних пяти лет в коллекции *in vitro* сохраняются виды: синеголовник приморский (*Eryngium maritimum* L.), подснежник Воронова (*Galanthus woronowii* Losinsk.) и колокольчик твердолистный (*Campanula sclerophylla* Kolak) (Маляровская и др., 2013; Коломиец и др., 2014а, б; Kolomiets et al., 2016). Однако подбор молекулярных маркеров, эффективных для генотипирования этих видов, до сих пор не осуществлен. В недавнем времени авторами проведена работа по подбору ISSR-праймеров для указанных видов природной флоры (Супрун и др., 2014а, б, 2017). Цель настоящих исследований – подобрать информативные IRAP ДНК-праймеры для оценки генетической стабильности редких и исчезающих видов растений Западного Кавказа, сохраняемых в коллекции *in vitro*.

## Материалы и методы

Растительный материал для анализа – исчезающие эндемичные виды Западного Кавказа *Galanthus woronowii* Losinsk. (подснежник Воронова), *Campanula sclerophylla* Kolak (колокольчик твердолистный) и *Eryngium maritimum* L. (синеголовник приморский), занесенные в Красную книгу Российской Федерации и входящие в ка-

тегорию 2 – виды с неуклонно сокращающейся численностью, которые при продолжении воздействия стрессовых факторов могут в короткие сроки попасть в категорию находящихся под угрозой исчезновения. Для выделения ДНК использовали листья от растений из природной флоры и из коллекции *in vitro*, сохраняемые в течение пяти лет (10–13 субкультивирований) во Всероссийском научно-исследовательском институте цветоводства и субтропических культур.

IRAP ДНК-праймеры апробировали для видов *Eryngium maritimum* L. (с учетом ранее опубликованных результатов (Jawdat et al., 2010), а также для видов *Galanthus woronowii* Losinsk. и *Campanula sclerophylla* Kolak.

Выделение ДНК проводилось по стандартной ЦТАБ (цетилтриметиламмония бромид) методике (Murray, Thompson, 1980). Количество и фрагментацию ДНК проверяли электрофорезом в 1.5–2.5 % агарозном геле и буфере, приготовленном на основе 0.5 М Трис-борат-ЭДТА буфера с добавлением 7 мкл 1 % этидиум бромид, при напряженности поля 10 В/см и напряжении 150 В в течение 30 мин.

Структура 16 IRAP-праймеров, использованных в работе, представлена в Приложении 1<sup>1</sup>. ПЦР проводили согласно следующей программе: 3 мин предварительной денатурации при температуре 95 °С; последующие 35 циклов: денатурация 35 с при 95 °С, отжиг праймеров 1 мин при 55 °С, элонгация 1.5 мин при 72 °С и финальный цикл синтеза при температуре 72 °С в течение 5 мин. Концентрации реагентов в ПЦР смеси: 2.5 мкл 10-кратного буфера для Taq ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим», Россия), 0.5 или 2.5 мкл dNTP (2.5 мМ), 1 единица активности Taq ДНК-полимеразы, 2 мкл праймера (3.75 мМ) и 40–50 нг тотальной ДНК в общем объеме 25 мкл. Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 2 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Для генотипирования регенерантов IRAP-праймерами применяли электрофорез продуктов ПЦР в 3.5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

## Результаты

### Отбор IRAP-праймеров для проведения генотипирования синеголовника приморского (*Eryngium maritimum*).

Из использованных в работе 16 IRAP-праймеров у синеголовника приморского продукты амплификации получены для восьми маркеров. Для амплифицированных маркеров была характерна различная степень выраженности ПЦР-продуктов. Количество фрагментов варьировало от 12 (Cass2 и MET2R) до 1 (LTR3). Отсутствовала амплификация у маркеров IRAP-TDK1F; IRAP-TDK2R; IRAP-TDK12F; IRAP-TDK12R; IRAP-TDK13F; IRAP-TDK13R; LTR2BARE1; LTR15 (см. рисунок, а). По качеству и информативности ДНК-фингерпринтов для проведения генотипирования растений-регенерантов было отобрано четыре IRAP-праймера: IRAP-TDK1R, MET2F, MET2R и Cass2 (табл. 1).

### Отбор IRAP-праймеров для проведения генотипирования подснежника Воронова (*Galanthus woronowii*).

В ходе апробации на образцах подснежника Воронова для 8 из 16 IRAP-праймеров прошла амплификация. Количе-

**Table 1.** Efficiency of 16 IRAP primers for *Eryngium maritimum* genotyping

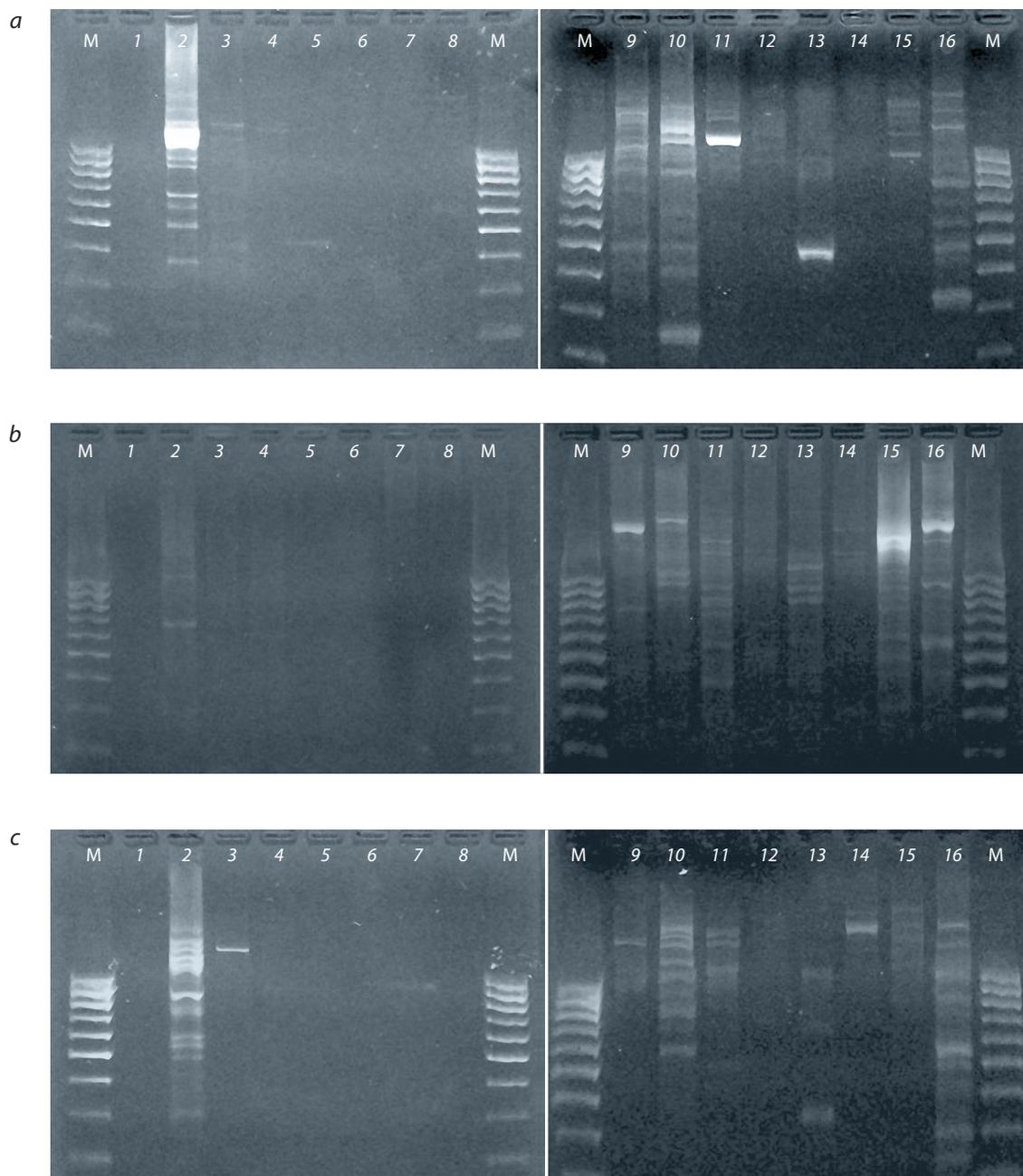
IRAP primer	Number of DNA fragments	Prioritization*
IRAP-TDK1F	–	IV
IRAP-TDK1R	11	I
IRAP-TDK2F	6	III
IRAP-TDK2R	–	IV
IRAP-TDK12F	–	IV
IRAP-TDK12R	–	IV
IRAP-TDK13F	–	IV
IRAP-TDK13R	–	IV
MET2F	10	I
MET2R	12	I
LTR1BARE1	6	III
LTR2BARE1	–	IV
LTR3	1	III
LTR15	–	IV
Cass1	6	II
Cass2	12	I

\* Here and in Tables 2, 3: I, top priority; II, medium priority; III, bottom priority; IV, use is futile.

**Table 2.** Efficiency of 16 IRAP primers for *Galanthus woronowii* genotyping

IRAP primer	Number of DNA fragments	Prioritization
IRAP-TDK1F	–	IV
IRAP-TDK1R	2	III
IRAP-TDK2F	–	IV
IRAP-TDK2R	–	IV
IRAP-TDK12F	–	IV
IRAP-TDK12R	–	IV
IRAP-TDK13F	–	IV
IRAP-TDK13R	–	IV
MET2F	4	II
MET2R	8	I
LTR1BARE1	8	I
LTR2BARE1	–	IV
LTR3	4	III
LTR15	2	III
Cass1	12	I
Cass2	8	I

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx1.pdf>



Electrophoregram of *Eryngium maritimum* (a), of *Galánthus wóronowii* (b) and *Campanula sclerophylla* (c) with 16 IRAP primers. 1, IRAP-TDK1F; 2, IRAP-TDK1R; 3, IRAP-TDK2F; 4, IRAP-TDK2R; 5, IRAP-TDK12F; 6, IRAP-TDK12R; 7, IRAP-TDK13F; 8, IRAP-TDK13R; 9, MET2F; 10, MET2R; 11, LTR1BARE1; 12, LTR2BARE1; 13, LTR3; 14, LTR15; 15, Cass1; 16, Cass2; M, DNA molecular weight ladder (100–3000 bp).

ство ДНК-фрагментов маркеров варьировало от 2 до 12. По качеству и информативности ДНК-фингерпринтов для проведения генотипирования растений-регенерантов было отобрано четыре IRAP-праймера: MET2R, LTR1BARE1, Cass1, Cass2 (см. рисунок, б; табл. 2).

**Отбор IRAP-праймеров для проведения генотипирования колокольчика твердолистного (*Campanula sclerophylla*).** В выборке из апробированных 16 IRAP-праймеров амплификация была установлена у 9 из них (см. рисунок, в; табл. 3). Количество фрагментов у образ-

цов, в зависимости от маркера, варьировало от 1 до 11. По качеству и информативности ДНК-фингерпринтов для проведения генотипирования растений-регенерантов было отобрано три IRAP-праймера: MET2R, IRAP-TDK1R, Cass2.

**Анализ генетической стабильности регенерантов трех видов *in vitro*.** Из апробированных 16 IRAP-праймеров для генотипирования регенерантов синеголовника приморского было отобрано 4, которые, по данным других исследователей, показывали высокий внутривидовой

**Table 3.** Efficiency of 16 IRAP markers  
for *Campanula sclerophylla* genotyping

IRAP primer	Number of DNA fragments	Prioritization
IRAP-TDK1F	–	IV
IRAP-TDK1R	11	I
IRAP-TDK2F	1	III
IRAP-TDK2R	–	IV
IRAP-TDK12F	–	IV
IRAP-TDK12R	–	IV
IRAP-TDK13F	–	IV
IRAP-TDK13R	–	IV
MET2F	1	III
MET2R	8	I
LTR1BARE1	4	II
LTR2BARE1	–	IV
LTR3	3	III
LTR15	2	III
Cass1	4	II
Cass2	10	I

полиморфизм – до 82 % (Jawdat et al., 2010; Yuying et al., 2011). В общей сложности было проанализировано 60 растений-регенерантов и маточное растение, из которого были получены регенеранты. У всех клонов ДНК-фингерпринты не отличались от маточного растения (Приложение 2).

Для генотипирования регенерантов колокольчика твердолистного было отобрано 4 из 16 IRAP-праймеров. Генотипирование 60 растений-регенерантов и исходного маточного растения не выявило различий между образцами.

Отсутствие различий у растений-регенерантов в сравнении с исходным маточным растением было подтверждено с помощью ISSR-маркеров X10 (для синеголовника приморского) и ASSR15 (для колокольчика твердолистного), в результате чего были получены идентичные ДНК-фингерпринты.

## Обсуждение

Для эффективного анализа результатов мультилокусного маркирования, в частности IRAP-маркеров, необходимо высокое качество получаемых ДНК-фингерпринтов. Особенно важное значение это приобретает при анализе идентичности исследуемых клонов, так как на результат могут повлиять любая неточность и недостоверная их интерпретация.

Ошибки в интерпретации могут быть вызваны неправильным определением количества ДНК-фрагментов на электрофореграмме, а также при некорректной оценке их размера в парах нуклеотидов. К причинам, способным вызвать подобные ошибки, можно отнести фоновое свечение

дорожки и интенсивность свечения ДНК-фрагмента. На основе изложенных выше критериев был проведен отбор IRAP-праймеров, апробированных на трех изучаемых видах растений. При этом для максимальной достоверности амплификацию по каждому из маркеров тестировали в трехкратной повторности. При проверке генетической стабильности регенерантов с использованием отобранных ДНК-маркеров амплификацию и электрофорез продуктов ПЦР по каждому из праймеров проводили дважды. В работе было задействовано 16 IRAP-последовательностей из различных публикаций по генотипированию цветковых растений (Jawdat et al., 2010; Yuying et al., 2011; Senková et al., 2013). Праймеры Cass1 и Cass2, используемые ранее в работе словацких исследователей (Senková et al., 2013) для дифференциации генотипов сливы (*Prunus domestica* L.), оказались эффективны в нашей работе для всех трех изучаемых видов флоры. При анализе сливы авторы получали 10–18 фрагментов ДНК, нами было получено 4–10, 6–12 и 8–12 фрагментов у трех видов. Из апробированных 16 IRAP-праймеров для генотипирования регенерантов синеголовника приморского и подснежника Воронова было отобрано по 4, которые, по данным других исследователей, показывали высокий внутривидовой полиморфизм – до 82 % (Jawdat et al., 2010; Yuying et al., 2011), а для колокольчика твердолистного – 3 праймера. В сравнении с результатами зарубежных коллег, которые применяли IRAP-анализ для популяционных исследований рода *Eryngium* с праймерами серии IRAP-TDK (Jawdat et al., 2010), в нашей работе у вида *E. maritimum* количество амплифицированных этими праймерами фрагментов получено в два-три раза меньше. Молекулярные данные этих авторов показали, что синеголовник приморский, произрастающий в прибрежных засоленных грунтах, генетически дистантен от других видов синеголовника, произрастающих в горных местностях, это может объяснять различие эффективности указанных праймеров. В целом следует отметить небольшое количество фрагментов амплификации отобранными IRAP-праймерами у трех изученных видов флоры Западного Кавказа в сравнении с данными других авторов (Боронникова, Календарь, 2010; Jawdat et al., 2010; Senková et al., 2013), которые получали в два-четыре раза большее количество ампликонов в результате IRAP-анализа.

## Заключение

В настоящей работе проведена апробация 16 IRAP-праймеров на генотипах трех видов флоры Западного Кавказа. Для каждого вида был установлен свой набор маркеров, дающих качественные ДНК-фингерпринты и выявляющих внутривидовой полиморфизм, что позволяет использовать их для поиска генетических отклонений при микроразмножении и консервации изучаемых видов. Для каждого вида было отобрано три-четыре наиболее информативных маркера для проведения генотипирования выборки регенерантов и маточных растений. По всем исследованным видам ДНК-фингерпринты были идентичны у регенерантов и исходных маточных растений, из тканей которых они были размножены. Исходя из полученных результатов работы, можно заключить, что использованные в работе IRAP-праймеры дают стабильные и достоверные

данные, свидетельствующие о генетической идентичности регенерантов с маточным растением. Однако для более полной оценки генетической стабильности регенерантов в процессе микроклонального размножения необходимо проведение REMAP-анализа, сочетающего ISSR- и IRAP-полиморфизм.

## Список литературы / References

- Боронникова С.В. Генетическая паспортизация популяций редких видов растений рода *Adonis* с использованием ISSR- и IRAP-маркеров. Изв. ТСХА. 2009;1:82-88.  
[Boronnikova S.V., Genetic certification of populations of rare plant species of the genus *Adonis* using ISSR and IRAP markers. Izvestiya Timiryazevskoy Selskokozyaystvennoy Akademii = Bulletin of the Timiryazev Agricultural Academy. 2009;1:82-88. (in Russian)]
- Боронникова С.В., Календарь Р.Н. Использование IRAP-метода для анализа генетической изменчивости популяций ресурсных и редких видов растений. Генетика. 2010;46(1):44-50.  
[Boronnikova S.V., Calendar R.N. Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants. Russ. J. Genet. 2010;46(1):36-42.]
- Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Гвасалия М.В., Самарина Л.С., Соколов Р.Н. Микроразмножение *in vitro* субтропических, декоративных культур и эндемиков Западного Кавказа: оригинальные и оптимизированные протоколы. С.-х. биология. 2014;3:49-58.  
[Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Gvasaliya M.V., Samarina L.S., Sokolov R.N. *In vitro* propagation of subtropical and ornamental plants and endemic species of Western Caucasus: developed and improved protocols. Selskokozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2014;3:49-58. (in Russian)]
- Коломиец Т.М., Соколов Р.Н., Маляровская В.И. Микроразмножение синеголовника приморского (*Eringium maritimum* L.) в культуре *in vitro*. Субтропическое и декоративное садоводство. 2014;50:196-204.  
[Kolomiets T.M., Sokolov R.N., Malyarovskaya V.I. Micropropagation of *Eringium maritimum* L. *in vitro*. Subtropicheskoye i Dekorativnoye Sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture. 2014;50:196-204. (in Russian)]
- Маляровская В.И., Коломиец Т.М., Соколов Р.Н., Самарина Л.С. Влияние спектрального состава света на рост и развитие *Lilium caasicum* в условиях культуры *in vitro*. Науч. журн. КубГАУ (Электронный ресурс). 2013;10(094). <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/12.pdf>.  
[Malyarovskaya V.I., Kolomiets T.M., Sokolov R.N., Samarina L.S. Effect of the light spectral distribution on the growth and development of *Lilium caasicum* *in vitro*. Nauchnyy Zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU (Electronic resource). 2013;10(094). Available at <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/12.pdf>. (in Russian)]
- Рындин А.В., Белоус О.Г., Питула З.В., Маляровская В.И. Лаборатория биотехнологии, физиологии и биохимии растений Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур: вчера, сегодня, завтра. Субтропическое и декоративное садоводство. 2015;54:9-21.  
[Ryndin A.V., Belous O.G., Pritula Z.V., Malyarovskaya V.I. The Laboratory of Biotechnology, Plant Physiology and Biochemistry, Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops: yesterday, today, tomorrow. Subtropicheskoye i Dekorativnoye Sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture. 2015;54:9-21. (in Russian)]
- Супрун И.И., Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Соколов Р.Н., Самарина Л.С., Слепченко Н.А. Апробация ISSR ДНК-маркеров для генотипирования редких видов растений Западного Кавказа: *Lilium caasicum* Misch. ex Grossh., *Galanthus woronowii* Kolak., *Pancreatum maritimum* L. Науч. журн. КубГАУ. (Электронный ресурс). 2014a;103(09):<http://ej.kubagro.ru/2014/09/pdf/37.pdf>.  
[Suprun I.I., Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Sokolov R.N., Samarina L.S., Slepchenko N.A. Test of ISSR markers for genotyping of rare plant species of Western Caucasus: *Lilium caasicum* Misch. ex Grossh., *Galanthus woronowii* Kolak., *Pancreatum maritimum* L. Nauchnyy Zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU (Electronic resource). 2014a;103(09). Available at <http://ej.kubagro.ru/2014/09/pdf/37.pdf>. (in Russian)]
- Супрун И.И., Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Соколов Р.Н., Самарина Л.С. Поиск оптимальных ISSR маркеров для проведения генотипирования панкрата морского. Плодоводство и виноградарство Юга России (Электронный ресурс). 2014b;30(06):<http://journal.kubansad.ru/pdf/14/06/02.pdf>.  
[Suprun I.I., Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Sokolov R.N., Samarina L.S. The search of optimal ISSR markers for sea daffodil genotyping. Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Farming and Viticulture in Southern Russia (Electronic resource). 2014b;30(06). Available at <http://journal.kubansad.ru/pdf/14/06/02.pdf>. (in Russian)]
- Супрун И.И., Маляровская В.И., Степанов И.В., Коломиец Т.М., Самарина Л.С., Слепченко Н.А. Апробация ISSR ДНК-маркеров для генотипирования вида *Galanthus woronowii* Losinsk. и анализ генетической стабильности растений, полученных в культуре *in vitro*. Науч. журн. КубГАУ (Электронный ресурс). 2017;133(09):<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-133-088>.  
[Suprun I.I., Malyarovskaya V.I., Stepanov I.V., Kolomiets T.M., Samarina L.S., Slepchenko N.A. Test of ISSR markers for genotyping *Galanthus woronowii* Losinsk. and analysis of the genetic stability of plants obtained *in vitro*. Nauchnyy Zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU (Electronic resource). 2017;133(09). Available at <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-133-088>. (in Russian)]
- Börner A., Khlestkina E.K., Chebotar S., Nagel M., Arif M.A., Neumann K., Kobiljski B., Lohwasser U., Röder M.S. Molecular markers in management of *ex situ* PGR – A case study. J. Biosci. 2012;37(5):871-877.
- Ferreira M.E. Molecular analysis of gene banks for sustainable conservation and increased use of crop genetic resources. Eds. J. Ruane, A. Sonnino. The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources. Rome: FAO, 2006;121-127. <http://www.fao.org/biotech/docs/ferreira.pdf>.
- Jawdat D., Al-Faoury H., Ayyoubi Z., Al-Safadi B. Molecular and ecological study of *Eryngium* species in Syria. Biologia. 2010;65(5):796-804. DOI 10.2478/s11756-010-0086-7.
- Kalendar R., Flavell A.J., Ellis T.H.N., Sjakste T., Moisy C., Schulman A.H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. Heredity. 2011;106(4):520-530. DOI 10.1038/hdy.2010.93.
- Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Samarina L.S. *In vitro* conservation of *Campanula sclerophylla* Kolak – endemic endangered species of Western Caucasus. Plant Tissue Cult. & Biotech. 2016;26(2):143-149.
- Kour B., Kour G., Kaul S., Dhar M.K. *In vitro* mass multiplication and assessment of genetic stability of *in vitro* raised *Artemisia absinthium* L. plants using ISSR and SSAP molecular markers. Adv. Bot. 2014;13(8):1-7. DOI 10.1155/2014/727020.
- Lanteri S., Barcaccia G. Molecular markers based analysis for crop germplasm preservation. Eds. J. Ruane, A. Sonnino. The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources. Rome: FAO, 2006;55-66.
- Liu X., Yang G. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2012;48:72-179.
- Lucchin N., Barcaccia G., Parrini P. Characterization of a flint maize (*Zea mays* var. *indurata*) Italian landrace: I. Morpho-phenological and agronomic traits. Gen. Res. Crop Evol. 2003;50(3):315-327.
- Mahjoob B., Zarini H.N., Hashemi S.H., Shamasbi V. Comparison of ISSR, IRAP and REMAP markers for assessing genetic diversity in different species of *Brassica* sp. Russ. J. Genet. 2016;52:1272. DOI 10.1134/S1022795416120073.

- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(19):4321-4325.
- Negri V., Tosti N., Falcinelli M., Veronesi F. Characterization of thirteen cowpea landraces from Umbria (Italy). Strategy for their conservation and promotion. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2000;47:141-146.
- Rahmani M.-S., Rahmani P.M., Pijut P.M., Pijut N., Shabani N., Shabani M.N. Genetic fidelity assessment of *in vitro*-regenerated plants of *Albizia julibrissin* using SCoT and IRAP fingerprinting. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2015;51(4):407-419. DOI 10.1007/s11627-015-9692-y.
- Santana M.F., de Araújo E.F., de Souza J.T., Mizubuti E.S.G., de Queiroz M.V. Development of molecular markers based on retrotransposons for the analysis of genetic variability in *Monilophthora perniciosa*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 2012;134:497-507. DOI 10.1007/s10658-012-0031-4.
- Senková S., Žiarovská J., Bežo M., Štefúnová V., Ražná K. Utilization of IRAP technique for plums genotypes differentiation. *Biosci. Res.* 2013;10(1):1-7.
- Singh S., Nandhaa P.S., Singh J.S. Transposon-based genetic diversity assessment in wild and cultivated barley. *Crop J.* 2017;5(4):296-304. DOI 10.1016/j.cj.2017.01.003.
- Tomás D., Dias A.L., Silva M., Oliveira H.R., Suso M.J., Viegas W., Veloso M.M. Genetic diversity assessment of Portuguese cultivated *Vicia faba* L. through IRAP markers. *Diversity.* 2016;8(2):8. DOI 10.3390/d8020008.
- Yuying S., Xiajun D., Feia W., Binhua C., Zhihonga G., Zhena Z. Analysis of genetic diversity in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) based on REMAP and IRAP molecular markers. *Sci. Hortic.* 2011;132(5):50-58. DOI 10.1016/j.scienta.2011.10.005.

---

#### ORCID ID

V.I. Malyarovskaya [orcid.org/0000-0003-4213-8705](https://orcid.org/0000-0003-4213-8705)  
L.S. Samarina [orcid.org/0000-0002-0500-1198](https://orcid.org/0000-0002-0500-1198)

**Acknowledgements.** This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-44-230274; administration of the Krasnoyarsk Krai; and the Federal Agency for Scientific Organizations, research project 0683-2014-0007.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received April 12, 2018. Revised September 20, 2018. Accepted September 21, 2018.

## Генотипическая изменчивость *Pinus sylvestris* L. по признаку засухоустойчивости

Е.Ю. Аминова<sup>1</sup>✉, А.П. Гуреев<sup>2</sup>, Т.М. Табацкая<sup>1</sup>, О.С. Машкина<sup>1, 2</sup>, В.Н. Попов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж, Россия

<sup>2</sup> Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

✉ e-mail: elena.pardaeva@mail.ru

В связи с глобальным изменением климата в последние десятилетия отмечается учащение и усиление засух. Не все растительные организмы способны адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Поэтому вопрос отбора стрессоустойчивых (засухоустойчивых) генотипов, перспективных для проведения селекционных работ, стоит достаточно остро. Проблема касается и лесных древесных растений, в том числе сосны обыкновенной, являющейся одним из основных лесобразователей на территории Воронежской области. В настоящем исследовании приведены результаты анализа вегетативной и генеративной сферы отдельных деревьев сосны обыкновенной с помощью биотехнологического, молекулярно-генетического и цитогенетического методов. Возможность применения метода культуры ткани *in vitro* с целью тестирования исходных растений на стрессоустойчивость, в том числе и засухоустойчивость, объясняется взаимосвязью свойств клеток, тканей и целого растения. Показано, что у различающихся генотипов цитогенетические характеристики семенного потомства и показатели каллусогенных реакций не всегда совпадают: у одних энергетические ресурсы тратятся на защиту онтогенеза, у других – на поддержание репродуктивной функции. Выделены деревья, состояние генеративной сферы которых в засушливые годы находится на уровне оптимальных лет и реакция их каллусных культур остается неизменной даже в моделируемых условиях засухи. На основе полученных результатов для отбора засухоустойчивых генотипов сосны обыкновенной предлагаем использовать систему критериев, характеризующих как способность вегетативной сферы к выживанию в условиях засухи на основе метода культуры ткани *in vitro* (скорость формирования каллусной ткани, ее жизнеспособность, частота каллусогенезов), так и состояние генеративной сферы с помощью цитогенетического анализа семенного потомства (частота патологий митоза, доля клеток с микроядрами, митотическая активность). Целесообразность применения биотехнологического подхода была доказана с помощью анализа уровня экспрессии генов стрессовых белков: между уровнем экспрессии гена *AbaN* и показателем жизнеспособности каллусных культур установлена сильная корреляционная связь, в том числе и на питательной среде с дополнительным стрессовым агентом (NaCl). Деревья, которые по результатам анализа можно отнести к засухоустойчивым, следует рекомендовать для использования в работах по селекции.  
Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L.; засуха; засухоустойчивость; каллусы; экспрессия генов; жизнеспособность каллусных культур; митоз.

**Для цитирования:** Аминова Е.Ю., Гуреев А.П., Табацкая Т.М., Машкина О.С., Попов В.Н. Генотипическая изменчивость *Pinus sylvestris* L. по признаку засухоустойчивости. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019; 23(1):15-23. DOI 10.18699/VJ19.456

## Genotypic variability of *Pinus sylvestris* L. on the drought-resistance attribute

E.Yu. Amineva<sup>1</sup>✉, A.P. Gureev<sup>2</sup>, T.M. Tabatskaya<sup>1</sup>, O.S. Mashkina<sup>1, 2</sup>, V.N. Popov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Voronezh, Russia

<sup>2</sup> Voronezh State University, Voronezh, Russia

✉ e-mail: elena.pardaeva@mail.ru

There was an increase and intensification of droughts in connection with global climate change in recent decades. Not all plant organisms are able to adapt to changing environmental conditions. Therefore, the question of stress-resistant (drought-resistant) genotypes selection for breeding is quite urgent. This problem also concerns forest tree plants, including Scots pine, which is one of the main foresters in the Voronezh region. The results of vegetative and generative sphere analysis of individual Scotch pine trees with the help of biotechnology, molecular-genetic and cytogenetic method are given in this study. The possibility of applying the tissue culture method *in vitro* for testing initial plants for stress resistance, including drought resistance, is explained by the interconnection of cells, tissues and the whole plant properties. It is shown that the cytogenetic characteristics of the seed progeny and the indicators of callusogenic reactions do not always coincide in different genotypes: in some cases energy resources are spent on ontogeny protection, while, in other cases, to reproductive function maintain. There are trees, in which the state the generative sphere in arid years is at the level of optimal years, and their callus cultures reaction remains unchanged even under simulated conditions of drought. Based on the results obtained for the selection of Scots pine drought-resistant genotypes we suggest applying a system of criteria characterizing both the ability of the

vegetative sphere to survive in drought conditions on the basis of the tissue culture method *in vitro* (callus tissue formation speed, its viability, frequency of callusogenesis), and the state of the generative sphere with the help of cytogenetic analysis of seed progeny (frequency of mitosis pathologies, the proportion of cells with micronuclei, mitotic activity). The expediency of applying the biotechnological approach was proved by analysis of the gene expression level of stress proteins: the level of *AbaH* gene expression correlates greatly with the indicator of the viability of callus cultures, including ones on a nutrient medium with an additional stress agent (NaCl). Trees that can be assigned to drought-resistant ones, according to the results of the analysis, should be recommended for use in breeding.

**Key words:** *Pinus sylvestris* L.; drought; drought-resistance; callus; gene expression; viability of callus cultures; mitosis.

**For citation:** Amineva E.Yu., Gureev A.P., Tabatskaya T.M., Mashkina O.S., Popov V.N. Genotypic variability of *Pinus sylvestris* L. on the drought-resistance attribute. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):15-23. DOI 10.18699/VJ19.456 (in Russian)

## Введение

Засухой называют неблагоприятное сочетание метеорологических условий, характеризующихся длительным и значительным недостатком осадков, повышенной температурой и пониженной влажностью воздуха (Пахомова, 1999). На долю засух среди всех аномальных природно-климатических явлений приходится около 26 % случаев (Tugce, Yasemin, 2005). Засухоустойчивыми считают растения, способные переносить длительные засушливые периоды, водный дефицит, обезвоживание клеток, тканей, органов с наименьшим снижением вегетативной и генеративной продуктивности. В первую очередь, засухоустойчивость обусловлена генетическими особенностями организма и зависит от местообитания растения (Генкель, 1982).

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) относится к породам высокой хозяйственной ценности, обладает генетической гетерогенностью и экологической пластичностью, может произрастать в разнообразных природно-климатических условиях, на почвах, возникших из различных геологических пород, которые отличаются по химическому составу, увлажнению и плодородию (Правдин, 1964; Миркин и др., 2000; Кузнецова, 2010, 2012). На территории Воронежской области сосна – одна из основных лесообразующих пород (Чернодубов, Смогунова, 1998).

Несмотря на то, что *P. sylvestris* L. относят к засухоустойчивым породам, степень ее толерантности к этому стрессовому фактору ограничена. Она определяется нормой реакции вида, которая в каждом регионе имеет свои внутривидовые границы (Тимофеев-Ресовский и др., 1973). Свидетельством тому служит массовое усыхание сосен на территории Воронежской области весной 2011 г., наступившее после сильнейшей летней засухи 2010 г. (Кузнецова, 2012). Нужно отметить, что часть деревьев выжила. В связи с этим возникает вопрос об отборе засухоустойчивых генотипов сосны обыкновенной, перспективных в качестве источников семян для лесного хозяйства. Учитывая тот факт, что засухоустойчивыми считают не только выжившие в условиях засухи, но и способные к половой репродукции при дефиците влаги растительные организмы (Генкель, 1982; Tardieu, 2005), в своих исследованиях мы использовали биотехнологический, цитогенетический и молекулярно-генетический методы для оценки состояния вегетативной и генеративной сферы сосны обыкновенной.

Цель работы – выявить генотипическую изменчивость сосны обыкновенной по признаку засухоустойчивости на территории Воронежской области с использованием

различных подходов, рекомендовать критерии для отбора засухоустойчивых форм сосны.

## Материалы и методы

Исследования проводились на шести отдельных деревьях сосны обыкновенной (д. 1, 3, 6, 8, 9, 12) из сорта-популяции сосна Острогжская (Кузнецова, Машкина, 2017) возрастом 33–35 лет, II класса бонитета (Кузнецова, 2010, 2012).

Для получения первичных каллусных культур *in vitro* сосны обыкновенной в апреле-мае собирали ветви с молодыми зелеными побегами, сегменты которых служили эксплантами. Использовали питательную среду Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с половинным содержанием макроэлементов (1/2 MS), 3 % сахарозой, регуляторами роста: 6-бензиламинопурина (6-БАП – 0.5 мг/л), нафтилуксусная кислота (НУК – 2 мг/л), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д – 1 мг/л). Получение и выращивание каллусных культур осуществляли в условиях культуральной комнаты: 2000 люкс, 16-часовой фотопериод, температура 25–26 °С. Каждый отдельный опыт проводили в трехкратной повторности (не менее 10–20 асептических культур для каждого дерева). Первичную каллусную ткань изолировали и переносили на свежие питательные среды через 20–25 сут от начала культивирования. Каллусы анализировали по признакам: частота каллусогенеза (ЧК, %); отношение количества эксплантов со сформировавшимся каллусом относительно общего количества эксплантов; скорость формирования каллусной ткани (СК, сут) – время образования первых следов каллуса на экспланте; жизнеспособность (ЖК, сут) – скорость распространения мертвой каллусной ткани, окрашенной в темно-коричневый цвет.

Для усиления стрессовой нагрузки в питательную среду добавляли NaCl (1 %) (Аmineva и др., 2017), позволяющий моделировать не только солевой, но и осмотический стресс, схожий по механизму действия с засухой (Игнатова, 2011).

Тотальную РНК выделяли из 50 мг ткани первичного каллуса с использованием коммерческого набора ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep (Zymo Research, США), согласно прилагаемому протоколу. Реакцию обратной транскрипции проводили с применением обратной транскриптазы M-MuLV (Evrogen, Россия) (40 ед.). Анализировали экспрессию четырех генов первичных каллусных культур: *AbaH*, *LEA*, *ADC*, *GapC1*. Использовали следующие праймеры: *AbaH* (abscisic acid and water-stress induced

protein): F-5'-AGGACAACGTTAATTCTGGCTC-3', R-5'-AATCGGCCTTATAACCAGTGTGCG-3' (Voronova et al., 2011); *LEA* (late embryogenesis abundant protein): F-5'-TCCGCAGAGGTTACAGACATCG-3', R-5'-СТАТТТГСГСТСАГГАТТСГАА-3' (Voronova et al., 2011); *ADC* (arginine decarboxylase): F-5'-AGAAATTG GGGATGCTGGAT-3', R-5'-GCCATCACGATTGTATT CACC-3' (Vuosku et al., 2006). В качестве референсного гена рассматривали *GapC1* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase): F-5'-ACGGTTTTGGTCAATTG-3', R-5'-CCCACGAGCTCGATATCAT-3' (Voronova et al., 2011). К настоящему времени геном сосны обыкновенной полностью не изучен. Для исследования были взяты именно эти гены, так как известно, что в условиях стресса, в том числе и при засухе, отмечается изменение их активности (Vuosku et al., 2006; Voronova et al., 2011).

В ходе цитогенетических исследований анализировали семенное потомство сосны обыкновенной от свободного опыления. Семена заготавливали в годы, контрастные по погодным условиям: 2011, 2015 – благоприятные; 2010, 2012, 2014 – различающиеся по типам засух и степени их воздействия на генеративную сферу сосны обыкновенной. В 2010 г. на территории всего Центрально-Черноземного района (ЦЧР) наблюдались весенняя и летняя засухи (Шакина, 2011), сдвинувшие репродуктивные процессы сосны на более ранние сроки (Кузнецова, 2012). Засуха 2012 г. (весенняя) привела к опадению шишек второго года развития на всей территории Воронежской области. В 2014 г. наблюдалась поздняя осенняя засуха, в основном оказавшая воздействие на вегетативную сферу сосны (пожелтение и опад хвои), также способствовавшая раннему раскрытию шишек (Кузнецова, 2015).

Проростки длиной 0.5–1 см фиксировали в спиртовом-уксусной смеси (3:1) в утренние часы. Давленные микропрепараты изготавливали по методике Л.А. Топильской с коллегами (1975), в нашей модификации. Их анализ проводили на микроскопе Микмед-5 при увеличении  $40 \times 1.5 \times 10$ . Микрофотосъемку осуществляли с помощью цифровой камеры окуляра DCM500. Цитогенетический анализ семенного потомства проводился для каждого дерева отдельно. Просматривали не менее 10 корешков проростков с генотипа. Анализировали не менее 100 делящихся клеток корневой меристемы с каждого препарата по следующим параметрам: частота и спектр патологий митоза (ПМ, %), частота встречаемости клеток с микроядрами (%), митотическая активность (МА, %). Митотическую активность определяли в 9–10 ч утра (Буторина и др., 2002). Для средней полосы России в норме значение показателя МА колеблется от 6.0 до 8.7 % (Буторина и др., 2001).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica и Stadia. Для сравнения выборок по каллусогенной эффективности, экспрессии генов, а также по МА использовали *t*-критерий Стьюдента. Сравнение выборок по патологиям митоза осуществляли с помощью критерия Ван-дер-Вардена. Разницу между сравниваемыми показателями считали достоверной при  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ . Связь показателей каллусогенных реакций и уровня экспрессии генов определяли на основе коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Кор-

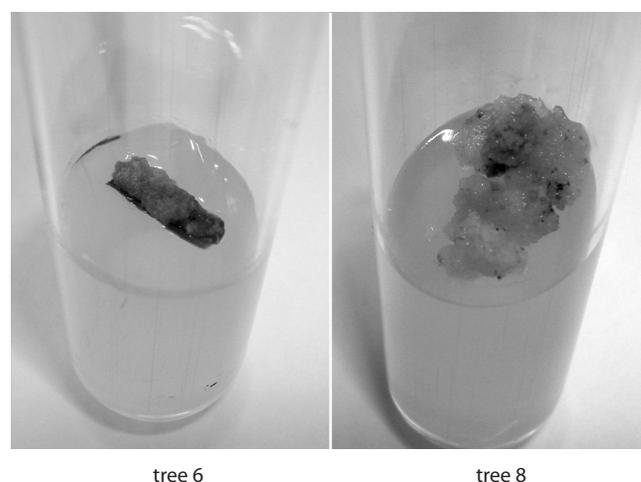
реляцию считали отличной от нуля при  $p < 0.05$ . Силу корреляционной связи выявляли по следующим интервалам значений коэффициента корреляции: от 0.6 до 1.0 – высокая, от 0.3 до 0.59 – средняя, от 0 до 0.29 – низкая.

## Результаты

В ходе анализа реакции каллусных культур на условия культивирования для эксплантов д. 5, 7, 8, 11, 14 формирование каллусной ткани отмечалось на 4–7-е сут, в то время как у д. 2, 6, 9, 10, 12 сроки смещены на 10–14-е сут (табл. 1). Разница по признаку СК проиллюстрирована на рис. 1: к 15-м сут культивирования на экспланте

**Table 1.** Assessment of callus formation in Scots pine stem tissue with regard to source tree genotypes

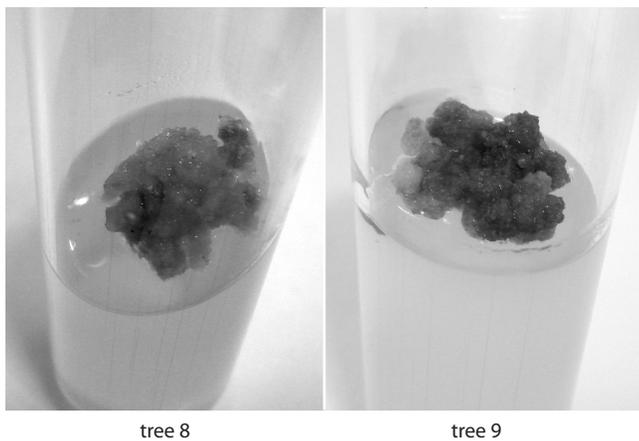
Tree No.	Time of callus formation, days	Callus formation frequency, %	Callus tissue life, days
1	9.7±0.8	40.0±4.5	12.0±0.6
2	10.3±0.6	58.3±2.9	12.3±0.7
3	8.7±0.3	66.5±2.9	15.7±0.3
4	9.3±0.5	78.3±2.3	11.7±1.5
5	6.7±0.6	80.0±5.0	17.0±0.9
6	13.3±0.6	33.3±2.8	11.0±1.0
7	7.0±0.8	50.0±4.2	10.9±0.9
8	4.7±0.4	91.8±3.1	23.3±1.5
9	11.7±0.3	68.9±6.9	11.5±0.3
10	10.3±1.2	33.3±5.6	10.7±0.4
11	5.2±0.9	81.2±6.8	19.8±0.6
12	8.6±0.6	86.3±4.5	16.7±0.3
13	13.6±1.3	41.6±3.2	9.4±0.7
14	5.1±0.4	64.2±3.4	8.8±0.5



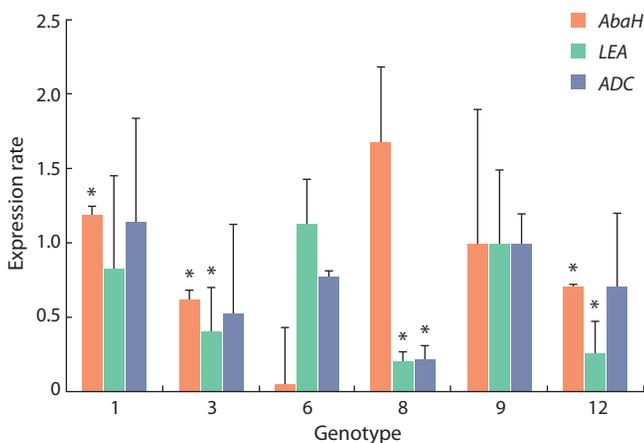
**Fig. 1.** Differences in the speed of *in vitro* callus tissue formation on explants of various Scots pine genotypes (day 15 of cultivation).

**Table 2.** Viability of callus cultures from various Scots pine genotypes under additional stress load (1 % NaCl)

Genotype	Control	1 % NaCl
1	11.7 ± 1.2	0
3	16.4 ± 2.3	15.9 ± 1.8
6	9.7 ± 1.1	0
8	22.5 ± 3.1	22.3 ± 2.2
9	10.7 ± 1.3	0
12	15.5 ± 2.1	14.9 ± 1.6



**Fig. 2.** Reaction of callus cultures of various Scots pine genotypes to salination of the nutrient medium with 1 % NaCl (day 10 of cultivation).



**Fig. 3.** Gene expression rates (*AbaH*, *LEA*, and *ADC*) in primary callus tissue samples of Scots pine genotypes.

Difference from tree 6 significant at \* $p < 0.05$ .

д. 6 отмечаются лишь следы каллусной ткани, в то время как на экспланте д. 8 каллусные клетки активно пролиферируют.

Достоверная разница ( $p < 0.05$ ) наблюдалась и по признаку ЧК (см. табл. 1). Так, д. 5, 8, 11, 12 имели самые

высокие значения ЧК, более 80 %:  $80.0 \pm 5.0$ ;  $91.8 \pm 3.1$ ;  $81.2 \pm 6.8$ ;  $86.3 \pm 4.5$  % соответственно. Для д. 1, 6, 10, 13 уровень ЧК не превышал значения 50 %:  $40.0 \pm 4.5$ ;  $33.3 \pm 2.8$ ;  $33.3 \pm 5.6$ ;  $41.6 \pm 3.2$  % соответственно.

Для д. 1, 3, 6, 8, 9, 12 проводили эксперименты в моделируемых условиях стресса, определяли уровень экспрессии генов стрессовых белков, а также анализировали состояние генеративной сферы в динамике лет (см. табл. 1).

На следующем этапе осуществлялись работы в моделируемых условиях засухи, которые обеспечивались за счет введения в питательную среду дополнительного стрессового агента – NaCl (1 %). Каллусные культуры трех деревьев (д. 3, 8, 12) не реагировали на добавление соли, их жизнеспособность оставалась на том же уровне, что и в контрольном варианте. Для каллусов д. 1, 6, 9 к 15-м сут культивирования отмечалась 100 % некротизация (табл. 2). На рис. 2 показана разница в реакции каллусных культур д. 8 и д. 9 по признаку жизнеспособности в ответ на засоление питательной среды: к 10-м сут культивирования каллус д. 8 остается жизнеспособным, каллусная ткань д. 9 характеризуется обширными очагами мертвой ткани.

Анализ активности генов показал: уровень экспрессии гена *AbaH* в каллусных культурах деревьев с низкими показателями каллусогенной активности был ниже по сравнению с остальными (рис. 3). Так, для д. 6 это значение составило 0.05, тогда как для д. 9 с высокой каллусогенной активностью – 1.0. Между уровнем экспрессии данного гена и показателем жизнеспособности каллусных культур установлена сильная корреляционная связь, в том числе и на питательной среде с NaCl ( $r_s = 0.75$  и  $0.65$  соответственно).

Экспрессия гена *LEA* повышена у каллусных культур д. 1, 6, 9:  $0.83 \pm 0.07$ ;  $1.13 \pm 0.06$ ;  $1.0 \pm 0.5$  соответственно. Снижение экспрессии гена *ADC* отмечается для культур д. 3 и 8:  $0.53 \pm 0.6$  и  $0.22 \pm 0.1$  соответственно.

Однако данные по уровню экспрессии этих двух генов не совпадают с общей тенденцией показателей каллусогенных реакций. Между уровнем экспрессии исследуемых генов выявили положительную сильную корреляцию между *LEA* и *ADC* ( $r_s = 0.7$ ). Между генами *AbaH* и *LEA*, а также *AbaH* и *ADC* слабая отрицательная корреляция ( $r_s = -0.1$  в обоих случаях).

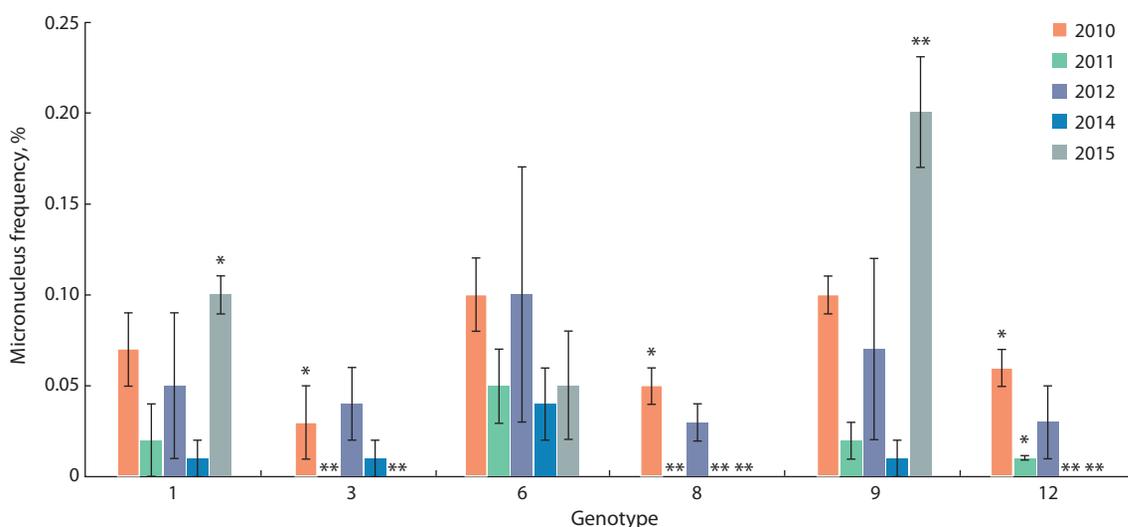
В ходе цитогенетического анализа семенного потомства сосны обыкновенной по частоте патологий митоза ни в один год исследования значительных превышений нормы не отмечено, только в 2012 г. для потомства д. 6 –  $5.1 \pm 2.3$  % (табл. 3).

Микроядра (рис. 4) в клетках могут приводить к цитогенетической нестабильности клеточных популяций (Ильинских и др., 1988; Буторина и др., 2005). Так, для д. 6, частота ПМ которого в 2012 г. составила  $5.1 \pm 2.3$  %, доля клеток с микроядрами в эти годы была  $0.1 \pm 0.07$  %. Однако для потомства деревьев, чьи показатели частоты ПМ были менее 3 % или превышали эту цифру незначительно, отмечался низкий уровень содержания микроядер: д. 3, 8, 12.

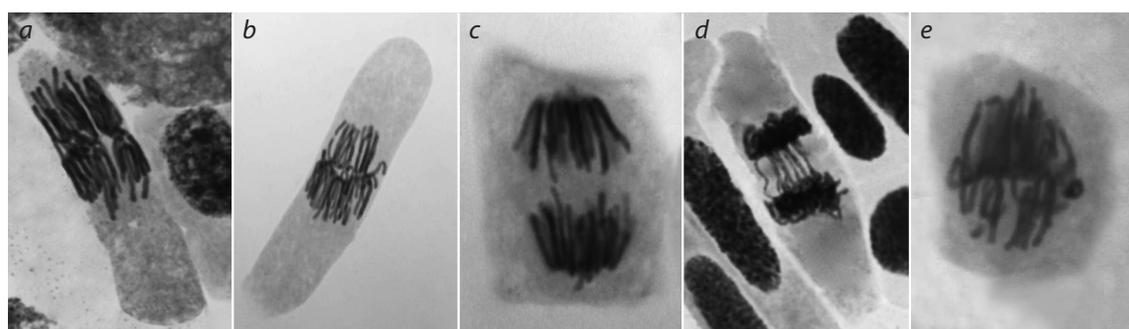
За все годы исследований было обнаружено 9 типов ПМ: 1 – отставание хромосом в метакинезе; 2 – обособление хромосом и групп хромосом в метафазе (рис. 5, а); 3 – фрагменты хромосом в метафазе и анафазе (см. рис. 5, б);

**Table 3.** Percentages of abnormal mitoses in the seed progeny of Ostrogozhskaya Scots pine population in years contrasting in weather conditions

Tree No.	2010, spring and summer droughts	2011, favorable	2012, spring drought	2014, autumn drought	2015, favorable
1	3.8 ± 0.3	1.5 ± 0.4	3.8 ± 0.3	2.5 ± 0.6	1.6 ± 0.6
3	2.6 ± 0.3	1.5 ± 0.3	2.3 ± 1.6	2.4 ± 0.4	1.2 ± 0.4
6	3.5 ± 0.4	2.5 ± 0.5	5.1 ± 2.3	3.3 ± 0.9	3.1 ± 1.1
8	2.7 ± 0.1	0.5 ± 0.3	2.5 ± 1.8	1.7 ± 0.6	1.4 ± 0.5
9	3.7 ± 0.2	1.9 ± 0.6	3.0 ± 1.3	2.1 ± 0.6	2.4 ± 0.8
12	2.2 ± 0.2	1.4 ± 0.9	3.2 ± 1.4	3.1 ± 0.8	1.5 ± 0.5



**Fig. 4.** Frequency of cells with micronuclei in Scots pine progeny in weather-contrasting years. Difference from tree 6 significant at \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ .

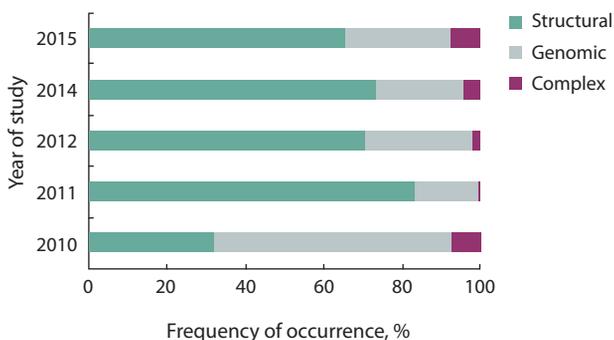


**Fig. 5.** Mitosis aberration types occurring in root meristem cells of Scots pine: *a*, separation of a chromosome group in metaphase; *b*, fragments of chromosomes in metaphase; *c*, *d*, bridges in anaphase (*c*, broken bridge) and telophase (*d*, multiple bridges); *e*, complex aberrations (chromosome fragment + ring chromosome).

4 – отставание в анафазе; 5 – забегание в анафазе и мета-анафазе; 6 – неравноценное расхождение хромосом в анафазе; 7 – мосты в анафазе и телофазе (см. рис. 5, *b* и 5, *z*); 8 – сложные нарушения (см. рис. 5, *d*); 9 – кольца в мета-, ана-, мета-анафазе.

Все типы нарушений митоза были условно разделены на группы: хромосомные (тип 3, 7, 9), геномные (тип 1, 2,

4, 5, 6), сложные (тип 8). Из диаграммы на рис. 6 следует, что после осенней засухи 2014 г. уровень хромосомных патологий постепенно снижается. Если в потомстве 2010 г. уровень структурных нарушений был самый низкий – 32.2 %, то в 2011 г. (оптимальный по погодным условиям) значение данного показателя возрастает до 83.4 %. В последующие годы также наблюдается преобладание



**Fig. 6.** Ranges of mitosis aberrations in Scots pine seed progeny in years contrasting in weather conditions.

хромосомных aberrаций: 2012 г. – 70.5 %, 2014 г. – 72.3 %. И лишь с 2015 г. отмечается снижение уровня данного показателя – 65.6 %.

В год аномальной летней засухи (2010) наблюдалось многократное превышение по показателю МА, причем для потомства некоторых деревьев более чем в два раза: д. 1, 6, 9 (табл. 4). В 2012 г., оказавшем сильнейшее воздействие на генеративную сферу сосны обыкновенной по всему ЦЧР, наблюдалось незначительное угнетение митотической активности для д. 6 ( $5.8 \pm 1.5$  %) и также превышение для д. 9 ( $9.0 \pm 1.5$  %). В целом в этот и последующие годы показатель МА был в норме (см. табл. 4).

## Обсуждение

Эффективность каллусогенеза, в первую очередь, зависит от генотипических особенностей исходных растений (Murashige, 1962; Лутова, 2010; Кунах, 2011). В связи с этим уже на протяжении многих лет ведутся исследования, свидетельствующие о целесообразности применения метода культуры ткани *in vitro* для изучения устойчивости растений к различным стрессовым факторам, в том числе и к засухе (Терлецкая и др., 2008; Россеев и др., 2010, 2016; Егорова, 2011).

Показано, что различия можно наблюдать уже на начальных этапах формирования каллусной ткани (Шестибратов и др., 2008; Соболева, 2013). Данный факт подтвержден и нами: сроки появления первых следов каллуса в зависимости от исходного генотипа разнятся от 4.7 (д. 8) до 13.6 (д. 13) сут. Установлено, что больший уровень ЧК характерен для каллусных культур, период формирования

каллусной ткани которых сдвинут на более ранние сроки, и наоборот – деревья, у которых процесс каллусогенеза шел позже, характеризовались низким уровнем ЧК. Между ЖК и другими показателями существует взаимосвязь: экспланты, на которых формирование каллуса происходит раньше, характеризуются и более высокими значениями по параметрам ЧК, ЖК и наоборот – экспланты, позже других формирующие каллусную ткань, имеют низкий уровень ЧК и ЖК, что было доказано с помощью корреляционного анализа полученных значений. Выявлена отрицательная корреляция средней силы между показателями СК и ЖК ( $r_s = -0.57$ ), сильная отрицательная связь – между СК и ЧК ( $r_s = -0.64$ ). Сильная положительная корреляция отмечалась между ЧК – ЖК ( $r_s = 0.79$ ).

Одним из индикаторов стрессового состояния растений является повышение уровня абсцизовой кислоты (АБК), которая, в свою очередь, изменяет экспрессию генетических программ в клетках (Яковец, 2009). Известно, что экспрессия гена *AbaH* в тканях сосны обыкновенной повышается в результате воздействия на организм обезвоживания либо высоких концентраций АБК (Voronova et al., 2011). Была установлена сильная корреляционная связь между уровнем экспрессии данного гена и показателем жизнеспособности каллусных культур ( $r_s = 0.75$  и  $r_s = 0.65$  в условиях дополнительной стрессовой нагрузки), что свидетельствует о целесообразности применения метода культуры ткани для индикации стрессоустойчивости деревьев сосны обыкновенной.

Белки-дегидрины семейства LEA при нормальном водоснабжении растений обычно синтезируются в зародышах на стадиях позднего эмбриогенеза. В листьях в нормальных условиях эти белки не обнаружены, их накопление индуцирует АБК, синтезирующаяся в ответ на воздействие засухи. Ген *ADC* отвечает за работу аргинин декарбоксилазы, определяющей процесс перехода аргинина в полиамины (Yang et al., 2010). Уровень экспрессии этих двух генов (*LEA* и *ADC*) не совпадает с общей тенденцией по показателям каллусогенных реакций исследуемых деревьев, причем между *AbaH* и *LEA*, а также *AbaH* и *ADC* отмечается слабая корреляция ( $r_s = -0.1$  в обоих случаях).

Частота ПМ достоверно отражает уровень повреждений ДНК и степень воздействия стрессового фактора на состояние генеративной сферы сосны (Пардаева и др., 2013). Рядом исследователей установлено, что в средней полосе

**Table 4.** Mitotic activity (%) in the seed progeny of Scots pine trees in years contrasting in weather conditions

Tree No.	2010, spring and summer droughts	2011, favorable	2012, spring drought	2014, autumn drought	2015, favorable
1	18.9±9.8	8.7±0.7	8.7±1.5	6.7±0.4	7.5±0.4
3	15.5±3.6	8.4±0.6	8.0±1.2	6.4±0.5	7.1±2.1
6	20.2±4.5	9.4±1.0	5.8±1.5	7.0±0.5	5.8±0.3
8	11.5±5.5	8.0±0.4	8.1±2.7	6.5±0.3	8.3±1.4
9	18.7±5.3	8.9±2.1	9.0±1.5	6.6±0.4	8.2±0.6
12	16.7±4.0	8.0±0.4	8.5±2.1	7.2±0.4	6.9±0.4

России для сосны обыкновенной уровень частоты ПМ в норме не должен превышать 5 % (Буторина и др., 2005). Ни в один год исследования превышений нормы не отмечено. Что касается частоты встречаемости клеток с микроядрами, то их повышенное содержание было характерно для потомства деревьев с наибольшим значением частоты ПМ: д. 1, 6, 9. Преобладание хромосомных нарушений в потомстве 2014 г. можно объяснить действием осенней засухи. С 2015 г. отмечается постепенное снижение уровня структурных aberrаций в потомстве исследуемых деревьев ввиду отсутствия засухи.

Митотическая активность обусловлена генетическими особенностями организма. Кроме того, на ее проявление могут оказывать значительное влияние и факторы внешней среды, причем не всегда происходит снижение уровня клеточного деления. В некоторых случаях наблюдается его активация (Митрофанов, 1969). Так, в год аномальной засухи (2010 г.) наблюдалось многократное превышение по данному показателю, причем для потомства некоторых деревьев более чем в два раза – 18.9±9.8 % (д. 1), 20.2±4.5 % (д. 6), 18.7±5.3 % (д. 9). В остальные годы исследования значительных нарушений отмечено не было.

Часто стресс приводит к перераспределению энергетических затрат между вегетативной и генеративной сферами растений (Spiess, 1989; Усманов и др., 2001), т.е. в первом случае большая часть ресурсов тратится на защиту онтогенеза, а во втором – на поддержание репродуктивной функции растения. Результаты проведенных исследований подтверждают этот факт.

Часть исследуемых деревьев имела высокие показатели, согласно результатам, полученным на основе использованных методов (д. 3, 8, 12). Так, например, семенное потомство д. 8 в год аномальной засухи (2010 г.) характеризуется низким уровнем частоты ПМ (2.7±0.1 %). Доля клеток с микроядрами также невысока – 0.05±0.01 %. Что касается каллусогенной способности эксплантов данного дерева и реакции каллусов на условия культивирования, то для него также отмечаются высокие показатели. Первые следы каллусной ткани стали появляться уже к 4–5-м сут культивирования, показатель частоты каллусогенеза составил 91.8±3.1 %. Жизнеспособность каллусов д. 8 была высокой не только на среде без усиленной стрессовой нагрузки (22.5±3.1 сут), но и в моделируемых условиях засухи на среде с добавлением NaCl (1 %) – 22.3±2.2 сут.

Для других деревьев (д. 1, 6) были характерны низкие показатели цитогенетических параметров и каллусогенных реакций. Так, для д. 6 в 2012 г. (весенняя засуха) отмечался высокий уровень ПМ, незначительно превышающий норму в 5 %, – 5.1±2.3 %, доля клеток с микроядрами была также завышенной: 0.1±0.07 %. Формирование каллуса пришлось на 13-е сут культивирования, частота каллусогенеза – 33.3±2.8 %, жизнеспособность культур – 11.0±1.0 сут, что в два раза меньше, чем у д. 8. В условиях моделируемой засухи, на питательной среде с добавлением NaCl (1 %), рост каллусной ткани д. 6 полностью прекратился, и к 10–15-м сут культивирования наблюдалась ее 100 % некротизация.

Присутствуют деревья и с высокими показателями каллусогенных реакций, но с повышенной частотой ПМ и клеток с микроядрами. Например, в семенном потомстве

д. 9 при частоте каллусогенеза 68.9±6.9 % отмечалась высокая частота встречаемости клеток с микроядрами (2010 г.) – 0.10±0.01 %.

## Заключение

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что отбор засухоустойчивых растений необходимо вести не только по показателям, характеризующим состояние вегетативной сферы в условиях засухи, но и учитывая состояние генеративной. С этой целью предлагаем применять систему критериев, характеризующих как способность самого дерева к выживанию в засушливых условиях на основе метода культуры ткани *in vitro* (скорость формирования и жизнеспособность каллусной ткани, частота каллусогенеза), так и состояние его репродуктивной системы с помощью цитогенетического анализа семенного потомства (частота патологий митоза, доля клеток с микроядрами, митотическая активность).

## Список литературы / References

- Аминаева Е.Ю., Табацкая Т.М., Машкина О.С., Попов В.Н. Оценка засухоустойчивости отдельных генотипов *Pinus sylvestris* L. на основе метода культуры ткани *in vitro* в моделируемых стрессовых условиях. Тр. Санкт-Петербургского НИИ лесного хозяйства. 2017;1:14-22.
- [Amineva E.Yu., Tabatskaya T.M., Mashkina O.S., Popov V.N. Assessment of drought resistance in individual genotypes of *Pinus sylvestris* L. by the *in vitro* tissue culture method under simulated stress conditions. Trudy Sankt-Peterburgskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Lesnogo Khozyaystva = Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute. 2017;1:14-22. DOI 10.21178/2079-6080.2017.1.14. (in Russian)]
- Буторина А.К., Вострикова Т.В., Бельчинская Л.И., Кондратьева Л.В. Влияние промышленных сточных вод на цитогенетические показатели березы повислой. Лесн. хоз-во. 2005;6:27-28.
- [Butorina A.K., Vostrikova T.V., Bel'chinskaya L.I., Kondrat'eva L.V. The influence of industrial wastewater on the cytogenetic parameters of white birch. Lesnoe Khozyaystvo = Forestry. 2005;6:27-28. (in Russian)]
- Буторина А.К., Калаев В.Н., Карпова С.С. Цитогенетические нарушения в соматических клетках человека и березы повислой в районах г. Воронежа с различной интенсивностью антропогенного загрязнения. Экология. 2002;6:438-441.
- [Butorina A.K., Kalaev V.N., Karpova S.S. Cytogenetic damage of human somatic cells and weeping birch cells in Voronezh districts with different levels of anthropogenic pollution. Russian Journal of Ecology. 2002;6:413-416.]
- Буторина А.К., Калаев В.Н., Миронов А.Н., Смородинова В.А., Мазурова И.Э., Дорошев С.А., Сенькевич Е.В. Цитогенетическая изменчивость в популяциях сосны обыкновенной. Экология. 2001;3:216-220.
- [Butorina A.K., Kalaev V.N., Mironov A.N., Smorodinova V.A., Mazurova I.E., Doroshev S.A., Sen'kevich E.V. Cytogenetic variation in populations of scots pine. Russian Journal of Ecology. 2001; 3:198-202.]
- Генкель П.А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. М., 1982.
- [Genkel' P.A. Physiology of Heat and Drought Tolerance in Plants. Moscow, 1982. (in Russian)]
- Егорова Н.А. Разработка методических основ клеточной селекции лаванды *in vitro* на устойчивость к NaCl. Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2011;5:173-179.
- [Egorova N.A. Methodological bases of the development of lavender cell selection *in vitro* for resistance to NaCl. Ekosistemy, ikh Optimizatsiya i Okhrana = Optimization and Protection of Ecosystems. 2011;5:173-179. (in Russian)]

- Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011.  
[Ignatova S.A. Cell Technologies in Plant Industry, Genetics, and Breeding of Cultivated Plants: Tasks, Opportunities, and Development of *in vitro* Systems. Odessa: Astroprint Publ., 2011. (in Russian)]
- Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Некрасов В.Н. Использование микроядерного теста в скрининге и мониторинге мутагенов. Цитология и генетика. 1988;22(1):67-72.  
[Il'inskikh N.N., Il'inskikh I.N., Nekrasov V.N. Use of the micronuclear test in the screening and monitoring of mutagens. Tsytologiya i Genetika = Cytology and Genetics. 1988;22(1):67-72. (in Russian)]
- Кузнецова Н.Ф. Чувствительность генеративной сферы сосны обыкновенной к засухе в Воронежской области. Лесоведение. 2010;6:58-65.  
[Kuznetsova N.F. The drought sensitivity of the Scots pine reproductive system in the Voronezh region. Lesovedenie = Forest Sciences. 2010;6:58-65. (in Russian)]
- Кузнецова Н.Ф. Особенности семеношения сосны обыкновенной на территории ЦПР в засуху 2010 г. Хвойные бореальной зоны. 2012;30(3-4):270-276.  
[Kuznetsova N.F. Features of Scotch pine seeding in the Central Black Earth region in the 2010 drought. Khvoynye Borealnoy Zony = Conifers of the Boreal Area. 2012;30(3-4):270-276. (in Russian)]
- Кузнецова Н.Ф. Развитие неспецифической и специфической реакций у *Pinus sylvestris* L. на популяционном уровне в стрессовом градиенте засушливых лет. Экология. 2015;5:332-338.  
[Kuznetsova N.F. Development of specific and nonspecific responses to stress in *Pinus sylvestris* L. at population level in a gradient of drought years. Russian Journal of Ecology. 2015;5:405-410.]
- Кузнецова Н.Ф., Машкина О.С. Патент на селекционное достижение «Сосна Острогжская». № 9187 от 21.07.2017. Заявка № 8355164 от 26.10.2016. Воронежская область, с. Солдатское, Острогжское лесничество.  
[Kuznetsova N.F., Mashkina O.S. Ostrogzhskaya Pine. Patent RF for Breeding Invention No. 9187 of 21.07.2017. (in Russian)]
- Кунах В.А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений. Молекулярная и прикладная генетика. 2011;12:7-14.  
[Kunakh V.A. Plasticity of the somatic cell genome and plant adaptability. Molekulyarnaya i Prikladnaya Genetika = Molecular and Applied Genetics. 2011;12:7-14. (in Russian)]
- Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. СПб., 2010.  
[Lutova L.A. Biotechnology of Higher Plants. St. Petersburg, 2010. (in Russian)]
- Миркин Б.М., Наумова Л.Г., Соломец А.И. Современная наука о растительности. М., 2000.  
[Mirkin B.M., Naumova L.G., Solomets A.I. Modern Plant Science. Moscow, 2000. (in Russian)]
- Митрофанов Ю.А. Радиочувствительность клеток на различных фазах митотического цикла. Успехи современной генетики. М.: Наука, 1969;125-160.  
[Mitrofanov Yu.A. Radiosensitivity of cells at various phases of the mitotic cycle. Advances in Current Genetics. Moscow: Nauka Publ., 1969;125-160. (in Russian)]
- Пардаева Е.Ю., Машкина О.С., Кузнецова Н.Ф. Состояние генеративной сферы сосны обыкновенной как биоиндикатора устойчивости лесов на территории Центрально-Черноземного района в связи с глобальным изменением климата. Тр. Санкт-Петербургского НИИ лесного хозяйства. 2013;2:16-17.  
[Pardaeva E.Yu., Mashkina O.S., Kuznetsova N.F. The state of Scots pine reproductive system as a bioindicator of forest stability in the Central Black Earth region in connection with the global climate change. Trudy Sankt-Peterburgskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Lesnogo Khozyaystva = Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute. 2013;2:16-17. (in Russian)]
- Пахомова В.М. Основы фитострессологии. Казань: Изд-во КГСХА, 1999.  
[Pakhomova V.M. Basics of Plant Stressology. Kazan, 1999. (in Russian)]
- Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция. М.: Наука, 1964.  
[Pravdin L.F. Scots Pine. Variability, Intraspecific Taxonomy, and Breeding. Moscow: Nauka Publ., 1964. (in Russian)]
- Россеёв В.М., Белан И.А., Россеёва Л.П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы и ячменя на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды. Докл. РАСХН. 2010;3:14-16.  
[Rosseyev V.M., Belan I.A., Rosseyeva L.P. *In vitro* test of spring soft wheat and barley for resistance to adverse abiotic environmental factors. Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2010;3:14-16. (in Russian)]
- Россеёв В.М., Белан И.А., Россеёва Л.П. Использование метода *in vitro* в селекции пшеницы мягкой яровой. Вестн. Алтайск. гос. аграр. ун-та. 2016;2(136):5-9.  
[Rosseyev V.M., Belan I.A., Rosseyeva L.P. The *in vitro* method in spring soft wheat breeding. Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University. 2016;2(136):5-9. (in Russian)]
- Соболева Г.В. Влияние осмотического стресса на процессы роста и морфогенеза в длительно пассируемых каллусных культурах гороха (*Pisum sativum* L.). Зернобобовые и крупяные культуры. 2013;1(5):8-15.  
[Soboleva G.V. Effect of osmotic stress on growth and morphogenesis processes in long-propagated pea (*Pisum sativum* L.) callus cultures. Zernobobovye i Krupyanye Kul'tury = Legumes and Groat Crops. 2013;1(5):8-15. (in Russian)]
- Терлецкая Н.В., Жумабаева Б.А., Хайленко Н.А. Действие солевого стресса на соматические клетки в суспензионной культуре пшеницы и ячменя. Вестн. КазНУ, Сер. Биологическая. 2008;36(1):63-66.  
[Terletckaya N.V., Zhumabaeva B.A., Hajlenko N.A. Effect of salinity stress on somatic cells in a wheat and barley suspension culture. Vestnik Kazahskogo Natsionalnogo Universiteta, Ser. Biologicheskaya = Bulletin of the Kazan National University (Ser. Biol.). 2008;36(1):63-66. (in Russian)]
- Тимофеев-Ресовский Н.В., Яблоков А.В., Глотов Н.В. Очерк учения о популяции. М., 1973.  
[Timofeev-Resovskiy N.V., Yablokov A.V., Glotov N.V. An Essay on Population. Moscow, 1973. (in Russian)]
- Топильская Л.А., Лучникова С.А., Чувашина Н.П. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины на ацетогематоксилиновых давленных препаратах. Бюл. ЦГЛ им. И.В. Мичурина. 1975;22:107.  
[Topil'skaya L.A., Luchnikova S.A., Chuvashina N.P. Study of somatic and meiotic currant chromosomes in aceto-hematoxylin squash slides. Byulleten Nauchnoy Informatsii Tsentral'noy Geneticheskoy Laboratorii imeni I.V. Michurina = Scientific Information Bulletin, Michurin Central Genetic Laboratory. 1975;22:107. (in Russian)]
- Усманов И.Ю., Рахмакулова З.Ф., Кулагин А.Ю. Экологическая физиология растений. М.: Логос, 2001.  
[Usmanov I.Yu., Rakhmakulova Z.F., Kulagin A.Yu. Ecological Plant Physiology. Moscow: Logos Publ., 2001. (in Russian)]
- Чернодубов А.И., Смогунова О.А. Сосна обыкновенная в различных экологических условиях юга России. Экология Центрального Черноземья Российской Федерации. Липецк, 1998;65-68.  
[Chernodubov A.I., Smogunova O.A. Scots Pine in Various Ecological Conditions of southern Russia. Ecology of the Central Black

- Earth Region, Russian Federation. Lipetsk, 1998;65-68. (in Russian)]
- Шакина Н.П., Иванова А.Р., Бирман Б.А., Скриптунова Е.Н. Блокирование: условия лета 2010 года в контексте современных знаний. Анализ условий аномальной погоды на территории России летом 2010 года. М.; Триада лтд, 2011;6-21.  
[Shakina N.P., Ivanova A.R., Birman B.A., Skriptunova E.N. Blocking: the conditions of the summer of 2010 in the context of modern knowledge. Analysis of abnormal weather conditions in Russia in the summer of 2010. Moscow: Triada ltd, 2011;6-21. (in Russian)]
- Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Мирошников А.И. Лесная биотехнология: методы, технологии, перспективы. Биотехнология. 2008;5:3-22.  
[Shestibratov K.A., Lebedev V.G., Miroshnikov A.I. Forest biotechnology: methods, technologies, and prospects. Biotekhnologiya = Biotechnology. 2008;5:3-22. (in Russian)]
- Яковец О.Г. Фитофизиология стресса. Курс лекций. Минск, 2009.  
[Yakovets O.G. Plant physiology of Stress. Lecture Course. Minsk, 2009. (in Russian)]
- Murashige T.A., Skoog T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473-497.
- Tardieu F. Plant tolerance to water deficit physical limits and possibilities for progress. *Comp. R. GeoSci.* 2005;337:57-67.
- Tugce K., Yasemin E. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *G.U. J. Science.* 2005;5(4):723-740.
- Voronova A., Jansons A., Ruņģis D. Expression of retrotransposon-like sequences in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in response to heat stress. *Environ. Exp. Biol.* 2011;9:121-127.
- Vuosku J., Läära E., Sääskilahti M., Muilu R., Sutela S., Altabella T., Sarjala T., Häggman H. Consistency of polyamine profiles and expression of arginine decarboxylase in mitosis during zygotic embryogenesis of Scots pine. *Plant Physiol.* 2006;142:1027-1038.
- Yang H., Shi G., Wang H., Xu Q. Involvement of polyamines in adaptation of *Potamogeton crispus* L. to cadmium stress. *Aquat. Toxicol.* 2010;100:282-288.

---

#### ORCID ID

E.Yu. Amineva [orcid.org/0000-0001-6800-7944](https://orcid.org/0000-0001-6800-7944)  
A.P. Gureev [orcid.org/0000-0003-3562-5329](https://orcid.org/0000-0003-3562-5329)  
O.S. Mashkina [orcid.org/0000-0001-8252-2192](https://orcid.org/0000-0001-8252-2192)  
V.N. Popov [orcid.org/0000-0003-1294-8686](https://orcid.org/0000-0003-1294-8686)

**Acknowledgements.** This work was supported in part by President of the Russian Federation, grant 14.Z57.18.3451 NSH for support of young Russian scientists and leading scientific schools.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received July 12, 2018. Revised August 7, 2018. Accepted September 25, 2018.

## Challenges of *in vitro* conservation of *Citrus* germplasm resources

V.M. Gorshkov<sup>1</sup>, L.S. Samarina<sup>1</sup> ✉, R.V. Kulyan<sup>1</sup>, V.I. Malyarovskaya<sup>1</sup>, A.V. Ryndin<sup>1</sup>, R.S. Rakhmangulov<sup>1</sup>, Y.L. Orlov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Sochi, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: samarinalidia@gmail.com

The main problems of establishment a slow growth *in vitro* collection of citrus and other tree crops cultivars are high degree of fungal contamination of bud explants and low growth potential of shoots. In this regard, the aim of current research is to assess the efficiency of decontamination procedure and the possibility of tissue culture initiation and slow growth conservation of valuable lemon cultivars. The best results of surface sterilization were obtained using immersion solutions of 0.3 % Veltolen – 25 minutes or 10 % Domestos – 25–30 minutes. In these treatments, 27.7–33.0 % of aseptic explants were obtained, respectively. However, after the third subculture, the yield of aseptic viable explants decreased till 10 % as a result of secondary contamination by endophytic fungi. The addition of biocide (“Gavrish”) in a nutrient medium at a concentration of 1 ml/l helped to increase the yield of aseptic viable explants till 50 %. However, after the third subculture the photosynthetic activity and the pigments content as well as growth rate decreased. Plants dropped yellowish leaves and eventually died. Thus, 37.35 % of plantlets survived after 8 months of conservation, and only 14.6 % survived after 10 months. Even after the third month of conservation significant decrease in the viability index and the coefficient of photosynthetic activity occurred in plants. Chlorophyll *a* in leaves decreased from 1.59 to 1.14 mg/g during 12 months *in vitro* conservation. The similar tendency observed on chlorophyll *b* and carotenoids content. The experiments were carried out for 5 years using different lemon cultivars and other citrus varieties and cultivars. Thus, micropropagation and slow growth *in vitro* conservation of valuable lemon cultivars are still problematic and requires new technical solutions due to the low growth potential of plantlets raised from the mature buds that is consistent with the data of other researchers. Key words: *Citrus*; nodal explant; contamination; micropropagation; slow growth conservation; culture media; true-to-type; endophytes.

**For citation:** Gorshkov V.M., Samarina L.S., Kulyan R.V., Malyarovskaya V.I., Ryndin A.V., Rakhmangulov R.S., Orlov Y.L. Challenges of *in vitro* conservation of *Citrus* germplasm resources. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):24-28. DOI 10.18699/VJ19.457

## Проблемы сохранения *in vitro* гермоплазмы цитрусовых

В.М. Горшков<sup>1</sup>, Л.С. Самарина<sup>1</sup> ✉, Р.В. Кулян<sup>1</sup>, В.И. Маляровская<sup>1</sup>, А.В. Рындин<sup>1</sup>, Р.С. Рахмангулов<sup>1</sup>, Ю.Л. Орлов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур, Сочи, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: samarinalidia@gmail.com

Главные проблемы создания депонированной коллекции сортов цитрусовых *in vitro*, как и некоторых других древесных растений, – высокая степень грибной контаминации вегетативных почек и последующее снижение ростового потенциала введенных в культуру *in vitro* микропобегов. В связи с этим цель нашей работы – выявить эффективность различных путей деконтаминации вегетативных эксплантов и оценить возможность введения в культуру *in vitro* и сохранения в медленнорастущей коллекции ценных сортов лимона. Наилучшие результаты поверхностной стерилизации были получены в вариантах с использованием растворов Велтолена 0.3 % – 25 минут и Доместос 10 % – 25–30 минут. В этих вариантах было получено 27.7–33.0 % стерильных жизнеспособных эксплантов соответственно. Однако после третьего пассажа выход стерильных эксплантов снизился до 10 % из-за вторичного инфицирования побегов эндофитными микроорганизмами. Использование биоцида («Гавриш») в питательной среде в концентрации 1 мл/л помогло повысить выход стерильных жизнеспособных эксплантов до 50 %. Несмотря на получение асептической культуры и начало морфогенеза, с течением времени происходило снижение фотосинтетической активности и содержания пигментов в листьях микропобегов. Ростовый потенциал микропобегов снижался с каждым последующим пассажем. После третьего пассажа микропобеги сбрасывали пожелтевшие листья, и рост их прекращался. Так, через 8 месяцев консервации выжило 37.35 % микропобегов на среде 1/2 Мурасиге–Скуга, их прирост составлял 0.33 см, а через 10 месяцев осталось лишь 14.6 % микропобегов. То есть спустя 10 месяцев консервации большая часть микропобегов погибла. Уже через три месяца консервации у растений наблюдалось существенное снижение индекса жизнеспособности и коэффициента фотосинтетической активности. Содержание хлорофилла *a* в листьях снижалось с 1.59 до 1.14 мг/г за 12 месяцев консервации *in vitro*. Аналогичная тенденция отмечена по содержанию хлорофилла *b* и каротиноидов. Эксперименты проводились в течение пяти лет с использованием разных сортов лимона и других цитрусовых. Таким образом, микроразмножение

и создание генбанка *in vitro* ценных сортов лимона все еще остается проблематичным и требует новых технических решений по причине низкого ростового потенциала эксплантов пазушных почек, что согласуется с данными других исследователей.

Ключевые слова: цитрусовые культуры; пазушные почки; контаминация; микроразмножение; *in vitro* консервация; питательная среда; генетическая однородность; эндофиты.

## Introduction

Reliable true-to-type *in vitro* conservation of valuable cultivars of tree crops requires using vegetative buds and meristems as explants which are genetically identical to the maternal plant. However, tissue culture initiation of woody explants is associated with difficulties such as a high percentage of *in vitro* contamination, low bud growth potential, and occurring of secondarily contaminated plantlets (Niedz, Bausher, 2002; Çölgeçen et al., 2009; Kolomiets et al., 2014). The life of woody plants, in particular *Citrus* crops, goes in close cohabitation with fungal microorganisms (Kloepper et al., 2013; Kulyan, 2015; Ryndin, Kulyan, 2016). Surface sterilization of explants does not relieve tissue from internal infection, and on the nutrient medium the hyphae of the fungus proliferate through plant tissues, and prevents *in vitro* development of explants.

Several approaches are known in order to solve contamination problem: (1) fractional sterilization of explants, (2) combinations of sterilizing agents, (3) the creation of an isolated plant nursery – the source of explants, (4) pre-treatment of plants and shoots before tissue culture initiation and others (Gogoi, Borua, 2014; Kolomiets et al., 2014). However, heavy decontamination procedure can be a trigger of induction of genetic variability in tissue culture (Krishna et al., 2016), in this case true-to-type genotype conservation is again impossible. The aim of our work is to identify the efficiency of various decontamination procedures to establish slow growth collection and assess the possibility of *in vitro* conservation of valuable lemon cultivars.

## Materials and methods

Plant material used in the experiments – young shoots, obtained from 5–8 year old plants grown in container culture under the greenhouse conditions from collection of the Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops (Sochi).

Nodal explants of *Citrus limon* (L.) Osbeck cultivars ‘Novoafonskii’, ‘Beskoluchii’, ‘Jubilee’, ‘Villa Franka’, ‘Frost Eureka’, and *Citrus × meyeri* Meyer were used for tissue culture initiation and conservation. The efficiency of shoots pre-treatment with the fungicide Fundazol was evaluated as follows: shoots without leaves with 5–7 buds were placed in aseptic wet vermiculite, treated with a solution of Fundazol prepared according to manufacturer’s instructions and incubated for three days under the temperature of +25 °C.

The efficiency of eight surface sterilizing solutions in different concentrations was evaluated (0.2 % Mercuric chloride, 10–20 % Domestos, 0.2–0.3 % Veltolen, 0.2–0.3 % Novodez, 0.2 % Diacid, 15–20 % Hypochlorite Ca, 3–15 % Hydrogen peroxide), the incubation time was 10–30 min (Table 1). The effects of antibiotics (tetracycline hydrochloride of 200–500 mg/l) and the 0.5–1.0 ml/l Biocide (“Gavrish”) added into the culture medium before autoclaving were assessed.

Culture medium 1/2 MS (Murashige, Scoog, 1962) supplemented with growth regulators BAP 1 mg/l, NAA 0.1 mg/l, casein hydrolyzate 500 mg/l, Phytigel 2.5 g/l, pH 5.7. Explants were cultured at standard lighting conditions 5 000 lux with periodicity 16/8 hours and temperature +22 °C. Plant growth observations were carried out every 2 weeks.

Physiological analysis were conducted on three lemon genotypes: ‘Novoafonskii’, ‘Beskoluchii’ and *Citrus × meyeri*. The coefficient of photosynthetic activity and the viability index were measured by the chlorophyll-fluorescent method (Budagovskaya et al., 2016). Chlorophyll and carotenoids contents were measured by taking 85 mg of leaf sample (mg/g fresh leaf weight). Pigments were extracted using acetone to a final volume of 50 ml. The absorbance of the extracts was measured spectrophotometrically at 662 and 644 nm for chlorophyll *a* (*ch a*) and chlorophyll *b* (*ch b*), respectively and at 440.5 nm for carotenoids. The concentration of chlorophyll *a*, *b* and total carotenoids were calculated according to Shlyk (1971).

The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and differences between treatments were considered as statistically significant at  $p < 0.05$ . The results were calculated as the mean value of at least 10 replicates in 3 repeats, mean ± SD were counted.

## Results

The best results of surface sterilization were obtained using immersion in 0.3 % Veltolen for 25 minutes (variant IVb) and 10 % Domestos for 25–30 minutes (variants VIIa and VIIb); 27.7–33.0 % of aseptic viable explants were obtained, respectively, using these treatments (Fig. 1). However, subsequent subculturing, secondary shoots infection by endophytic microorganisms occurred, and resulted decrease in the yield of aseptic explants till 10 % after the third subculture.

Shoots pre-treatment with fungicide prior to tissue culture initiation have not affected significantly the yield of aseptic explants: during the shoots incubation with Fundazol fungal mycelium of endophytes released around the cut edges of shoot as heavy visible contamination on the surface of substrate. The addition of tetracycline to the nutrient medium at a concentration of 200–500 mg/l also have not affected the yield of aseptic viable explants. However, addition of 1 mg/l biocide in a culture medium showed positive effect and the yield of aseptic viable explants increased to 50 % (average data for cultivars), while the working concentration recommended by the manufacturer of 0.5 ml/l had no significant effect. The percentage of aseptic explants did not decrease during following subculture, this drug prevented the development of fungal infection on the surface and inside the nutrient medium, however, at the apical end of the explants, the output and proliferation of fungal endophytes were observed (Fig. 2, a).

The viability of lemon shoots was reduced during further *in vitro* conservation. After 4 months, 85.63 % of viable

**Table 1.** Variants surface sterilization of lemon shoot

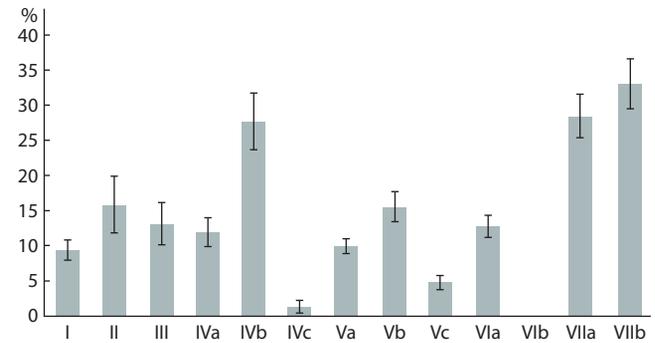
Variant	Sterilizing solution	Concentration, %	Treatment time, min
I	Hypochlorite Ca	7	20
II	Mercuric chlorite	0.2	10
III	Dyacide	0.2	10
IVa	Veltolen™	0.2	25
IVb		0.3	25
IVc		0.5	25
Va	Novodez™	0.2	25
Vb		0.3	25
Vc		0.5	25
Vla	Domestos	10	15
Vlb		20	15
Vlla		10	25
Vllb		10	30

**Table 2.** Effect of conservation period on the growth and viability of the lemon cv. 'Novoafonsky' *in vitro*

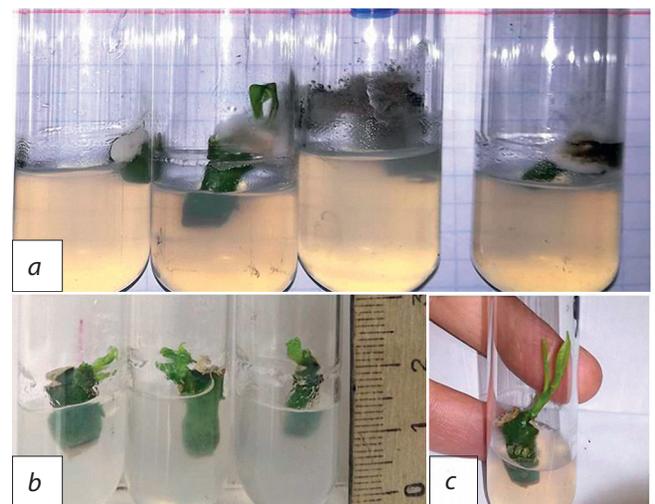
Conservation period, months	Shoot length gain, mm	Survival rate, %
2	6.35 ± 0.58	96.13 ± 2.23
4	4.65 ± 0.72	85.63 ± 2.60
6	1.93 ± 0.59	62.93 ± 2.92
8	0.33 ± 0.21	37.35 ± 3.44
10	0	14.60 ± 1.00

plants were obtained (Table 2). The shoot length increased by 4.65 mm. During further conservation leaves of plants became yellowish and dropped. Thus, only 37.35 % of plants survived after 8 months of conservation, and their shoot length increased by 0.33 mm, and 14.6 % of plants survived after 10 months. Other lemon genotypes showed similar tendency: cv. 'Beskoluchii' and *Citrus × meyeri* survival rate was 10–15 % after 10 months of conservation. Three other cultivars ('Jubilee', 'Villa Franka', 'Frost Eureka') are not survived after the 10 months of conservation *in vitro*.

Significant effect of roots on the viability of plantlets during conservation was observed. The coefficients of photosynthetic activity and the viability index showed better rooted plant performance during the conservation of three lemon cultivars 'Novoafonskii', 'Beskoluchii' and 'Meyer' (Fig. 3). After 4 months of conservation, these physiological indicators were higher for rooted plants. The viability index (the ratio of the chlorophyll fluorescence maximum to the steady-state fluorescence level of the Kautsky curve) varied from 1.50 ('Meyer' lemon) to 1.94 ('Beskoluchii') in rooted plantlets (see Fig. 3). 'Novoafonskii' cultivar showed average viability index, and in rooted plantlets it was 1.75. In plantlets without a



**Fig. 1.** Effect of sterilization treatments on sterile viable lemon buds, % (average for all cultivars).



**Fig. 2.** Tissue culture initiation of lemon (cv. 'Frost Eureka'): a – growth of fungal endophytes in the medium with 0.5 ml of biocide (10 days in culture); b – aseptic explants in the medium with 1 ml/l biocide (20 days in culture); c – shoot growth initiation (35 days in culture).

root system, viability index ranged from 1.26 ('Meyer' lemon) to 1.38 ('Beskoluchii'). The coefficient of photosynthetic activity which reflects the effectiveness of the use of light during photosynthesis, was 0.21–0.31 in rooted plantlets, and 0.12–0.16 in non-rooted plantlets. Positive correlation was observed between Viability index and Photosynthetic coefficient, and in rooted plantlets it was 0.99, in non-rooted plantlets was 0.98.

Chlorophyll *a* and *b* (*Ch a* and *Ch b*) in the leaves gradually decreased during *in vitro* conservation (Fig. 4). The content of *Ch a* decreased from 1.59 to 1.14 mg/g. A sharp decrease in *Ch b* was observed from the 1st to the 3rd months of plantlets conservation, when its content decreased by 0.16 mg, after which it did not change until the 6th month of conservation and amounted to 0.75 mg/g of fresh leaf weight. However, from the 6th to the 12th month of conservation, the content of this pigment again sharply decreased to 0.58 mg/g. During 12 months of conservation, the concentration of *Ch b* in leaves decreased by 0.33 mg. Gradual decrease in the level of carotenoids from 1.14 to 0.82 mg/g was also observed during conservation, so its concentration decreased by 0.32 mg in 12 months.

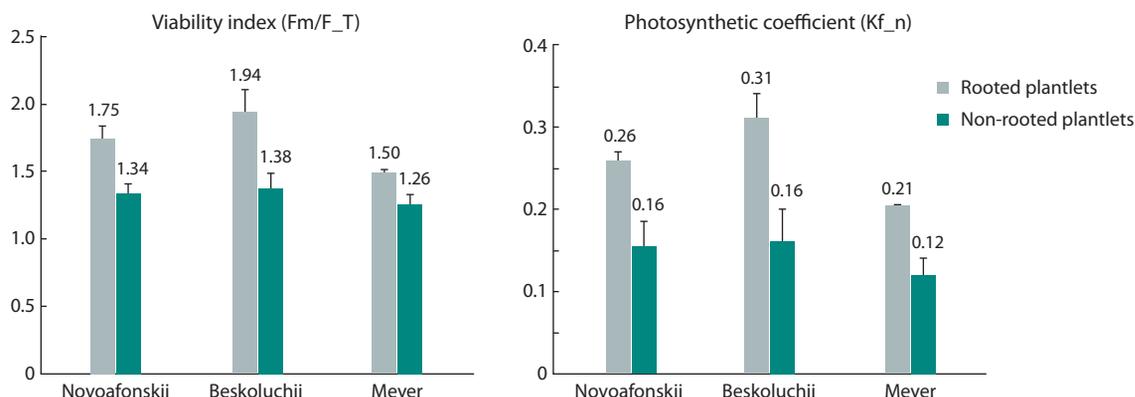


Fig. 3. Photosynthetic indices of rooted and non-rooted lemon plantlets after 4 months of conservation.

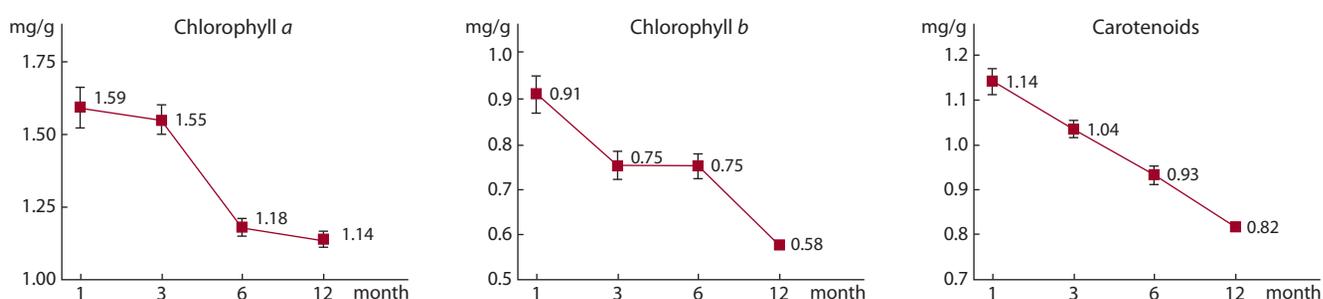


Fig. 4. Effect of conservation period on the content of chlorophylls *a*, *b* and carotenoids (mg/g of fresh leaf weight) in lemon 'Novoafonskii' cultivar *in vitro*.

## Discussion

In the Black Sea coast of the Caucasus in conditions of humid subtropical climate, the endophytic fungal microorganisms inhabit woody plants abundantly (Samarina et al., 2012). During *Citrus* shoots decontamination surface of explants is cleaned of microorganisms, but inside the shoot, in the vascular tissue, the fungal mycelium is still alive. When the nodal explants or buds are placed on the nutrient medium, the hyphae of the fungus proliferates and prevents regeneration. In the most publications on the citrus *in vitro* culture, attention is not focused on the problem of contamination. Many of these articles describe simple standard decontamination protocols using 1–2 sterilizing agents (Rathore et al., 2007; Perez-Tornero et al., 2009; Samanhudi, Muji, 2010). In our work, the problem of contamination was acute, that is why we studied various ways of overcoming it. Addition of new generation of biocide, provided by the company "Gavrish", into a culture media showed a high efficiency of decontamination of explants of all lemon cultivars. However, further micropropagation and conservation *in vitro* of valuable cultivars were still problematic because of the low growth potential of regenerating plants from axillary buds.

Our results showed low values of photosynthetic coefficient of 0.2–0.3, in contrast normally in plants it has to be no lower than 0.6 units. Consequently, our plantlets showed low efficiency of using light in photosynthesis during conservation, which indicates a decrease in the growth potential. Reduction of chlorophylls and carotenoids also indicates a general low functional state of the photosynthetic apparatus,

and the growth potential as a whole. The pigment content is an indicator that reflects the physiological adaptation of plants to various environmental factors (Belous et al., 2011). It can depend on many factors: humidity, temperature, lighting and others. In our work, we found a decrease in the pigment content in the leaves during slow growth conservation which may be a result of a decrease in nutrient concentrations in the medium and a change in the pH level. After 10 months of conservation only 14.6 % of lemon plantlets were survived *in vitro*. We tested different cultivars of lemon *C. limon* and other *Citrus* species such as *C. unshiu*, *C. sinensis*, *C. grandis*, *C. paradisi* etc., however the efficient micropropagation and conservation protocols for mature explants of valuable genotypes has not developed by us yet. Thus, despite the large body of successful protocols for slow growth conservation and micropropagation for many plant species, including elite genotypes (Pence, 2010), reliable micropropagation and *in vitro* conservation for citrus cultivars is still a problem.

Our conclusions are consistent with the findings of other researchers (Krueger, Navarro, 2007). They concluded that some species of plants easily growth *in vitro* using low temperatures and reducing the intensity of lighting and modification of the nutrient medium. In these protocols frequency of subculture occurs once a year. This procedure allows for the reliable conservation of many species germplasm *in vitro* (Engelmann, 1997). Attempts to replicate this approach on *Citrus* have not been successful in the world practice, since the protocols developed on juvenile material (*Citrus* seedlings), include a complex cycle of shoots from nodal segments, rooting and

recultivation (Marin, Duran-Vila, 1991), and these protocols are not applicable to adult plant explants (Krueger, Navarro, 2007). In addition, the citrus fruit has a low efficiency of rooting and micropropagation from bud explants, so the application of this procedure to adult genotypes is not effective (Krueger, Navarro, 2007). Thus, reliable *in vitro* conservation of valuable citrus genotypes is currently problematic and requires new technical solutions.

## References

- Belous O.G., Maliukova L.S., Kozlova N.V. Effect of mineral fertilizers on the pigment composition of leaves of tea plants in the conditions of subtropics of Russia. *Subtropicheskoe i Dekorativnoe Sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture*. 2011;44:135-143. (in Russian)
- Budagovskaya O.N., Budagovsky A.V., Budagovsky I.A., Solovyh N.V. A method for assessing the functional state of plants *in vitro* without braking sterility. Patent RU No. 0002604302 of 10.12.2016. (in Russian)
- Çölgeçen H., Koca U., Toker G. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turk. J. Biol.* 2009;35:513-520. DOI 10.3906/biy-0911-161.
- Engelmann F. *In vitro* conservation methods. In: Callow J.A., Ford-Lloyd B.V., Newbury H.J. (Eds.). *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*. CAB International, Wellingford, 1997;119-162.
- Gogoi G., Borua P.K. Standardization parameters for critical problems encountered in plant *in vitro* culture technique. *Int. J. Curr. Res.* 2014;6(12):10964-10973.
- Klopper J.W., McInroy J.A., Hu C.-H. Association of plant damage with increased populations of deleterious endophytes following use of Benlate systemic fungicide. In: Schneider C., Leifert C., Feldmann F. (Eds.). *Proc. 5th Int. Symp. "Endophytes for Plant Protection: the State of the Art"* (Humboldt University, Berlin, 26–29 May, 2013). Berlin-Dahlem, 2013;56-69.
- Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Gvasaliya M.V., Samarina L.S., Sokolov R.N. Micropropagation *in vitro* of subtropical, ornamental crops and endemics of the western Caucasus: original and optimized protocols. *Selskokhozyastvennaya Biologia = Agricultural Biology*. 2014;3:49-58. (in Russian)
- Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N., Eftekhari M., Sadh R.K. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. 3 *Biotech*. 2016;6(1):54. DOI 10.1007/s13205-016-0389-7.
- Krueger R.R., Navarro L. Citrus Germplasm Resources. In: Khan I.A. (Ed.). *Citrus: Genetics, Breeding and Biotechnology*. CAB International, 2007;45-150.
- Kulyan R.V. The genetic collection of citrus fruits is the basis for isolating the sources of economically valuable traits. *Bulleten Michurinskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of Michurin State Agrarian University*. 2015;4:52-56. (in Russian)
- Marin M.L., Duran-Vila N. Conservation of *Citrus* germplasm *in vitro*. *Am. Soc. Hortic. Sci.* 1991;116:740-746.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473-497.
- Niedz R.P., Bauscher M.G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2002;38:468-471.
- Pence V.C. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. *Kew Bull.* 2010;65:539-547.
- Perez-Tornero C.I., Tallon I., Porras I. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2009;100:263-271.
- Rathore J.S., Rathore M.S., Singh M., Singh R.P., Shekhawat N.S. Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. *Indian J. Biotechnol.* 2007;6:239-244.
- Ryndin A.V., Kulyan R.V. Collection of citrus cultures in humid subtropics of Russia. *Sadovodstvo i Vinogradarstvo = Horticulture and Viticulture*. 2016;5:24-30. (in Russian)
- Samanhudi A.T.S., Muji R. *In vitro* axillary bud multiplication of *Citrus nobilis* Lour. in Indonesia. *J. Life Sci.* 2010;4(4):39-44.
- Samarina L.S., Kolomiets T.M., Gorshkov V.M. Evaluation of the regeneration capacity of *Citrus* explants *in vitro*. *Sadovodstvo i Vinogradarstvo = Horticulture and Viticulture*. 2012;6:27-30. (in Russian)
- Shlyk A.A. Biosynthesis of chlorophyll and formation of photosynthetic systems. In: *Theoretical Foundations of Photosynthetic Productivity*. Moscow, 1971. (in Russian)

---

## ORCID ID

L.S. Samarina orcid.org/0000-0002-0500-1198

V.I. Malyarovskaya orcid.org/0000-0003-4213-8705

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received August 27, 2018. Revised November 18, 2018. Accepted November 18, 2018.

# Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system

A.M. Korotkova<sup>1</sup>✉, S.V. Gerasimova<sup>1, 2</sup>, E.K. Khlestkina<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

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

✉ e-mail: korotkova@bionet.nsc.ru

With the advent of the new genome editing tool of target-specifically customizable endonucleases, a huge variety of novel opportunities have become feasible. The crop improvement is one of the main applications of genome editing in plant science and plant biotechnology. The amount of publications referring to genome editing and CRISPR/Cas system based molecular tools application in crops is permanently growing. The aim of this study is the systematization and cataloging of these data. Earlier we published the first catalog of targeted crop genome modifications as of February 10, 2017. The current review is an update of the catalog; it covers research papers on crop genome modifications from February 10, 2017 to August 17, 2018, found by searching 47 crop names in the Scopus database. Over one year and a half, 377 articles mentioning CRISPR/Cas and crop names have been published, of which 131 articles describe an experimental application of this tool for editing 193 genes in 19 crops, including rice with the largest number of genes modified (109 genes). Editing 50 of 193 genes was aimed at crop improvement. The catalog presented here includes these 50 genes, specifying the cultivars, each gene and gene product function, modification type and delivery method used. The current full list of genes modified with CRISPR/Cas with the aim of crop improvement is 81 in 16 crops (for 5 years from August 2013 to August 2018). In this paper, we also summarize data on different modifications types in different crops and provide a brief review of some novel methods and approaches that have appeared in crop genome editing research over the reviewed period. Taken together, these data provide a clear view on current progress in crop genome modifications and traits improvement using CRISPR/Cas based genome editing technology.

Key words: biotechnology; CRISPR/Cas; crop plants; genome editing; next-generation breeding; site-directed mutagenesis; target genes.

**For citation:** Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1): 29-37. DOI 10.18699/VJ19.458

## Текущие достижения в области модификации генов культурных растений с использованием системы CRISPR/Cas

А.М. Короткова<sup>1</sup>✉, С.В. Герасимова<sup>1, 2</sup>, Е.К. Хлесткина<sup>1, 2, 3</sup>

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

✉ e-mail: korotkova@bionet.nsc.ru

С появлением технологии геномного редактирования, основанной на применении сайт-специфических эндонуклеаз, открылось огромное количество новых возможностей. Одной из ключевых задач геномного редактирования в биологии и биотехнологии растений является улучшение культурных растений. Число публикаций, описывающих редактирование генома сельскохозяйственных видов с помощью системы CRISPR/Cas, неуклонно возрастает. Цель работы – систематизация и каталогизация этих данных. Ранее мы проводили анализ индексируемых в базе данных Scopus публикаций, описывающих модификации генома растений, в каталоге, включающем сведения на 10.02.2017. Текущий обзор – это обновление каталога; он охватывает исследовательские работы о модификациях генома сельскохозяйственных культур с 10 февраля 2017 г. по 17 августа 2018 г., найденные путем поиска по 47 названиям культур в базе данных Scopus. В течение полутора лет было опубликовано 377 статей, в которых названия культурных растений упоминались в сочетании с «CRISPR», из них 131 статья описывает экспериментальное применение данного метода для редактирования 193 генов в 19 культурах, включая рис с наибольшим количеством модифицированных генов (109 генов). Редактирование 50 из 193 генов было направлено на улучшение свойств растений. Представлен

ный каталог описывает эти 50 генов с указанием сортов, функций продуктов генов, типа модификации и используемого метода доставки. Текущее общее количество генов, модифицированных с помощью CRISPR/Cas с целью улучшения признака, составляет 81 в 16 культурах (за пять лет с августа 2013 по август 2018 г.). В этой статье мы также обобщаем данные о различных типах модификаций в культурах растений и даем краткий обзор некоторых новых методов и подходов, которые появились в исследованиях редактирования генома растений за рассматриваемый период. В совокупности эти данные дают четкое представление о текущем прогрессе в области модификации и улучшения генома растений с использованием технологии CRISPR/Cas. Ключевые слова: CRISPR/Cas; биотехнология; гены-мишени; геномное редактирование; культурные растения; направленный мутагенез; селекция нового поколения.

## Introduction

The rapidly developing complex of genome editing methods provides opportunities for the permanent expansion of technique utilization in different fields. Breeding and crop improvement is a broad field with endless possible applications of targeted genome modifications. However, the progress in its application is unpredictably affected by different factors. There are different limitations. Many methods are still genotype-dependent, and there are crops with only few certain model cultivars amenable for genome editing. The overview of a field and comparative analysis of different types of modifications in different crops is necessary to reveal the “hot points” and “problem zones” of this technology. Such analysis can help predict the success of each modification in each crop and set goals for further research. We published the first catalog of targeted crop genome modifications performed from the date of method emergence until February 10, 2017. Careful registration of all successful events in trait improvement by CRISPR/Cas-based modification after that date (from February 2017 until August 2018) is the aim of the present research.

## Genome editing in different crops

The search was carried out using 47 crop names in the Scopus database ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)). A total of 377 articles were mined by using the keyword CRISPR with a crop name within article titles, abstracts and keywords. Each article was analyzed, and the data about editing genes with the help of CRISPR/Cas9 were recorded. The number of publications describing experimental applications of CRISPR/Cas-based genome modifications was 131 (≈35 %). These articles describe the editing of the genomes of 19 crops with 193 target genes, including rice with the largest number of genes modified (109 genes). Compared to the previous period (Korotkova et al., 2017), data for the genome editing of the following 9 crops have been added: alfalfa, cassava, cotton, coffee, banana, carrot, switchgrass, oilseed rape and *Brassica carinata* (Ethiopian mustard). Thus, the current total number of edited crops is 24 including cereal and corn crops (barley, maize, rice, switchgrass, wheat), vegetables and melons (cabbage, carrot, cassava, cucumber, potato, rape, tomato, watermelon), fruits (apple, banana, grape, grapefruit, orange), legumes (alfalfa, soybean), technical crops (Ethiopian mustard, cotton, flax) and coffee.

The 131 articles describing the experimental application of CRISPR/Cas-based genome modifications (published from February 10, 2017 until August 17, 2018) were analyzed to distinguish studies aimed at crop improvement from functional genetics investigations or methodological research. A total of 38 papers were identified as describing gene editing aimed at crop improvement. The number of genes related to

trait improvement without obvious severe pleiotropic effects on other plant properties was 50 for 11 crops. These genes were included in the catalogue (see the Table). Four crops (cotton, oilseed rape, orange, and switchgrass) were new in comparison with the Catalogue-2017 (Korotkova et al., 2017). Thus, from 24 crops on which CRISPR/Cas was successfully tested, 16 were used in the studies aimed at their improvement (apple, barley, cotton, cucumber, flax, grape, grapefruit, maize, orange, potato, oilseed rape, rice, soybean, switchgrass, tomato, wheat). The previous (Korotkova et al., 2017) and current (see the Table) catalogues include a total of 81 genes (Fig. 1), with the largest gene numbers in rice (34 genes), tomato (14 genes) and wheat (7 genes).

Among the novel genes modified, negative regulators are most frequent, such as negative regulators of rice grain fragrance (Lu et al., 2017) and earliness (Li et al., 2017), negative regulators of powdery mildew resistance in wheat (Zhang et al., 2017) and resistance to fungal pathogens in barley (Kumar et al., 2018), negative regulators of lateral roots growth in cotton (Wang Y. et al., 2017) and parthenocarpy in tomato (Ueta et al., 2017), etc. (see the Table). Knockout of negative regulators by NHEJ (non-homologous ends joining) results in crop improvement or obtaining genotypes with desired properties. For example, knockout of the *Waxy* gene in rice resulted in the development of new transgene-free rice lines with lower amylose content (Zhang et al., 2018). Based on amylose content values, rice is commercially classified into five groups: waxy (0–5 %), very low (5–12 %), low (12–20 %), intermediate (20–25 %), and high (25–33 %) AC. Waxy rice, also called glutinous rice, is especially sticky when cooked. The resulting rice phenotype has special properties that are important for use in the food industry. The further example is the low-gluten transgene-free wheat. It was obtained by multiplex knockout of  $\alpha$ -gliadin genes (Sánchez-León et al., 2017). Wheat grain contains gluten proteins. Amongst these, the  $\alpha$ -gliadin family is the main protein group associated with the development of coeliac disease and noncoeliac gluten sensitivity. Traditional mutagenesis and plant breeding have failed to obtain low immunogenic wheat varieties for patients with coeliac. It was shown that CRISPR/Cas9 technology can be used to precisely and efficiently reduce the amount of  $\alpha$ -gliadins. It could be used to produce low-gluten foodstuff and serve as a source material to introgress this trait into elite wheat varieties.

In some cases, NHEJ was used not for knockout of the target gene but for a finer change in the gene. For example, in tomato, the *GAD2* and *GAD3* genes encoding a key enzyme in  $\gamma$ -aminobutyric acid biosynthesis, deletion of the autoinhibitory domain by introducing a stop codon was

achieved, resulting in an increased level of  $\gamma$ -aminobutyric acid (non-proteinogenic amino acid that has hypotensive effects) in tomato fruits (Nonaka et al., 2017). Tomato fruits with an increased level of  $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA (a non-proteinogenic amino acid that has hypotensive effects), were obtained. Such tomatoes can be useful for patients' treatment with mild high blood pressure or high-normal blood pressure.

In 5 of the 50 genes modified (see the Table), amino acid substitutions or allelic replacements were made using the homologous recombination (HR) approach or chimeric single-guide RNA (cgRNA) repair method. The exact replacement of the existing *NRT1.1B* allele in commercial varieties with the elite allele in rice was produced (Li et al., 2018). Without additional selection pressure, the Japonica *NRT1.1B* allele was successfully replaced with an elite allele in just one generation at a frequency of 6.72 %. This work demonstrates the feasibility of replacing any genes with elite alleles within one generation, greatly expanding our ability to improve agriculturally important traits.

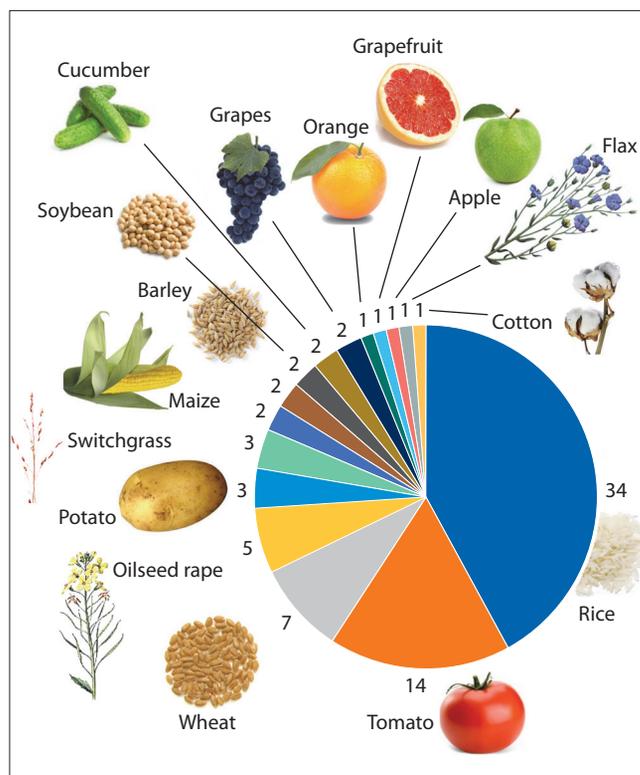
For the *ALS* gene (related to resistance to herbicides), besides the HR approach, the target-AID (target-activation induced cytidine deaminase) method was used to make amino acid substitution (Shimatani et al., 2017, 2018a, b). Adenine and cytidine deaminases convert their respective nucleotides into other DNA bases, thereby offering many possibilities for DNA editing.

In addition to target-AID, some other novel methods and approaches appeared in crop genome editing research during the reviewed period. Besides Cas9 nuclease, Cpf1 nuclease has been used. Cpf1 enzymes are a family of type V CRISPR nucleases that includes both endoribonuclease and endodeoxyribonuclease activities. AsCpf1 recognizes the 5'-TTTN-3' protospacer adjacent motif, thus it can be used for targeting AT-rich genomes (Yamano et al., 2016). In addition, Cpf1 nucleases were shown to have lower rates of off-target edits relative to Cas9 nucleases (Begemann et al., 2017). Further qualification and broad introduction of the Cpf1 genome editing technology have the potential to make a vast impact on plant biotechnology.

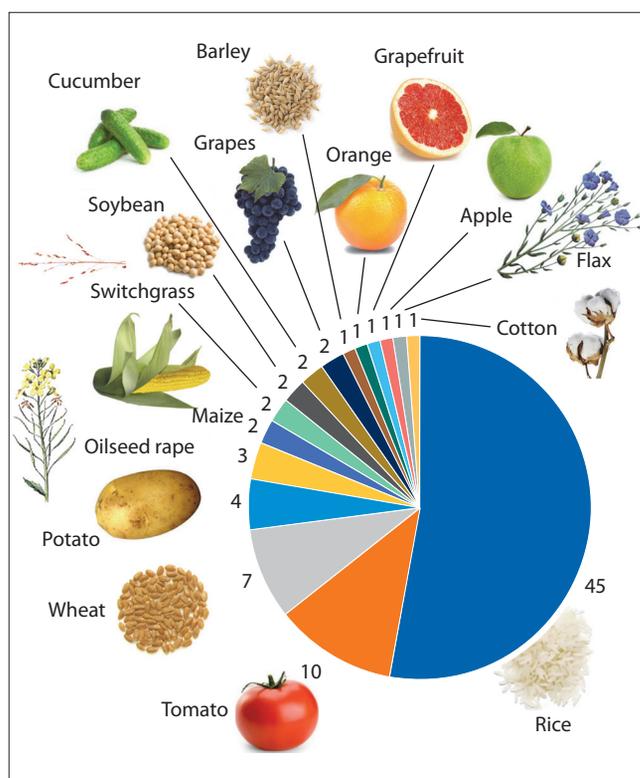
DNA-free genome editing in crops develops further. Previously, efficient delivery of both Cas9 (Svitashev et al., 2016) and Cpf1 (Kim et al., 2017) as ribonucleoprotein complexes (RNPs) with guide RNAs was reported for maize embryos and soybean protoplasts, respectively. The detailed protocol is now available for wheat (Liang et al., 2018); RNP delivery to protoplast with subsequent regeneration of plants is reported for potato (Andersson et al., 2018).

The combination of double-haploid technology and genome editing enables one to efficiently produce homozygous plants with modified genomes. The utilization of double haploid plants regeneration from pollen of primary transformants was demonstrated in barley (Hensel et al., 2018). Targeted mutagenesis in pollen grains with subsequent regeneration of double haploid plants in one generation was proposed in wheat (Bhowmik et al., 2018).

New PAMs (for example, NAG PAM) for CRISPR/Cas9 gene editing were tested and showed good activity (Meng et al., 2018). It was revealed that the most widely used wild type SpCas9 is robust in recognizing both NAG and NGG PAMs in rice. The NAG PAM could be chosen alone or together with



**Fig. 1.** Number of genes modified using CRISPR/Cas system with the aim of crops improvement, summarized from (Korotkova et al., 2017) and the Table for the period from August 2013 till August 2018.



**Fig. 2.** Number of genotypes modified using CRISPR/Cas system with the aim of crops improvement, summarized from (Korotkova et al., 2017) and the Table for the period from August 2013 till August 2018.

Crop genes modified with the CRISPR/Cas system to improve agronomically important traits (according to publications indexed in Scopus; from February 10, 2017 to August 17, 2018)

Target gene	Function of the encoded product	Modification	Desired trait	Cultivar/line name	Transformation method	Modified plants frequency, %	Transgene-free plants	Reference
RICE								
<i>AAP3</i>	Amino acid transporter	Knockout	Increased tiller number and panicle number (increased grain yield)	Zhonghua 11 Kongyu 131	Agrobacterium-mediated transformation	No data	-	Lu et al., 2018
<i>ALS</i>	A key enzyme for the biosynthesis of branched-chain amino acids (major targets for herbicides)	Substitutions via the use of chimeric single-guide RNA (cgRNA) repair method	Resistance to herbicides	Nipponbare	Protoplast transformation Agrobacterium-mediated transformation	16.88	-	Butt et al., 2017
<i>ALS</i>	A key enzyme for the biosynthesis of branched-chain amino acids (major targets for herbicides)	Substitutions via Target-AID*	Resistance to herbicides	Nipponbare	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 18.3	+	Shimatani et al., 2017, 2018a, b
<i>ARM1</i>	Arsenite-responsive R2R3 MYB transcription factor	Knockout	Increased tolerance to arsenic stress	Nipponbare Dongjing SSBM	Agrobacterium-mediated transformation	No data	+	Wang F. et al., 2017
<i>BADH2</i>	Negative regulator of grain fragrance	Knockout	Fragrant grain	Xidao	Agrobacterium-mediated transformation	70	+	Lu et al., 2017
<i>DEP1</i>	Regulator of inflorescence architecture and plant height	Multiplex knockout	Dense erect panicle, semi-dwarf phenotype	Nipponbare	Agrobacterium-mediated transformation	83	-	Shen L. et al., 2017
<i>EP3</i>	Regulator of inflorescence		Erect panicle			50		
<i>GS3</i>	Negative grain size regulator		Larger grain size			100		
<i>GW2</i>	Negative grain weight regulator		Increased grain weight			67		
<i>Gn1a</i>	Negative regulator of grain number		Enhanced grain number per panicle			97		
<i>BADH2</i>	Negative regulator of grain fragrance		Fragrant grain			81		
<i>Hd1</i>	Delayed flowering time under log day conditions		Early flowering			78		
<i>FAD2-1</i>	Fatty acid desaturase 2	Knockout	Increased oleic acid content; decrease of linoleic acid content to undetectable levels	Nipponbare	Agrobacterium-mediated transformation	No data	-	Abe et al., 2018
<i>HAK1</i>	K <sup>+</sup> transporter	Knockout	Dramatically reduced Cs <sup>+</sup> uptake by rice plants	Nipponbare	Agrobacterium-mediated transformation	83	+	Nieves-Cordones et al., 2017

<i>Hd2, Hd4, Hd5</i>	Negative regulators of earliness (suppressors of the <i>Early heading date 1 – Ehd1</i> gene expression)	Knockout	Extremely early flowering	Longdao16 Longdao18 Daohuaxiang2 Songjing19 Dongnong430 Dongnong429 Longqingdao2 Heinuomi Banpohe Bijing45	Agrobacterium-mediated transformation	77.8	-	Li et al., 2017	
<i>LCT1</i>	Cd transporter	Knockout	Reduction of Cd trans- portation into rice grain	Xidao	Agrobacterium-mediated transformation	70	+	Lu et al., 2017	
<i>Nramp5</i>	Metal transporter gene	Knockout	Reduction of Cd trans- portation into rice grain	Huazhan Longke 638S	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 82.4	+	Tang et al., 2017	
<i>NRT1.1B</i>	Nitrogen transporter	Allelic replacement	Increase in nitrogen use efficiency	Zhonghua 11	Particle bombardment	6.72	-	Li et al., 2018	
<i>PYL1, PYL4, PYL6</i>	PYR1-like regulatory components of the ABA receptor	Multiplex knockout	Faster growth and higher yield in natural paddy field conditions without negative effect on dormancy	Nipponbare	Agrobacterium-mediated transformation	No data	-	Miao et al., 2018	
<i>SaE, SaM</i>	Hybrid male sterility regulators	Knockout	Overcoming the hybrid male sterility in rice breeding	T65	Agrobacterium-mediated transformation	No data	+	Xie et al., 2017	
<i>SBEIIb</i>	Starch branching enzyme	Knockout	Increased amylose content and resistant starch in grain	Kitaake	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 40	+	Sun et al., 2017	
<i>Sc-j</i>	Regulator of hybrid incompatibility	Knockout	Overcoming the reproductive barrier for hybrid breeding	E5	Agrobacterium-mediated transformation	No data	-	Shen R. et al., 2017	
<i>Waxy (GBSS)</i>	Granule-bound starch synthase (GBSS)	Knockout	Increase in the amylopectin/amylose ratio (Change of starch properties)	Xiushui134 Wuyunjing 7	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 86	+	Zhang et al., 2018	
WHEAT									
<i>EDR1</i>	Negative regulator of powdery mildew resistance	Knockout of three copies	Increased resistance to powdery mildew	Bread wheat KN199	Biolistic transformation	No data	+	Zhang et al., 2017	
<i>Gli</i>	Grain storage proteins $\alpha$ -gliadin gene family	Multiplex knockout of more than 40 copies	Low-gluten wheat with immunoreactivity reduced by 85 %	Bread wheat BW208 and THA53 durum wheat Don Pedro	Biolistic transformation	Up to 75	+	Sánchez-León et al., 2017	

Table (end)

Target gene	Function of the encoded product	Modification	Desired trait	Cultivar/line name	Transformation method	Modified plants frequency, %	Transgene-free plants	Reference
BARLEY								
<i>MORC1</i>	Negative regulator of resistance to fungal pathogens	Knockout	Increased resistance to fungal pathogens	Golden Promise	Agrobacterium-mediated transformation	77	-	Kumar et al., 2018
SWITCHGRASS								
<i>Pv4CL</i>	A key enzyme of phenylpropanoid biosynthesis	Knockout	Lignin reduction and increased sugar release for improved bioethanol production	NFCX1	Agrobacterium-mediated transformation	10 %	+	Park et al., 2017
<i>tb1a, tb1b</i>	Negative regulator of outgrowth of lateral branches	Knockout	Increased tiller numbers	Alamo	Agrobacterium-mediated transformation	95.5 and 11	+	Liu et al., 2018
POTATO								
<i>St16DOX</i>	A key enzyme of steroidal glycoalkaloids (SGA) biosynthesis	Knockout	Significant decrease in the SGA content	Mayqueen	Agrobacterium-mediated transformation (in a potato hairy root culture)	No data	-	Nakayasu et al., 2018
TOMATO								
<i>ALC (alcobaca)</i>	Fruit shelf life related gene	Amino acid substitution	Long-shelf life of tomato fruits	M82	Agrobacterium-mediated stable transformation	72.73	+	Yu et al., 2017
<i>ETR1</i>	Ethylene receptor	Amino acid substitutions via Target-AID*	Control of plant of parthenocarp and shelf life period	Micro-Tom	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 53.8	+	Shimatani et al., 2017
<i>GAD2, GAD3</i>	A key enzyme in $\gamma$ -aminobutyric acid biosynthesis (a target is C-terminal extension region involved in auto-inhibition)	Deletion of the auto-inhibitory domain by introducing a stop codon	Increased level of $\gamma$ -aminobutyric acid (non-proteinogenic amino acid that has hypotensive effects) in tomato fruits	Micro-Tom	Agrobacterium-mediated transformation	No data	+	Nonaka et al., 2017
<i>IAA9</i>	Negative regulator of parthenocarp	Knockout	Parthenocarp	Micro-Tom Ailsa Craig	Agrobacterium-mediated transformation	Almost 100	+	Ueta et al., 2017
<i>Mlo1</i>	Negative regulator of powdery mildew resistance	Knockout	Increased resistance to powdery mildew	MoneyMaker	Agrobacterium-mediated transformation	No data	+	Nekrasov et al., 2017
<i>MYB12</i>	R2R3-MYB transcription factor for flavonoid biosynthesis	Knockout	Changing fruit color from red to pink	TB0249 TB0240 TB0216 TB0115	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 100	+	Deng et al., 2017

<i>PROCERA</i>	DELLA growth regulator	Deletion of 3 nt	Control of plant height and parthenocarpy	Moneymaker	Agrobacterium-mediated transformation	No data	+	Tomlinson et al., 2019
<i>PROCERA</i>	DELLA growth regulator	Amino acid substitutions via Target-AID*, deletion of 12 nt	Control of plant height and parthenocarpy	Micro-Tom	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 53.8	+	Shimatani et al., 2017
CUCUMBER								
<i>WIP1</i>	An inhibitor of carpel development	Knockout	Gynoecious phenotype, with the upper nodes bearing only female flowers	CU2	Agrobacterium infection	64.3	+	Hu et al., 2017
GRAPE								
<i>WRKY52</i>	Negative regulator of resistance to <i>Botrytis cinerea</i>	Knockout	Increased the resistance to <i>Botrytis cinerea</i>	Thompson Seedless	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 27	-	Wang X. et al., 2017
ORANGE								
<i>CsLOB1</i>	Negative regulator of resistance to citrus canker promoter contains effector	Indels in effector binding element of the CsLOB1 promoter	Increased resistance to citrus canker	Wanjincheng	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 64.7	-	Peng et al., 2017
COTTON								
<i>ARG</i>	Negative regulator of lateral roots growth	Knockout of 2 copies	Significantly improved lateral root system development	R18	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 98	-	Wang Y. et al., 2017
OILSEED RAPE								
<i>ALC (ALCATRAZ)</i>	Negative regulator of shatter resistance	Knockout of 2 copies	Increased shatter resistance (decreased seed loss during mechanical harvest)	Haydn	Agrobacterium-mediated transformation	No data	+	Braatz et al., 2017
<i>CLV3</i>	CLAVATA3 – a peptide ligand that interacts with the CLV1/CLV2 receptor complex to limit the number of stem cells in the shoot apical meristem	Knockout of 2 copies	Increased seed production	J9707	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 48.65	+	Yang et al., 2018
<i>DA1, DA2</i>	Negative regulators of organ size	Knockout	Increases in organ size	Westar	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 100	+	Yang et al., 2017
<i>FAD2</i>	Fatty acid desaturase 2	Knockout	Increased oleic acid content	Westar	Agrobacterium-mediated transformation	Up to 50	+	Okuzaki et al., 2018

\* Target-AID (target-activation induced cytidine deaminase).

NGG PAM for efficient genome editing, and have a relatively low off-target effect.

To assess possibility for a widespread practical application of genome editing in breeding programs, we summarized data on a number of improved genotypes for each crop (Fig. 2). The biggest progress was achieved on rice (45 genotypes), tomato (10 genotypes) and wheat (7 genotypes). In most crops, only one (apple, barley, cotton, flax, grapefruit, orange) or two (cucumber, grapes, maize, soybean, switchgrass) genotypes were modified (see Fig. 2). The genotype-dependent efficacy of *in vitro* cultivation is a frequent problem for most species. Furthermore, in some species, like barley, finding transformation-efficient genotypes is a rare case. Hisano et al. (2017) performed a high-resolution mapping of the TFA (transformation amenability) loci and proposed a marker-assisted approach for selection of transformation-efficient barley genotypes. The use of this approach in barley marker-assisted breeding may increase the possibility for wider application of genome editing for improvement of future barley cultivars. Thus, considering genome editing in tight association with classical and marker-assisted breeding tools can provide the most efficient and most realistic way for next-generation breeding.

## Conclusion

Targeted knockout via indels introduction and subsequent frameshift mutation induction has been successfully applied in many crops and is now being routinely used for agriculturally valuable traits improvement. Base editing shows rapid development and seems to be a promising tool for many applications in crops. Precise genome editing via HR remains challenging. The majority of genome modifications have been performed for rice and tomato, involving many different cultivars and all types of modifications. The technology is currently applied for many important crops including main cereal crops, oilseed, cotton, vegetables and fruits.

## References

Abe K., Araki E., Suzuki Y., Toki S., Saika H. Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. *Plant Physiol. Biochem.* 2018; 131:58-62. DOI 10.1016/J.PLAPHY.2018.04.033.

Andersson M., Turesson H., Olsson N., Fält A.S., Ohlsson P., Gonzalez M.N., Samuelsson M., Hofvander P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol. Plant.* 2018; 164:378-384. DOI 10.1111/pp.12731.

Begemann M.B., Gray B.N., January E., Gordon G.C., He Y., Liu H., Wu X., Brutnell T., Mockler T., Oufattole M. Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases. *Sci. Rep.* 2017;7(1):11606. DOI 10.1038/s41598-017-11760-6.

Bhowmik P., Ellison E., Polley B., Bollina V., Kulkarni M., Ghanbaria K., Song H., Gao C., Voytas D., Kagale S. Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* 2018;8(1):6502. DOI 10.1038/s41598-018-24690-8.

Braatz J., Harloff H.J., Mascher M., Stein N., Himmelbach A., Jung C. CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Physiol.* 2017;174(2):935-942. DOI 10.1104/pp.17.00426.

Butt H., Eid A., Ali Z., Atia M.A.M., Mokhtar M.M., Hassan N., Lee C., Bao G., Mahfouz M.M. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1441. DOI 10.3389/fpls.2017.01441.

Deng L., Wang H., Sun C., Li Q., Jiang H., Du M., Li C.B., Li C. Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 sys-

tem. *J. Genet. Genomics.* 2017;45:51-54. DOI 10.1016/J.JGG.2017.10.002.

Hensel G., Pouramini P., Hiekel S., Reuter P., Baier S., Kumlehn J. Generation of new barley mutant alleles of LIPOXYGENASE 1 using CRISPR RNA/Cas9-endonuclease technology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 2018;54:S87-S88.

Hisano H., Meints B., Moscou M.J., Cistue L., Echávarri B., Sato K., Hayes P.M. Selection of transformation-efficient barley genotypes based on TFA (transformation amenability) haplotype and higher resolution mapping of the TFA loci. *Plant Cell Rep.* 2017;36(4):611-620. DOI 10.1007/s00299-017-2107-2.

Hu B., Li D., Liu X., Qi J., Gao D., Zhao S., Huang S., Sun J., Yang L. Engineering non-transgenic gynocercous cucumber using an improved transformation protocol and optimized CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant.* 2017;10(12):1575-1578. DOI 10.1016/J.MOLP.2017.09.005.

Kim H., Kim S.T., Ryu J., Kang B.C., Kim J.S., Kim S.G. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat. Commun.* 2017;8:14406. DOI 10.1038/ncomms14406.

Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. Crop genes modified using the CRISPR/Cas system. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2017;7(8):822-832. DOI 10.1134/S2079059717050124.

Kumar N., Galli M., Ordon J., Stuttmann J., Kogel K.-H., Imani J. Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9 gene-editing system. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16:1892-1903. DOI 10.1111/pbi.12924.

Li J., Zhang X., Sun Y., Zhang J., Du W., Guo X., Li X., Zhao Y., Xia L. Efficient allelic replacement in rice by gene editing: A case study of the *NRT1.1B* gene. *J. Integr. Plant Biol.* 2018;60(7):536-540. DOI 10.1111/jipb.12650.

Li X., Zhou W., Ren Y., Tian X., Lv T., Wang Z., Fang J., Chu C., Yang J., Bu Q. High-efficiency breeding of early-maturing rice cultivars via CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *J. Genet. Genomics.* 2017;44(3):175-178. DOI 10.1016/J.JGG.2017.02.001.

Liang Z., Chen K., Yan Y., Zhang Y., Gao C. Genotyping genome-edited mutations in plants using CRISPR ribonucleoprotein complexes. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16:2053-2062. DOI 10.1111/pbi.12938.

Liu Y., Merrick P., Zhang Z., Ji C., Yang B., Fei S. Targeted mutagenesis in tetraploid switchgrass (*Panicum virgatum* L.) using CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16(2):381-393. DOI 10.1111/pbi.12778.

Lu H., Liu S., Xu S., Chen W., Zhou X., Tan Y., Huang J., Shu Q. CRISPR-S: an active interference element for a rapid and inexpensive selection of genome-edited, transgene-free rice plants. *Plant Biotechnol. J.* 2017;15(11):1371-1373. DOI 10.1111/pbi.12788.

Lu K., Wu B., Wang J., Zhu W., Nie H., Qian J., Huang W., Fang Z. Blocking amino acid transporter OsAAP3 improves grain yield by promoting outgrowth buds and increasing tiller number in rice. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16:1710-1722. DOI 10.1111/pbi.12907.

Meng X., Hu X., Liu Q., Song X., Gao C., Li J., Wang K. Robust genome editing of CRISPR-Cas9 at NAG PAMs in rice. *Sci. China Life Sci.* 2018;61(1):122-125. DOI 10.1007/s11427-017-9247-9.

Miao C., Xiao L., Hua K., Zou C., Zhao Y., Bressan R.A., Zhu J.K. Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(23):6058-6063. DOI 10.1073/pnas.1804774115.

Nakayasu M., Akiyama R., Lee H.J., Osakabe K., Osakabe Y., Watanabe B., Sugimoto Y., Umemoto N., Saito K., Muranaka T., Mizutani M. Generation of  $\alpha$ -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the *St16DOX* gene. *Plant Physiol. Biochem.* 2018;131:70-77. DOI 10.1016/J.PLAPHY.2018.04.026.

Nekrasov V., Wang C., Win J., Lanz C., Weigel D., Kamoun S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci. Rep.* 2017;7(1):482. DOI 10.1038/s41598-017-00578-x.

Nieves-Cordones M., Mohamed S., Tanoi K., Kobayashi N.I., Takagi K., Vernet A., Guiderdoni E., Perin C., Sentenac H., Véry A.A.

- Production of low-Cs<sup>+</sup> rice plants by inactivation of the K<sup>+</sup> transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system. *Plant J.* 2017;92(1): 43-56. DOI 10.1111/tj.13632.
- Nonaka S., Arai C., Takayama M., Matsukura C., Ezura H. Efficient increase of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci. Rep.* 2017;7(1):7057. DOI 10.1038/s41598-017-06400-y.
- Okuzaki A., Ogawa T., Koizuka C., Kaneko K., Inaba M., Imamura J., Koizuka N. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.* 2018;131:63-69. DOI 10.1016/J.PLAPHY.2018.04.025.
- Park J.J., Yoo C.G., Flanagan A., Pu Y., Debnath S., Ge Y., Ragauskas A., Wang Z.Y. Defined tetra-allelic gene disruption of the 4-coumarate:coenzyme A ligase 1 (Pv4CL1) gene by CRISPR/Cas9 in switchgrass results in lignin reduction and improved sugar release. *Biotechnol. Biofuels.* 2017;10(1):284. DOI 10.1186/s13068-017-0972-0.
- Peng A., Chen S., Lei T., Xu L., He Y., Wu L., Yao L., Zou X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnol. J.* 2017;15(12):1509-1519. DOI 10.1111/pbi.12733.
- Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Giménez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* 2017;16:902-910. DOI 10.1111/pbi.12837.
- Shen L., Hua Y., Fu Y., Li J., Liu Q., Jiao X., Xin G., Wang J., Wang X., Yan C., Wang K. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Sci. China Life Sci.* 2017; 60(5):506-515. DOI 10.1007/s11427-017-9008-8.
- Shen R., Wang L., Liu X., Wu J., Jin W., Zhao X., Xie X., Zhu Q., Tang H., Li Q., Chen L., Liu Y.G. Genomic structural variation-mediated allelic suppression causes hybrid male sterility in rice. *Nat. Commun.* 2017;8(1):1310. DOI 10.1038/s41467-017-01400-y.
- Shimatani Z., Fujikura U., Ishii H., Matsui Y., Suzuki M., Ueke Y., Taoka K., Terada R., Nishida K., Kondo A. Inheritance of co-edited genes by CRISPR-based targeted nucleotide substitutions in rice. *Plant Physiol. Biochem.* 2018a;131:78-83. DOI 10.1016/J.PLAPHY.2018.04.028.
- Shimatani Z., Fujikura U., Ishii H., Terada R., Nishida K., Kondo A. Herbicide tolerance-assisted multiplex targeted nucleotide substitution in rice. *Data in Brief.* 2018b;20:1325-1331. DOI 10.1016/J.DIB.2018.08.124.
- Shimatani Z., Kashojiya S., Takayama M., Terada R., Arazoe T., Ishii H., Teramura H., Yamamoto T., Komatsu H., Miura K., Ezura H., Nishida K., Ariizumi T., Kondo A. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* 2017;35(5):441-443. DOI 10.1038/nbt.3833.
- Sun Y., Jiao G., Liu Z., Zhang X., Li J., Guo X., Du W., Du J., Francis F., Zhao Y., Xia L. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Front. Plant Sci.* 2017;8:298. DOI 10.3389/fpls.2017.00298.
- Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J.K., Cigan A.M. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 2016;7:13274. DOI 10.1038/ncomms13274.
- Tang L., Mao B., Li Y., Lv Q., Zhang L., Chen C., He H., Wang W., Zeng X., Shao Y., Pan Y., Hu Y., Peng Y., Fu X., Li H., Xia S., Zhao B. Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating *indica* rice without compromising yield. *Sci. Rep.* 2017;7(1):14438. DOI 10.1038/s41598-017-14832-9.
- Tomlinson L., Yang Y., Emenecker R., Smoker M., Taylor J., Perkins S., Smith J., MacLean D., Olszewski N.E., Jones J.D.G. Using CRISPR/Cas9 genome editing in tomato to create a gibberellin-responsive dominant dwarf DELLA allele. *Plant Biotechnol. J.* 2019; 17:132-140. DOI 10.1111/pbi.12952.
- Ueta R., Abe C., Watanabe T., Sugano S.S., Ishihara R., Ezura H., Osakabe Y., Osakabe K. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* 2017;7(1):507. DOI 10.1038/s41598-017-00501-4.
- Wang F.Z., Chen M.X., Yu L.J., Xie L.J., Yuan L.B., Qi H., Xiao M., Guo W., Chen Z., Yi K., Zhang J., Qiu R., Shu W., Xiao S., Chen Q.F. OsARM1, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in regulation of the response to arsenic stress in rice. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1868. DOI 10.3389/fpls.2017.01868.
- Wang X., Tu M., Wang D., Liu J., Li Y., Li Z., Wang Y., Wang X. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant Biotechnol. J.* 2017;16:844-855. DOI 10.1111/pbi.12832.
- Wang Y., Meng Z., Liang C., Meng Z., Wang Y., Sun G., Zhu T., Cai Y., Guo S., Zhang R., Lin Y. Increased lateral root formation by CRISPR/Cas9-mediated editing of arginase genes in cotton. *Sci. China Life Sci.* 2017;60(5):524-527. DOI 10.1007/s11427-017-9031-y.
- Xie Y., Niu B., Long Y., Li G., Tang J., Zhang Y., Ren D., Liu Y., Chen L. Suppression or knockout of *SaF/SaM* overcomes the *Sa*-mediated hybrid male sterility in rice. *J. Integr. Plant Biol.* 2017;59(9):669-679. DOI 10.1111/jipb.12564.
- Yamano T., Nishimasu H., Zetsche B., Hirano H., Slaymaker I.M., Li Y., Fedorova I., Nakane T., Makarova K., Koonin E., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* 2016;165(4):949-962. DOI 10.1016/J.CELL.2016.04.003.
- Yang H., Wu J.-J., Tang T., Liu K.D., Dai C. CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiently creates specific mutations at multiple loci using one sgRNA in *Brassica napus*. *Sci. Rep.* 2017;7(1):7489. DOI 10.1038/s41598-017-07871-9.
- Yang Y., Zhu K., Li H., Han S., Meng Q., Khan S.U., Fan C., Xie K., Zhou Y. Precise editing of *CLAVATA* genes in *Brassica napus* L. regulates multilocular silique development. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16(7):1322-1335. DOI 10.1111/pbi.12872.
- Yu Q., Wang B., Li N., Tang Y., Yang S., Yang T., Xu J., Guo C., Yan P., Wang Q., Asmutola P. CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate long-shelf life tomato lines. *Sci. Rep.* 2017;7(1):11874. DOI 10.1038/s41598-017-12262-1.
- Zhang J., Zhang H., Botella J.R., Zhu J.K. Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *Waxy* gene in elite rice varieties. *J. Integr. Plant Biol.* 2018;60(5):369-375. DOI 10.1111/jipb.12620.
- Zhang Y., Bai Y., Wu G., Zou S., Chen Y., Gao C., Tang D. Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J.* 2017;91(4): 714-724. DOI 10.1111/tj.13599.

#### ORCID ID

A.M. Korotkova orcid.org/0000-0003-1540-1491  
S.V. Gerasimova orcid.org/0000-0001-8626-1831  
E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254

**Acknowledgements.** This study was supported by the Russian Science Foundation, project 16-14-00086.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received November 6, 2018. Revised November 28, 2018. Accepted December 24, 2018.

## Прогресс в секвенировании геномов растений – направления исследований

М.К. Брагина<sup>1</sup>, Д.А. Афонников<sup>1, 2</sup>, Е.А. Салина<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

e-mail: koltunova@bionet.nsc.ru

Геномные технологии претерпели значительные изменения с момента публикации первой последовательности генома растения *Arabidopsis thaliana*. Исследователи приняли на вооружение новые алгоритмы и технологии секвенирования и биоинформационные подходы для получения геномной последовательности, транскриптома и экзома для модельных и культурных видов растений, что позволило сделать глубокие выводы о биологии растений. В результате снижения затрат на секвенирование благодаря улучшению методов сборки и анализа геномов, количество и качество секвенированных геномов растений постоянно растет. В течение последних двадцати лет опубликовано более 300 геномных последовательностей растений. Хотя многие из опубликованных геномов считаются неполными, они, тем не менее, оказались ценным инструментом для идентификации генов-кандидатов, участвующих в формировании хозяйственно ценных признаков растений, для проведения работ по маркер-ориентированной и геномной селекции и сравнительного анализа геномов растений с целью установления основных закономерностей происхождения различных видов растений. В связи с тем, что высокого уровня покрытия и разрешения полногеномного секвенирования не хватает для обнаружения всех изменений в сложных образцах, стало развиваться целевое (таргетное) секвенирование, которое заключается в выделении и секвенировании определенной области генома. Основным преимуществом целевого секвенирования являются его высокая мощность обнаружения (способность идентифицировать новые варианты) и более высокое разрешение. Кроме того, активно развивается экзомное секвенирование (метод секвенирования только белок-кодирующих участков генов), позволяющее секвенировать участки генома, которые обогащены функциональными вариантами и демонстрируют низкий уровень содержания повторяющихся областей. В настоящем обзоре проведен анализ развития работ по секвенированию и построению «референсных» геномов растений. Сравняются методы целевого секвенирования, базирующиеся на использовании референсной последовательности ДНК. Ключевые слова: растения; подходы к секвенированию; геном; экзомное секвенирование; целевое секвенирование.

**Для цитирования:** Брагина М.К., Афонников Д.А., Салина Е.А. Прогресс в секвенировании геномов растений – направления исследований. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):38-48. DOI 10.18699/VJ19.459

## Progress in plant genome sequencing: research directions

M.K. Bragina<sup>1</sup>, D.A. Afonnikov<sup>1, 2</sup>, E.A. Salina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

e-mail: koltunova@bionet.nsc.ru

Since the first plant genome of *Arabidopsis thaliana* has been sequenced and published, genome sequencing technologies have undergone significant changes. New algorithms, sequencing technologies and bioinformatic approaches were adopted to obtain genome, transcriptome and exome sequences for model and crop species, which have permitted deep inferences into plant biology. As a result of an improved genome assembly and analysis methods, genome sequencing costs plummeted and the number of high-quality plant genome sequences is constantly growing. Consequently, more than 300 plant genome sequences have been published over the past twenty years. Although many of the published genomes are considered incomplete, they proved to be a valuable tool for identifying genes involved in the formation of economically valuable plant traits, for marker-assisted and genomic selection and for comparative analysis of plant genomes in order to determine the basic patterns of origin of various plant species. Since a high coverage and resolution of a genome sequence is not enough to detect all changes in complex samples, targeted sequencing, which consists in the isolation and sequencing of a specific region of the genome, has begun to develop. Targeted sequencing has a higher detection power (the ability to identify new differences/variants) and resolution (up to one basis). In addition, exome sequencing (the method of sequencing only protein-coding genes regions) is actively developed, which allows for the sequencing of non-expressed alleles and genes that cannot be found with RNA-seq. In this review, an analysis of sequencing technologies development and

the construction of “reference” genomes of plants is performed. A comparison of the methods of targeted sequencing based on the use of the reference DNA sequence is accomplished.

Key words: plants; sequencing approaches; genome; exome sequencing; targeted sequencing.

**For citation:** Bragina M.K., Afonnikov D.A., Salina E.A. Progress in plant genome sequencing: research directions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii*=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):38-48. DOI 10.18699/VJ19.459 (in Russian)

## Введение

В настоящее время эффективные генетические исследования растений уже невозможно представить без этапа расшифровки генома (Varabaschi et al., 2016). Геномные последовательности являются фундаментальной основой для решения таких важных задач, как идентификация генов и генных сетей, обеспечивающих развитие, адаптацию растений к условиям стресса. Определение набора генов – отправная точка для детальной характеристики функций генов, биохимических и регуляторных путей или количественных локусов признаков. Последовательности генов предоставляют ценную информацию о белковых комплексах, регуляторных взаимодействиях и метаболических процессах, которые определяют физиологические и биохимические свойства клетки, органа или организма (Bassel et al., 2012).

Новые технологии селекции растений опираются на информацию о маркерах и ассоциированных с ними количественных признаках, при этом наличие данных о геноме позволяет использовать самый широкий спектр маркеров, включая как повторы (Bai et al., 2017), так и SNP (Strain et al., 2018; Li et al., 2018). Структурно-функциональная разметка геномов помогает существенно облегчить определение молекулярных механизмов, обеспечивающих формирование целевых признаков растений. Информация о полной последовательности генома является ключевой и в случае подбора участков для геномного редактирования и поиска сайтов, имеющих наиболее высокую степень эффективности разрезания ДНК и специфичности по отношению к остальной геномной ДНК (Scheben et al., 2017; Zhu et al., 2017). Еще одной задачей, решение которой зависит от знания геномных последовательностей, является сравнительный анализ геномов растений с целью установить основные закономерности происхождения различных видов растений и сельскохозяйственных культур (Avni et al., 2017).

Со времени определения первого генома растения, *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), благодаря развитию технологий секвенирования и улучшению алгоритмов сборки и анализа геномов количество и качество секвенированных геномов растений постоянно растет. В идеале геномная сборка представляет собой набор последовательностей молекул ДНК всех его хромосом с суммарной длиной, равной размеру гаплоидного генома. Такие модели геномов служат основой для решения огромного числа задач, как связанных с поиском генов, идентификацией маркеров, так и опирающихся на знание детальной структуры генома – сравнительной геномики, идентификации синтенных групп хромосом. Нуклеотидные последовательности, собранные на уровне хромосом, включают, помимо кодирующих, участки, содержащие повторные последовательности и мобильные

элементы. Информация о них позволяет охарактеризовать различные классы повторяющихся элементов, идентифицировать крупномасштабную коллинеарность генов у родственных видов и восстановить организацию и эволюцию мобильных элементов (Bennetzen, Wang, 2014).

Модели геномов на уровне хромосом содержат полный набор генов, необходимый для проверки того, может ли дупликация или потеря биохимических или сигнальных путей у конкретных видов растений объяснить структурные и физиологические адаптации, необходимые для выживания в экстремальных условиях. Полные хромосомные последовательности служат основой («референсным» геномом) для изучения других геномов того же вида с использованием гораздо меньших ресурсов, чем было затрачено на получение референсной последовательности. Однако такие модели геномов в настоящее время доступны лишь для небольшого числа растений, таких как *A. thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), *Brachypodium distachyon* (The International Brachypodium Initiative, 2010), рис (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002), ячмень (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012), кукуруза (Schnable et al., 2009), картофель (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011), мох *Physcomitrella patens* (Rensing et al., 2008), пшеница *T. dicoccoides* (Anvi et al., 2017; Akpinar et al., 2018), *T. aestivum* (International Wheat Genome Sequencing Consortium, 2018), и некоторых других (<http://plants.ensembl.org>).

Несмотря на то что последовательности большинства из опубликованных геномов представлены пока лишь фрагментами ДНК, а информация об их порядке в хромосомах отсутствует, даже такая модель геномной последовательности содержит в себе достаточно информации для идентификации участков, кодирующих гены, подбора маркеров для задач геномной селекции, сравнительного анализа генов, кодирующих белки с гомологичными последовательностями из других видов.

## Стратегии секвенирования геномов

Стратегии секвенирования растительных геномов развивались в зависимости от методов секвенирования и методов фракционирования геномной ДНК. К основным методам секвенирования в порядке их разработки относятся секвенирование по Сэнгеру, высокопроизводительное пиросеквенирование, секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов, циклическое лигазное секвенирование, полупроводниковое секвенирование, одномолекулярное секвенирование, секвенирование через нанопоры. Каждый из этих методов имел или имеет свои преимущества и ограничения, заключающиеся в длине, качестве и стоимости прочтений, которые неоднократно были изложены в различных обзорах (Krasnov et al., 2014; Mardis, 2017;

Shendure et al., 2017). К настоящему времени часть подходов (секвенирование по Сэнгеру, пиросеквенирование) уже утратила свою актуальность в связи с появлением новых, более совершенных и дешевых технологий. К методу фракционирования геномной ДНК можно отнести предварительное клонирование крупных геномов в ВАС-векторах (bacterial artificial chromosome) с последующим секвенированием ВАС-клонов, в том числе собранных в более протяженные контиги методами физического картирования, – так называемое ВАС-by-ВАС секвенирование (Bolger et al., 2014). Стратегией, заключающейся в отказе от предварительного деления геномной ДНК на фракции (отдельные хромосомы или ВАС-клоны) и секвенировании суммарной геномной ДНК, является метод дробовика (whole genome shotgun – WGS). В данном случае с помощью сайт-неспецифичных нуклеаз проводится случайная фрагментация геномной ДНК с созданием библиотек для секвенирования. Стоит отметить, что секвенирование первых растений давало частичную информацию о геномах и не позволяло получить полную референсную последовательность.

Важным этапом не только для исследования растений, но и для геномного секвенирования, стало секвенирование генома модельного растения *A. thaliana* в 2000 г. (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Это был один из первых полученных геномов многоклеточных организмов. Выбранный подход ВАС-by-ВАС основывался на секвенировании по Сэнгеру, сборке и выравнивании последовательностей ВАС-клонов ( $(100-150) \cdot 10^3$  п. н.) в соответствии с физической картой так, чтобы идентичные последовательности перекрывались, а смежные (контиги) собирались в геномную последовательность высокого качества (Feuillet et al., 2011). Однако трудоемкость этого подхода ограничивала его применение для других геномов, и только два года спустя с его помощью был секвенирован геном риса (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002), размер которого примерно в три раза превышает геном *A. thaliana*. Кроме того, в качестве альтернативного подхода к секвенированию больших и полиплоидных геномов, таких как гексаплоидная пшеница, было разработано выделение и секвенирование хромосом и плеч (Doležel et al., 2007; Paux et al., 2008; Hernandez et al., 2012; Mayer et al., 2014). До недавнего времени секвенирование минимального перекрывающегося пути выполнялось с использованием автоматизированного секвенирования по Сэнгеру (Groenen et al., 2012; Howe et al., 2013), хотя платформы секвенирования следующего поколения (NGS) были применены для крупномасштабного секвенирования ВАС-клонов (Zhang et al., 2012; Choulet et al., 2014; Li et al., 2015).

Следующим секвенированным культурным растением стал тополь (Tuskan et al., 2006). С помощью секвенирования методом дробовика (WGS) его ДНК была амплифицирована, случайным образом фрагментирована сайт-неспецифичными нуклеазами для получения перекрывающихся фрагментов, которые затем были секвенированы и собраны. Хотя эта стратегия значительно снижает временные затраты, как правило, в результате получается более фрагментированная последовательность генома. Полногеномное секвенирование методом дробовика так-

же было успешно применено для других растений, в том числе для винограда *Vitis vinifera* (Jaillon et al., 2007), папайи *Carica papaya* (Ming et al., 2008), огурца *Cucumis sativus* (Huang et al., 2009), яблони *Malus × domestica* Borkh. (Velasco et al., 2010), *B. distachyon* (The International Brachypodium Initiative, 2010), сои *Glycine max* (Schmutz et al., 2010) и картофеля *Solanum tuberosum* (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011).

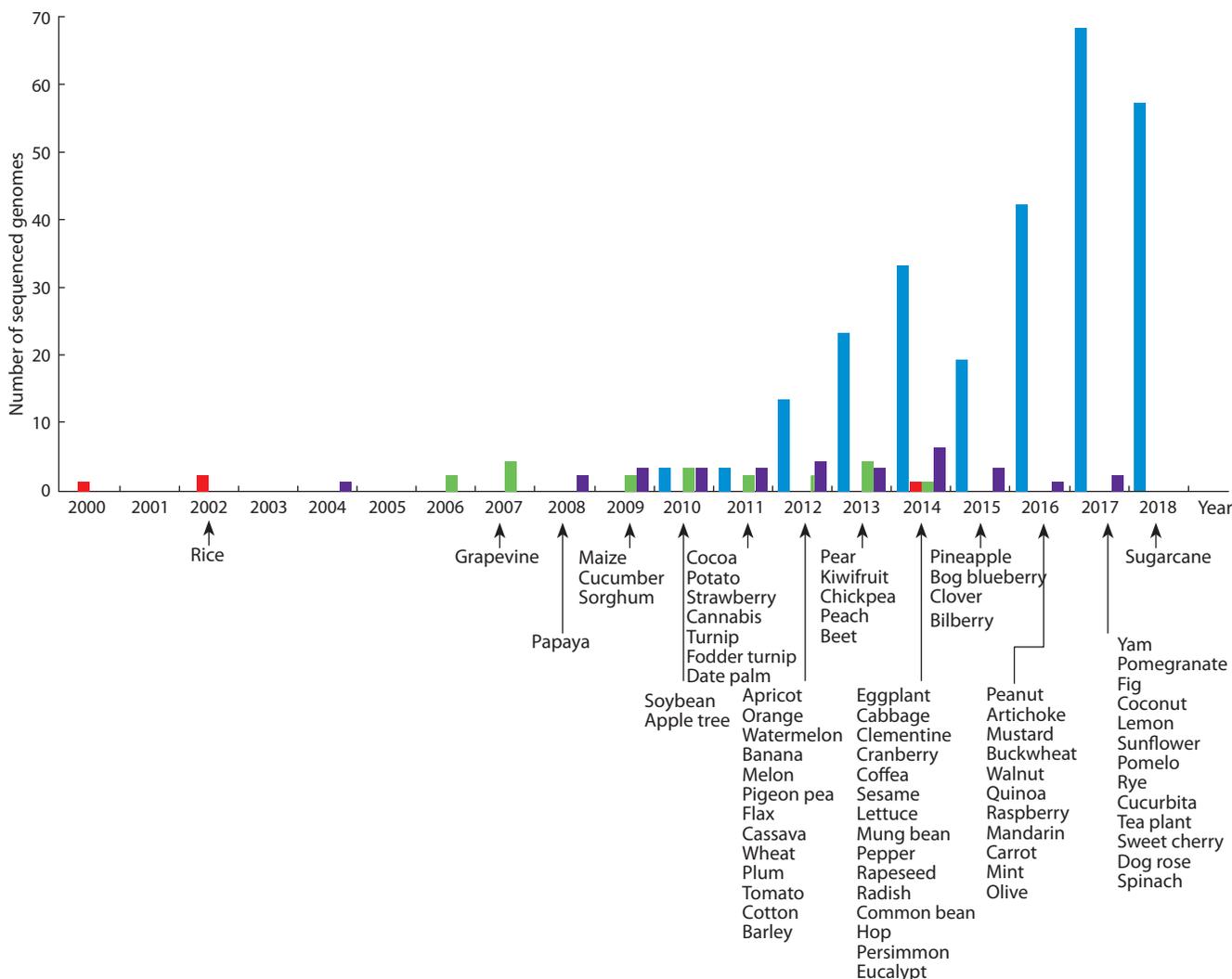
Известно, что большинство геномов растений характеризуются повышенным содержанием повторяющейся ДНК и наличием дубликаций генома из-за событий полиплоидизации. Важно отметить, что все геномные проекты, основанные только на секвенировании по Сэнгеру, были реализованы для растений, геномы которых значительно меньше  $5.8 \cdot 10^9$  п. н. Хотя подходы ВАС-by-ВАС могут снизить сложность генома более чем в 10 тысяч раз, сборка больших геномов оставалась трудоемкой и дорогостоящей. Секвенирование методом дробовика сокращает необходимое время и усилия, однако получение последовательности генома было затратным из-за высокой стоимости секвенирования по Сэнгеру и требовало много времени. Кроме того, оставались несеквенированные области, что обусловлено низким покрытием при секвенировании по Сэнгеру ( $\times 4-7$ ) и техническими проблемами, связанными со вторичной структурой ДНК и гомополимерами.

Стратегия секвенирования методом дробовика была основана на секвенировании по Сэнгеру и применяется до сих пор, однако начиная с 2005 г. все большие обороты стало набирать так называемое секвенирование следующего поколения (next-generation sequencing – NGS). Его применение улучшило соотношение между получаемыми данными и стоимостью секвенирования генома. Технология NGS охватывает широкий круг подходов, в которых идет параллельное секвенирование последовательностей нескольких фрагментов ДНК с получением значительно большего числа секвенированных последовательностей, но, как правило, более короткой длины (25–500 п. н.) и более низкого качества, чем в случае секвенирования по Сэнгеру. Эти подходы реализуются на секвенаторах нового поколения производства коммерческих компаний Illumina, Thermo Fisher Scientific, Pacific Biosciences и Oxford Nanopore Technologies. Часть разработанных платформ уже ушли с рынка (например, GS FLX, 454/Roche, HeliScope/Helicos Bioscience).

NGS применяют как для ресеквенирования (анализа геномов организмов с доступным референсным геномом), так и для секвенирования *de novo*. Для упрощения сборки в случае больших по размеру и сложно устроенных геномов используют комбинированный подход, в котором сочетают платформы, генерирующие как короткие, так и длинные последовательности (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011; Brenchley et al., 2012; The Tomato Genome Consortium, 2012), или сочетание нескольких стратегий секвенирования (см. рисунок).

### Геномные проекты

В результате резкого снижения затрат на секвенирование генома в течение последних двадцати лет было опубликовано 322 геномных последовательности растений



Transition from the formerly applied Sanger method to genome sequencing only by NGS (blue)

Purple: combined sequencing by BAC and WGS; green: shotgun sequencing (WGS); red: Sanger sequencing of BAC clones. Below: examples of sequenced crops.

(по состоянию на июль 2018 г., [www.plabipd.de](http://www.plabipd.de)), из них геномов двудольных растений – 207, однодольных – 68, водорослей – 35, непокрытосеменных растений – 12 (Приложение 1)<sup>1</sup>. До недавнего времени выполнением этих проектов занимались крупные консорциумы по секвенированию генома, объединяя опыт во многих областях. Благодаря эволюции секвенирования следующего поколения постепенно стало возможным проводить целые проекты сборки генома растений силами отдельных лабораторий или небольших консорциумов (Pucker et al., 2016; Jiao et al., 2017). Дальнейшее усовершенствование технологий с длинным прочтением позволит охватывать повторяющиеся районы, что ранее было серьезным препятствием для завершения секвенирования генома (Jiao et al., 2017).

В 2008 г. стартовал проект «1001 Genomes Project» для получения точной геномной последовательности *A. thaliana* на основе секвенирования 1001 образца (<http://1001genomes.org>). Первый этап проекта недавно был завершён

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx2.pdf>

публикацией подробного анализа геномов 1135 инбредных линий, который дал информацию об истории видов и распределении генетического разнообразия (The 1001 Genomes Consortium, 2016).

В 2012 г. была создана международная инициатива для секвенирования транскриптома 1000 различных видов растений – «1КР» (<https://sites.google.com/a/ualberta.ca/onekr/>). Секвенирование проводится на платформе Illumina (GA2 или HiSeq). Растения отбирали таким образом, чтобы предоставить образцы для всех основных линий зеленых растений, включая хвойные деревья, папоротники, мхи, зеленые водоросли и цветковые растения. Следует отметить, что большинство этих видов никогда не подвергались крупномасштабному секвенированию. Например, были секвенированы представители почти всех 415 известных семейств покрытосеменных, а примерно пятую часть секвенированных видов представляют водоросли. Полученные данные являются транскриптомными сборками, предполагаемыми кодирующими последовательностями, ортогруппами, а также филогенетическими деревьями (Matasci et al., 2014).

В 2014 г. опубликована работа о ресеквенировании 3000 образцов риса из 89 стран (<http://iric.igri.org/resources/3000-genomes-project>). Все геномы имели среднюю глубину секвенирования  $\times 14$ , со средними коэффициентами покрытия референсного генома и картирования 94.0 и 92.5 % соответственно. После выравнивания полученных данных с референсным сортом *O. japonica* Nipponbare было обнаружено приблизительно 18.9 миллионов SNP. Филогенетические анализы, основанные на данных SNP, подтвердили дифференциацию генофонда *O. sativa* на пять сортовых групп – *indica*, *aus/boro*, *basmati/sadri*, тропическую *japonica* и умеренную *japonica* (The 3,000 rice genomes project, 2014).

Общая цель Проекта генома паразитических растений (PPGP) (Westwood et al., 2012) заключается в проведении сравнительного функционального геномного анализа паразитических растений для выявления изменений генома, которые привели к установлению паразитического образа жизни. В этом проекте были секвенированы *Lindenbergia philippensis*, *Orobanchaeae* и *Mimulus* – транскрипты паразитических родов от *Orobanchaceae* (*Triphysaria*, *Striga* и *Orobanche*) и двух тесно связанных непаразитов. В настоящее время они секвенированы в независимом проекте (<http://www.mimulusevolution.org>). Эти виды растений эволюционно связаны между собой, но охватывают диапазон паразитарных способностей от свободного существования до полностью гетеротрофного паразита.

В июле 2017 г. китайский гигант секвенирования BGI (Beijing Genomics Institute) и Национальный банк Китая (CNGB) объявили о планах по секвенированию не менее 10000 геномов, представляющих каждую основную ветвь (группу, кладу) растений и эукариотических микробов. План 10КР станет ключевой частью проекта по получению биогенома Земли (Earth BioGenome Project – EBP), амбициозной и все еще развивающейся схемы, позволяющей получить данные о геномных последовательностях 1.5 миллионов эукариотических видов, включая детальные последовательности одного члена из каждого из 9000 эукариотических семейств. План 10КР основывается на предыдущем проекте 1КР; предполагается, что цели исследования будут включать роль дубликации генома, корреляцию между геномными и морфологическими изменениями и изменения темпов эволюции с течением времени.

### Проблемы полногеномного секвенирования

Наиболее широкое применение новых подходов к секвенированию растений заключается в полногеномном секвенировании для получения референсной последовательности и генетической структуры геномов. Большой размер генома, дубликация и повторяющийся контент являются факторами, которые затрудняют получение полноценной информации о структуре генома растений и построении «золотого стандарта» референсной последовательности. Эти проблемы активно преодолеваются как разработкой новых биоинформатических ресурсов и использованием при секвенировании различных платформ, так и привлечением данных РНК-Seq и по экзомному секвенированию, а также привлечением данных по физическому картирова-

нию хромосом (The International Wheat Genome Sequencing Consortium, 2018).

В 2013 г. была опубликована референсная последовательность генома сахарной свеклы (*Beta vulgaris*). В этом исследовании использовалось сочетание 454, Illumina и Sanger платформ для секвенирования. В общей сложности был идентифицирован 27421 белок-кодирующий ген, что подтверждается данными РНК-Seq. На основе внутривидового геномного анализа пяти различных видов сахарной свеклы идентифицировано 7 миллионов геномных вариантов, а также большие консервативные области. Полученный геном сахарной свеклы позволяет обнаружить агрономически важные признаки, которые могут повысить качество и продуктивность растения. Последовательности геномов внесли также вклад в сравнительные исследования с видами Caryophyllales и другими цветковыми растениями (Dohm et al., 2014).

В недавней работе (Nystedt et al., 2013) проведено *de novo* секвенирование норвежской ели (*Picea abies*) методом дробовика с использованием технологии Illumina. Иерархическая стратегия сборки генома была разработана для объединения гаплоидных и диплоидных геномных данных и данных РНК-Seq. Размер генома *P. abies* оценивается в  $19.6 \cdot 10^9$  п. н. Однако только 28354 последовательности, кодирующие белок с высокой степенью достоверности, были предсказаны по данным EST и транскриптомам. Кроме того, предложена модель эволюции генома хвойных пород, которая предполагает, что удаление мобильных элементов у них шло менее активно, чем у большинства других видов растений (Bennetzen et al., 2005), причем вставки мобильных элементов в гены приводят к появлению больших интронов и псевдогенов. Дополнительное секвенирование генома хвойных пород позволит провести сравнительный анализ и предоставит дополнительные ресурсы для понимания эволюции важных признаков у семенных растений.

В 2014 г. был собран референсный геном *Eucalyptus grandis* (Myburg et al., 2014), для чего проведено полногеномное секвенирование по Сэнгеру и парное секвенирование ВАС-концов. Это первый референсный геном, опубликованный для эвдикотов миртоцветных, обеспечивающий ресурс для получения информации о генетической природе больших древесных многолетников.

С использованием подхода Illumina WGS были секвенированы три инбредных сорта *Nicotiana tabacum* (Zhang et al., 2011). Размеры полученных геномов были оценены в  $4.41 \cdot 10^9$  п. н. для *N. tabacum* TN90,  $4.60 \cdot 10^9$  п. н. для *N. tabacum* K326 и  $4.57 \cdot 10^9$  п. н. для *N. tabacum* BX (с покрытием  $\times 49$ ,  $\times 38$  и  $\times 29$  соответственно). Авторы предполагали, что данный проект внесет значительный вклад в функциональные геномные исследования модельного организма *N. tabacum* (Sierra et al., 2014).

Помимо полногеномного секвенирования, проводятся исследования по ресеквенированию, которое используется в основном для профилирования транскриптому и обнаружения SNP для разработки маркеров (Deschamps et al., 2012). Таким образом был получен высококачественный референсный геном картофеля и идентифицировано 3.67 миллиона SNP при сравнении гомозиготной двойной гаплоидной линии с гетерозиготной диплоидной (Xu et

al., 2011). Кроме того, ресеквенированы и сопоставлены друг с другом несколько образцов арбуза. В общей сложности идентифицировано 6 784 860 SNP, представляющих генетическое разнообразие видов сельскохозяйственных культур (Guo et al., 2013).

В 2016 г. была создана компания NRGene, разрабатывающая новейшее программное обеспечение и алгоритмы для секвенирования сложных больших геномов сельскохозяйственных культур, животных и водных организмов. NRGene позволила секвенировать *de novo*  $10.5 \cdot 10^9$  п. н. (98.4 %) геном тетраплоидной пшеницы (Avni et al., 2017),  $4.09 \cdot 10^9$  п. н. (98.6 %) геном диплоидной пшеницы (Luo et al., 2017),  $2.18 \cdot 10^9$  п. н. (98.2 %) референсный геном кукурузы (Springer et al., 2018) и  $0.82 \cdot 10^9$  п. н. (98.4 %) геном томата (Kol, 2016) с использованием платформы Illumina и программного обеспечения DeNovoMAGIC. Также была секвенирована мягкая пшеница, и данные по сборке будут объединены с данными физического картирования для получения высококачественной последовательности каждой хромосомы с точно локализованными генами, регуляторными элементами и маркерами (<https://www.wheatgenome.org>).

### Целевое секвенирование

Переход от секвенирования по Сэнгеру к NGS привел к снижению затрат и увеличению числа секвенированных геномов. Однако полногеномное секвенирование не подходит для большинства исследований. Высокого уровня покрытия и разрешения полногеномного секвенирования не хватает для обнаружения всех изменений в сложных образцах. В связи с этим стало развиваться и продолжает набирать обороты целевое (таргетное) секвенирование, которое заключается в выделении и секвенировании определенной области генома или подмножества генов.

Для растений, которые обладают большим или полиплоидным геномом, существует стратегия уменьшения сложности генома с использованием стратегий целевого обогащения. Целевое секвенирование включает в себя три этапа: отбор интересующей фракции ДНК (обогащение образцов), секвенирование отобранного материала и анализ полученных результатов. Целевое обогащение заключается в выделении специфических локусов генома (например, генов, молекулярных маркеров, больших геномных областей, геномов органелл) в сочетании с секвенированием второго поколения. Обогащение может проводиться с помощью ПЦР, метода молекулярной инверсии, гибридационного обогащения и его улучшенной версии – обогащения в растворе (табл. 1, Приложение 2).

В настоящее время для растений используют гибридационные методы обогащения – на твердой основе (т. е. покровное стекло, микрочип) или в растворе. Наиболее распространенные и надежные в исследованиях растений методы предоставлены компаниями Agilent Technologies (SureSelect), Roche NimbleGen (SeqCap EZ), MYcroarray (MYbaits) и Ion Torrent (TargetSeq) (Terracciano et al., 2016). Плоидность, размер генома и особенности ДНК (GC-состав) изучаемых видов вместе с особенностями зондов (длина зонда, температура гибридизации) могут повлиять на эффективность обогащения. Было показано, что уровень обогащения значительно снижается в про-

морной области, 5'UTR области и в первом экзоне генов из-за высокого содержания GC в этих областях (Dohm et al., 2008). Высокое или низкое содержание GC снижает эффективность ПЦР амплификации и гибридизации зонда (Aird et al., 2011). Эффективность обогащения зависит также от выбранного протокола и от используемой технологии секвенирования (табл. 2).

За последние несколько лет была доказана эффективность целевого обогащения для исследования нуклеотидного разнообразия полиплоидных видов с большим, повторяющимся и гетерозиготным геномом и диплоидных видов с геномной гетерогенностью внутри группы (см. Приложение 2). Так, например, был ресеквенирован участок экзона  $3.5 \cdot 10^6$  п. н. аллотетраплоидной пшеницы для характеристики SNP, вариации числа копий генов и изучения дивергенции гомологичных последовательностей в кодирующих участках (Saintenac et al., 2011). В 2012 г. разработан протокол ресеквенирования и обогащения для изучения  $56.5 \cdot 10^6$  п. н. геномной ДНК восьми сортов мягкой пшеницы, в результате чего идентифицировано около 500 000 новых SNP (Winfield et al., 2012).

Целевое секвенирование позволило уменьшить сложность генома ячменя более чем в 50 раз, для чего было проведено обогащение кодирующих областей, которые включали в себя предсказанные гены из геномной сборки сорта Mogex, находящуюся в открытом доступе полноразмерную кДНК и *de novo* собранную консенсусную последовательность RNA-Seq (Mascher et al., 2013).

Разработаны методики анализа целевых геномных областей, связанных с агрономически важными признаками, для выявления разнообразия ДНК-последовательностей кукурузы (Muraya et al., 2015), рапса (Clarke et al., 2013; Schiessl et al., 2014), хлопка (Salmon et al., 2012) и маниоки (Pootakham et al., 2014). Кроме того, целевое обогащение последовательностей и повторное секвенирование проведены для нескольких видов деревьев, а именно ладанной сосны, черного тополя и эвкалипта, с целью выявления полиморфизмов для построения генетической карты (Neves et al., 2013, 2014), генотипирования (Zhou et al., 2012), а также разработки маркеров, ассоциированных с ксилогенезом (Dasgupta et al., 2015).

Картирование с помощью секвенирования, которое сочетает в себе генетическое картирование с целевым ресеквенированием, было использовано для определения полиморфизмов потенциальных генов ячменя (Pankin et al., 2014), земляники (Tennessen et al., 2013) и *T. monocosmum* (Gardiner et al., 2014).

Даже геномы хлоропластов были подвергнуты целевому обогащению и массовому параллельному секвенированию (Stull et al., 2013). Был сконструирован набор РНК-зондов на основе полных последовательностей ДНК 22 ранее секвенированных хлоропластов эвдикотов. С помощью этого набора зондов проведено обогащение 24 покрытосеменных растений (22 эвдикота, 2 однодольных) с их последующим секвенированием для получения полных геномов пластид с исключительно высоким уровнем покрытия (717 в среднем).

В 2013 г. вышла работа по идентификации вариантов геномных последовательностей у 84 сортов картофеля (Uitdewilligen et al., 2013). И для томата, и для картофеля

**Table 1.** The most important features of the commercially available target enrichment kits (according to Terracciano et al., 2016)

Parameter	Enrichment by hybridization					
	on a solid support (microarray)		in-solution			
	NimbleGen Sequence Capture Array	Agilent Microarray	NimbleGen SeqCap EZ	Agilent SureSelect	MYcroarray MYbait	IonTorrent Target Seq
Bait type	DNA	DNA	DNA	RNA	RNA	DNA
Bait length, bp	60	60	55–105	114–126	80–120	50–120
Target size	До 30 Mb	?	Up to 200 Mb	1 kb to 24 Mb	Up to 200000 baits	100 kb to 10 Mb

**Table 2.** Comparison of target-enrichment methods

Parameter	PCR	MIP	Enrichment by hybridization	
			on a solid support (microarray)	in-solution
Cost	High	High (<10 samples) Low (>100 samples)	Medium	Medium (<10 samples) Low (>10 samples)
Ease of use	Low	High	Medium	High
DNA mass	~8 µg for 1 Mb	200 ngg	10–15 µg for up 30 Mb	3 µg for up to 30 Mb
Sensitivity <sup>1</sup>	>99.5 %	>98 %, with stringent design constraints	98.6 % of CTR <sup>5</sup>	>99.5 % of CTR <sup>5</sup>
Specificity <sup>2</sup>	93 % for HapMap DNA samples, 72% for whole genome–amplified samples	>98 %	Up to 70 % mapping to CTR for exons; higher for contiguous regions	Up to 80 % mapping to CTR for exons; higher for contiguous regions
Uniformity <sup>3</sup>	80 % of bases within twofold range of median	58 % of CTR within tenfold coverage range; 88 % within 100-fold coverage range	60 % of CTR within 0.5–1.5-fold of mean coverage (mapping quality 30) <sup>6</sup>	61 % of CTR within 0.5–1.5-fold of mean coverage (mapping quality 30) <sup>6</sup>
Reproducibility <sup>4</sup>	Up to 100 %	Up to 92 %	>95 %	>96 %

<sup>1</sup> Sensitivity: the percentage of the target bases that are represented by one or more sequence reads; <sup>2</sup> Specificity: the percentage of sequences that map to the intended targets; <sup>3</sup> Uniformity: the variability in sequence coverage across target regions; <sup>4</sup> Reproducibility: how closely the results obtained from replicate experiments correlate; <sup>5</sup> CTR, capture target region; <sup>6</sup> Mapping qualities were calculated with MAQ mapping software (<http://maq.sourceforge.net>). They indicate the probability that the mapping location is correct. A score of 30 or greater indicates that the quality of a read was good, and that it mapped unambiguously to that location with few mismatches.

использовалось обогащение и секвенирование генов устойчивости NB-LRR, направленное на обнаружение и аннотирование новых генов (Jupe et al., 2013; Andolfo et al., 2014).

Преимущество целевого секвенирования заключается в возможности определения последовательности в конкретной области с гораздо более высоким уровнем покрытия по сравнению с полногеномным секвенированием или секвенированием по Сэнгеру. Полногеномное секвенирование обычно дает покрытие  $\times 30$ – $75$  раз, в то время как целевое позволяет секвенировать с покрытием  $\times 5000$  или выше. Целевое секвенирование – это быстрый и экономичный способ обнаружения известных и новых вариантов в выбранных наборах генов или геномных областях.

### Экзомное секвенирование

Экзомное секвенирование – это метод секвенирования только белок-кодирующих участков генов с помощью одной из платформ следующего поколения – Illumina,

SOLID, IonTorrent, PacBio (см. Приложение 2). Экзом составляет 1–2 % генома в зависимости от вида и может быть расширен до целевых функциональных некодирующих элементов (например, микроРНК, длинной некодирующей РНК и др.) и определенных локусов-кандидатов (Warr et al., 2015). Секвенирование экзона включает в себя идентификацию генов (целый экзом, определенный класс генов), дизайн праймеров или чипа для обогащения образцов и секвенирование полученной библиотеки. Экзомное секвенирование позволяет секвенировать неэкспрессирующиеся аллели и гены, которые не могут быть найдены с помощью РНК-seq. Однако подходы экзомного секвенирования основаны на существовании высококачественных референсных геномных последовательностей с точной аннотацией. Некачественная аннотация геномов может привести к потере данных.

Экзомное секвенирование обычно применяется для идентификации мутаций в белок-кодирующих генах (Schneeberger, 2014). В недавнем исследовании (Henry et al., 2014) для выявления мутаций в популяциях мутантов

риса (*O. sativa*) и пшеницы (*T. aestivum*) было использовано секвенирование экзома ( $42 \cdot 10^6$  и  $107 \cdot 10^6$  п. н. соответственно). Этот метод обеспечил обнаружение мутаций, позволил быстро и недорого создать базу данных полиморфизмов. Обнаружение SNP и SNV с помощью упомянутого метода было проведено и в другой работе, посвященной просу *P. virgatum* (Evans et al., 2014), где выявлено в общей сложности 1 395 501 SNP и 8 173 предполагаемых SNV. В аналогичном эксперименте на гексаплоидной пшенице был разработан 10251 SNP-маркер с применением целевого ресеквенирования пшеничного экзома для получения большого количества геномных данных для восьми сортов. Полученные SNP-маркеры обеспечили значимый источник информации, особенно для селекционных исследований (Allen et al., 2013). Секвенирование экзома ячменя использовалось для идентификации маркеров *H. vulgare* L. и *H. bulbosum* L. – дикого вида, который обладает лучшей устойчивостью к патогенам по сравнению с домашними видами (Wendler et al., 2014). Таким образом, экзомное секвенирование может применяться для изучения геномных вариаций у полиплоидных видов с большими, повторяющимися и гетерозиготными геномами.

Экзомное секвенирование сои позволило обнаружить делеции в генах и провести генетическое скринирование на основе фенома на полногеномном уровне (Bolon et al., 2011).

Секвенирование экзома оказалось важным инструментом для оценки естественной эволюции растений, изучения взаимодействия патогенов хозяина и улучшения производства сельскохозяйственных культур, поскольку экзомы помогают интерпретировать аллельные вариации генов и их влияние на фенотип. Метод можно использовать для разработки стратегий борьбы с патогеном, что было реализовано для идентификации генов, участвующих в растительно-грибных взаимодействиях (O'Brien et al., 2011; Venu et al., 2011).

Кроме того, секвенирование экзома может быть использовано для восстановления таксономических связей и идентификации генов, участвующих в эволюции сельскохозяйственных культур. Так, в 2016 г. были секвенированы экзомы 267 сортов ячменя с целью изучения изменений генов адаптации растения к разным географическим условиям (Russell et al., 2016).

## Заключение

В последние годы были секвенированы многие из основных культурных растений, хотя и с разным качеством и полнотой прочтения. Эти геномные последовательности обеспечивают беспрецедентный ресурс, который может быть использован различными способами. Одно из основных направлений применения секвенированных геномов культурных растений заключается в насыщении всех участков генома молекулярными маркерами с последующим их вовлечением в картирование, идентификацию и анализ генов-кандидатов, определяющих агрономически важные признаки, в проведение работ по маркер-ориентированной и геномной селекции.

Секвенирование последовательности генома, даже на текущих уровнях покрытия, способствовало существен-

ному увеличению работ, направленных на идентификацию генов-кандидатов, участвующих в формировании морфологических и хозяйственно ценных признаков растений; значительно расширило пул маркеров, вовлеченных в геномную и маркер-ориентированную селекцию. Подходы по целевому и экзомному секвенированию существенно расширили возможности идентификации генов, оценки их полиморфизма и вклада в формирование фенотипа. Трудности, с которыми столкнулись исследователи при сборке больших геномов растений, полиплоидных геномов, районов с высоким содержанием GC и гомополимеров, районов, насыщенных транспозиционными элементами и другими фракциями повторяющейся ДНК, успешно преодолевались благодаря активному развитию биоинформационных подходов и методов секвенирования.

## Список литературы / References

- Aird D., Ross M.G., Chen W.-S., Danielsson M., Fennell T., Russ C., Gnirke A. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol.* 2011;12(2):R18. DOI 10.1186/gb-2011-12-2-r18.
- Akpınar B.A., Biyiklioglu S., Alptekin B., Havránková M., Vrána J., Doležel J., Distelfeld A., Hernandez P., the IWGSC, Budak H. Chromosome-based survey sequencing reveals the genome organization of wild wheat progenitor *Triticum dicoccoides*. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16:2077-2087. DOI 10.1111/pbi.12940.
- Allen A.M., Barker G.L., Wilkinson P., BurrIDGE A., Winfield M., Coghill J., Uauy C., Griffiths S., Jack P., Berry S., Werner P., Melichar J.P., McDougall J., Gwilliam R., Robinson P., Edwards K.J. Discovery and development of exome-based, co-dominant single nucleotide polymorphism markers in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol. J.* 2013;11:279-295. DOI 10.1111/pbi.12009.
- Andolfo G., Jupe F., Witek K., Etherington G.J., Ercolano M.R., Jones J.D.G. Defining the full tomato NB-LRR resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq. *BMC Plant Biol.* 2014; 14(1):120. DOI 10.1186/1471-2229-14-120.
- Avni R., Nave M., Barad O., Baruch K., Twardziok S.O., Gundlach H., Distelfeld A. Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Science.* 2017;357(6346): 93-97. DOI 10.1126/science.aan0032.
- Bai B., Wang L., Lee M., Zhang Y., Rahmadsyah, Alfiko Y., Ye B.Q., Wan Z.Y., Lim C.H., Suwanto A., Chua N.-H., Yue G.H. Genome-wide identification of markers for selecting higher oil content in oil palm. *BMC Plant Biol.* 2017;17(1):93. DOI 10.1186/s12870-017-1045-z.
- Barabaschi D., Tondelli A., Desiderio F., Volante A., Vaccino P., Valè G., Cattivelli L. Next generation breeding. *Plant Sci.* 2016;242:3-13. DOI 10.1016/j.plantsci.2015.07.010.
- Bassel G.W., Gaudinier A., Brady S.M., Hennig L., Rhee S.Y., De Smet I. Systems analysis of plant functional, transcriptional, physical interaction, and metabolic networks. *Plant Cell.* 2012;24(10):3859-3875. DOI 10.1105/tpc.112.100776.
- Bennetzen J., Ma J., Devos K. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann. Bot.* 2005;95(1):127-132. DOI 10.1093/aob/mci008.
- Bennetzen J.L., Wang H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014;65(1):505-530. DOI 10.1146/annurev-arplant-050213-035811.
- Bolger M., Weisshaar B., Scholz U., Stein N., Usadel B., Mayer K. Plant genome sequencing – applications for crop improvement. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014;26:31-37. DOI 10.1016/j.copbio.2013.08.019.
- Bolon Y.-T., Haun W.J., Xu W.W., Grant D., Stacey M.G., Nelson R.T., Gerhardt D.J., Jeddloh J.A., Stacey G., Muehlbauer G.J., Orf J.H.,

- Naeve S.L., Stupar R.M., Vance C.P. Phenotypic and genomic analyses of a fast neutron mutant population resource in soybean. *Plant Physiol.* 2011;156:240-253. DOI 10.1104/pp.110.170811.
- Brenchley R., Spannagl M., Pfeifer M., Barker G.L.A., D'Amore R., Allen A.M., McKenzie N., Kramer M., Kerhornou A., Bolser D., Kay S., Waite D., Trick M., Bancroft I., Gu Y., Huo N., Luo M.-C., Sehgal S., Gill B., Kianian S., Anderson O., Kersey P., Dvorak J., McCombie W.R., Hall A., Mayer K.F.X., Edwards K.J., Bevan M.W., Hall N. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature.* 2012;491:705-710. DOI 10.1038/nature11650.
- Choulet F., Alberti A., Theil S., Glover N., Barbe V., Daron J., Pingault L., Sourdille P., Couloux A., Paux E., Leroy P., Mangenot S., Guilhot N., Le Gouis J., Balfourier F., Alaux M., Jamilloux V., Poulain J., Durand C., Bellec A., Gaspin C., Safar J., Dolezel J., Rogers J., Vandepoele K., Aury J.-M., Mayer K., Berges H., Quesneville H., Wincker P., Feuillet C. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science.* 2014;345(6194):1249721. DOI 10.1126/science.1249721.
- Clarke W.E., Parkin I.A., Gajardo H.A., Gerhardt D.J., Higgins E. Genomic DNA enrichment using sequence capture microarrays: a novel approach to discover sequence nucleotide polymorphisms (SNP) in *Brassica napus* L. *PLoS One.* 2013;8(12):e81992. DOI 10.1371/journal.pone.0081992.
- Crain J., Mondal S., Rutkoski J., Singh R.P., Poland J. Combining high-throughput phenotyping and genomic information to increase prediction and selection accuracy in wheat breeding. *Plant Genome.* 2018;11(1). DOI 10.3835/plantgenome2017.05.0043.
- Dasgupta M.G., Dharanishanthi V., Agarwal I., Krutovsky K.V. Development of genetic markers in *Eucalyptus* species by target enrichment and exome sequencing. *PLoS One.* 2015;10(1):e0116528. DOI 10.1371/journal.pone.0116528.
- Deschamps S., Llaca V., May G.D. Genotyping-by-sequencing in plants. *Biology.* 2012;1(3):460-483. DOI 10.3390/biology1030460.
- Dohm J.C., Lottaz C., Borodina T., Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(16):e105. DOI 10.1093/nar/gkn425.
- Dohm J.C., Minoche A.E., Holtgräwe D., Capella-Gutiérrez S., Zakrzewski F., Tafer H., Rupp O., Sørensen T.R., Stracke R., Reinhardt R., Goesmann A., Kraft T., Schulz B., Stadler P.F., Schmidt T., Gabaldon T., Lehrach H., Weisshaar B., Himmelbauer H. The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature.* 2014;505(7484):546-549. DOI 10.1038/nature12817.
- Doležel J., Kubaláková M., Paux E., Bartoš J., Feuillet C. Chromosome-based genomics in the cereals. *Chromosome Res.* 2007;15(1):51-66. DOI 10.1007/s10577-006-1106-x.
- Evans J., Kim J., Childs K.L., Vaillancourt B., Crisovan E., Nandety A., Gerhardt D.J., Richmond T.A., Jeddalo J.A., Kaeppler S.M., Casler M.D., Buell C.R. Nucleotide polymorphism and copy number variant detection using exome capture and next-generation sequencing in the polyploid grass *Panicum virgatum*. *Plant J.* 2014;79(6):993-1008. DOI 10.1111/tpj.12601.
- Feuillet C., Leach J.E., Rogers J., Schnable P.S., Eversole K. Crop genome sequencing: lessons and rationales. *Trends Plant Sci.* 2011;16(2):77-88. DOI 10.1016/j.tplants.2010.10.005.
- Gardiner L.J., Gawroński P., Olohan L., Schnurbusch T., Hall N., Hall A. Using genic sequence capture in combination with a syntenic pseudo genome to map a deletion mutant in a wheat species. *Plant J.* 2014;80(5):895-904. DOI 10.1111/tpj.12660.
- Goff S.A., Ricke D., Lan T.-H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., ... Macalma T., Oliphant A., Briggs S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science.* 2002;296(5565):92-100. DOI 10.1126/science.1068275.
- Groenen M., Archibald A.L., Uenishi H., Tuggle C.K., Takeuchi Y., ... Rogers J., Churcher C., Schook L.B. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature.* 2012;491:393-398. DOI 10.1038/nature11622.
- Guo S., Zhang J., Sun H., Salse J., Lucas W.J., Zhang H., ... Li Y., Fei Z., Xu Y. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nat. Genet.* 2013;45(1):51-58. DOI 10.1038/ng.2470.
- Henry I.M., Nagalakshmi U., Lieberman M.C., Ngo K.J., Krasileva K.V., Vasquez-Gross H., Akhunova A., Akhunov E., Dubcovsky J., Tai T.H., Comai L. Efficient genome-wide detection and cataloging of EMS-induced mutations using exome capture and next-generation sequencing. *Plant Cell.* 2014;26:1382-1397. DOI 10.1105/tpc.113.121590.
- Hernandez P., Martis M., Dorado G., Pfeifer M., Gálvez S., Schaaf S., Jouve N., Šimková H., Valárik M., Doležel J., Mayer K.F. Next-generation sequencing and syntenic integration of flow-sorted arms of wheat chromosome 4A exposes the chromosome structure and gene content. *Plant J.* 2012;69(3):377-386. DOI 10.1111/j.1365-313X.2011.04808.x.
- Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., ... Crollius H.R., Rogers J., Stemple D. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013;496:498-503. DOI 10.1038/nature12111.
- Huang S., Li R., Zhang Z., Li L., Gu X., Fan W., ... Wang J., Du Y., Li S. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat. Genet.* 2009;41:1275-1281. DOI 10.1038/ng.475.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science.* 2018;361(6403):eaar7191. DOI 10.1126/science.aar7191.
- Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., ... Weissenbach J., Quétier F., Wincker P. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature.* 2007;449(7161):463-467. DOI 10.1038/nature06148.
- Jiao Y., Peluso P., Shi J., Liang T., Stitzer M.C., Wang B., Campbell M.S., ... Hastie A., Rank D.R., Ware D. Improved maize reference genome with single-molecule technologies. *Nature.* 2017;546:524-527. DOI 10.1038/nature22971.
- Jupe F., Witek K., Verweij W., Sliwka J., Pritchard L., Etherington G.J., Maclean D., Cock P.J., Leggett R.M., Bryan G.J., Cardle L., Hein I., Jones J.D. Resistance gene enrichment sequencing (RenSeq) enables reannotation of the NB-LRR gene family from sequenced plant genomes and rapid mapping of resistance loci in segregating populations. *Plant J.* 2013;76(3):530-544. DOI 10.1111/tpj.12307.
- Kol G. The next revolution in genomics: exploring complex genome assembly to pan-genome interconnection. *Proc. of the Plant & Animal Genome Conference XXIV.* 2016;W3289.
- Krasnov Y.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Cherkasov A.V. Modern methods of DNA sequencing (scientific review). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2014;2:73-79. DOI 10.21055/0370-1069-2014-2-73-79. (in Russian)
- Li F., Fan G., Lu C., Xiao G., Zou C., Kohel R.J., Ma Z., ... Yu J.Z., Zhu Y., Yu S. Genome sequence of cultivated Upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. *Nat. Biotechnol.* 2015;33:524-530. DOI 10.1038/nbt.3208.
- Li Y., Ruperao P., Batley J., Edwards D., Khan T., Colmer T.D., Pang J., Siddique K.H.M., Sutton T. Investigating drought tolerance in chickpea using genome-wide association mapping and genomic selection based on whole-genome resequencing data. *Front. Plant Sci.* 2018;9:190. DOI 10.3389/fpls.2018.00190.
- Luo M.-C., Gu Y.Q., Puiu D., Wang H., Twardziok S.O., Deal K.R., Huo N., ... Salzberg S.L., Devos K.M., Dvořák J. Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. *Nature.* 2017;551:498-502. DOI 10.1038/nature24486.
- Mardis E.R. DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nat. Protoc.* 2017;12(2):213-218. DOI 10.1038/nprot.2016.182.
- Mascher M., Richmond T.A., Gerhardt D.J., Himmelbach A., Clissold L., Sampath D., Ayling S., Steuernagel B., Pfeifer M., D'Ascenzo M., Akhunov E.D., Hedley P.E., Gonzales A.M., Mor-

- rell P.L., Kilian B., Blattner F.R., Scholz U., Mayer K.F.X., Flavell A.J., Muehlbauer G.J., Waugh R., Jeddelloh J.A., Stein N. Barley whole exome capture: a tool for genomic research in the genus *Hordeum* and beyond. *Plant J.* 2013;76(3):494-505. DOI 10.1111/tbj.12294.
- Matasci N., Hung L.-H., Yan Z., Carpenter E.J., Wickett N.J., Mirarab S., Nguyen N., ... Wang J., Leebens-Mack J., Wong G.K.-S. Data access for the 1,000 plants (1KP) project. *GigaScience.* 2014; 3(1):17. DOI 10.1186/2047-217X-3-17.
- Mayer K.F.X., Rogers J., Doležel J., Pozniak C., Eversole K., Feuillet C., Gill B., ... Loaec M., Keller B., Praud S. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Nature.* 2014;345(6194):1251788. DOI 10.1126/science.1251788.
- Ming R., Hou S., Feng Y., Yu Q., Dionne-Laporte A., Saw J.H., Senin P., ... Gonsalves D., Wang L., Alam M. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature.* 2008;452:991-996. DOI 10.1038/nature06856.
- Muraya M.M., Schmutz T., Ulpinnis C., Scholz U., Altmann T. Targeted sequencing reveals large-scale sequence polymorphism in maize candidate genes for biomass production and composition. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132120. DOI 10.1371/journal.pone.0132120.
- Myburg A.A., Grattapaglia D., Tuskan G.A., Hellsten U., Hayes R.D., Grimwood J., Jenkins J., ... Van de Peer Y., Rokhsar D.S., Schmutz J. The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature.* 2014;510(7505):356-362. DOI 10.1038/nature13308.
- Neves L.G., Davis J.M., Barbazuk W.B., Kirst M. Whole-exome targeted sequencing of the uncharacterized pine genome. *Plant J.* 2013; 75:146-156. DOI 10.1111/tbj.12193.
- Neves L.G., Davis J.M., Barbazuk W.B., Kirst M. A high-density gene map of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) based on exome sequence capture genotyping. *G3: Genes Genomes Genetics.* 2014;4(1):29-37. DOI 10.1534/g3.113.008714.
- Nystedt B., Street N.R., Wetterbom A., Zuccolo A., Lin Y.-C., Scofield D.G., Vezzi F., ... Ingvarsson P.K., Lundeberg J., Jansson S. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature.* 2013;497(7451):579-584. DOI 10.1038/nature12211.
- O'Brien H.E., Thakur S., Guttman D.S. Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: A genomics perspective. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011;49(1):269-289. DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095242.
- Pankin A., Campoli C., Dong X., Kilian B., Sharma R., Himmelbach A., Saini R., Davis S.J., Stein N., Schneeberger K., von Korff M. Mapping-by-sequencing identifies *HvPHYTOCHROME C* as a candidate gene for the *early maturity 5* locus modulating the circadian clock and photoperiodic flowering in barley. *Genetics.* 2014;198(1):383-396. DOI 10.1534/genetics.114.165613.
- Paux E., Sourdille P., Salse J., Saintenac C., Choulet F., Leroy P., Korol A., Michalak M., Kianian S., Spielmeier W., Lagudah E., Somers D., Kilian A., Alaux M., Vautrin S., Bergès H., Eversole K., Appels R., Safar J., Simkova H., Dolezel J., Bernard M., Feuillet C. A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science.* 2008;322(5898):101-104. DOI 10.1126/science.1161847.
- Pootakham W., Shearman J.R., Ruang-areerate P., Sonthirod C., Sangsrakru D., Jomchai N., Yoocha T., Triwitayakorn K., Tragooonrun S., Tangphatsornruang S. Large-scale SNP discovery through RNA sequencing and SNP genotyping by targeted enrichment sequencing in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *PLoS One.* 2014; 9(12):e116028. DOI 10.1371/journal.pone.0116028.
- Pucker B., Holtgräwe D., Rosleff Sörensen T., Stracke R., Viehöver P., Weisshaar B. A *de novo* genome sequence assembly of the *Arabidopsis thaliana* accession Niederzenz-1 displays presence/absence variation and strong synteny. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164321. DOI 10.1371/journal.pone.0164321.
- Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., ... Grigoriev I.V., Quatrano R.S., Boore J.L. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science.* 2008;319(5859):64-69. DOI 10.1126/science.1150646.
- Russell J., Mascher M., Dawson I.K., Kyriakidis S., Calixto C., Freund F., Bayer M., ... Muehlbauer G.J., Stein N., Waugh R. Exome sequencing of geographically diverse barley landraces and wild relatives gives insights into environmental adaptation. *Nat. Genet.* 2016;48(9):1024-1030. DOI 10.1038/ng.3612.
- Saintenac C., Jiang D., Akhunov E.D. Targeted analysis of nucleotide and copy number variation by exon capture in allotetraploid wheat genome. *Genome Biol.* 2011;12(9):R88. DOI 10.1186/gb-2011-12-9-r88.
- Salmon A., Udall J., Jeddelloh J., Wendel J. Targeted capture of homoeologous coding and noncoding sequence in polyploid cotton. *G3: Genes Genomes Genetics.* 2012;2(8):921-930. DOI 10.1534/g3.112.003392.
- Scheben A., Wolter F., Batley J., Puchta H., Edwards D. Towards CRISPR/Cas crops – bringing together genomics and genome editing. *New Phytologist.* 2017;216(3):682-698. DOI 10.1111/nph.14702.
- Schiessl S., Samans B., Hüttel B., Reinhard R., Snowden R.J. Capturing sequence variation among flowering-time regulatory gene homologs in the allopolyploid crop species *Brassica napus*. *Front. Plant Sci.* 2014;5:404. DOI 10.3389/fpls.2014.00404.
- Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D.L., ... Stacey G., Shoemaker R.C., Jackson S.A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature.* 2010;463:178-183. DOI 10.1038/nature08670.
- Schnable P.S., Ware D., Fulton R.S., Stein J.C., Wei F., Pasternak S., Liang C., ... McCombie W.R., Wing R.A., Wilson R.K. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science.* 2009; 326(5956):1112-1115. DOI 10.1126/science.1178534.
- Schneeberger K. Using next-generation sequencing to isolate mutant genes from forward genetic screens. *Nat. Rev. Genet.* 2014; 15(10):662-676. DOI 10.1038/nrg3745.
- Shendure J., Balasubramanian S., Church G.M., Gilbert W., Rogers J., Schloss J.A., Waterston R.H. DNA sequencing at 40: Past, present and future. *Nature.* 2017;550(7676):345-353. DOI 10.1038/nature24286.
- Sierro N., Battey J.N.D., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willig A., Goepfert S., Peitsch M.C., Ivanov N.V. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat. Commun.* 2014;5(1):3833. DOI 10.1038/ncomms4833.
- Springer N.M., Anderson S.N., Andorf C.M., Ahern K.R., Bai F., Barad O., Barbazuk W.B., ... Woodhouse M.R., Xiong W., Brutnell T.P. The maize W22 genome provides a foundation for functional genomics and transposon biology. *Nat. Genet.* 2018;50(9):1282-1288. DOI 10.1038/s41588-018-0158-0.
- Stull G.W., Moore M.J., Mandala V.S., Douglas N.A., Kates H.-R., Qi X., Brockington S.F., Soltis P.S., Soltis D.E., Gitzendanner M.A. A targeted enrichment strategy for massively parallel sequencing of angiosperm plastid genomes. *Appl. Plant Sci.* 2013;1(2):1200497. DOI 10.3732/apps.1200497.
- Tennessen J.A., Govindarajulu R., Liston A., Ashman T.-L. Targeted sequence capture provides insight into genome structure and genetics of male sterility in a gynodioecious diploid strawberry, *Fragaria vesca* ssp. *bracteata* (Rosaceae). *G3: Genes Genomes Genetics.* 2013;3:1341-1351. DOI 10.1534/g3.113.006288.
- Terracciano I., Cantarella C., D'Agostino N. Hybridization-Based Enrichment and Next Generation Sequencing to Explore Genetic Diversity in Plants. In: Rogato A., Zazzu V., Guarracino M. (Eds.). *Dynamics of Mathematical Models in Biology.* Springer, Cham., 2016. DOI 10.1007/978-3-319-45723-9\_10.
- The 1001 Genomes Consortium. 1,135 genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell.* 2016;166(2):481-491. DOI 10.1016/j.cell.2016.05.063.
- The 3,000 rice genomes project. The 3,000 Rice Genomes Project. *GigaScience.* 2014;3(1):7. DOI 10.1186/2047-217X-3-7.

- The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2000;408:796-815. DOI 10.1038/35048692.
- The International Barley Genome Sequencing Consortium. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*. 2012;491(7426):711-716. DOI 10.1038/nature11543.
- The International Brachypodium Initiative. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*. 2010;463(7282):763-768. DOI 10.1038/nature08747.
- The Potato Genome Sequencing Consortium. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*. 2011;475:189-195. DOI 10.1038/nature10158.
- The Tomato Genome Consortium. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*. 2012;485:635-641. DOI 10.1038/nature11119.
- Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., ... Sandberg G., Van de Peer Y., Rokhsar D. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*. 2006;313(5793):1596-1604. DOI 10.1126/science.1128691.
- Uitdewilligen J.G.A.M.L., Wolters A.-M.A., D'hoop B.B., Borm T.J.A., Visser R.G.F., van Eck H.J. A next-generation sequencing method for genotyping-by-sequencing of highly heterozygous autotetraploid potato. *PLoS One*. 2013;8(5):e62355. DOI 10.1371/journal.pone.0062355.
- Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J., Dhingra A., Cestaro A., Kalyanaraman A., Fontana P., ... Van de Peer Y., Salamini F., Viola R. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nat. Genet*. 2010;42:833-839. DOI 10.1038/ng.654.
- Venu R.C., Zhang Y., Weaver B., Carswell P., Mitchell T.K., Meyers B.C., Boehm M.J., Wang G.-L. Large Scale Identification of Genes Involved in Plant-Fungal Interactions Using Illumina's Sequencing-by-Synthesis Technology. In: Xu J.-R., Bluhm B.H. (Eds.). *Fungal Genomics: Methods and Protocols*. Springer, 2011;167-178. DOI 10.1007/978-1-61779-040-9\_12.
- Warr A., Robert C., Hume D., Archibald A., Deeb N., Watson M. Exome sequencing: Current and future perspectives. *G3: Genes Genomes Genetics*. 2013;5(8):1543-1550. DOI 10.1534/g3.115.018564.
- Wendler N., Mascher M., Nöh C., Himmelbach A., Scholz U., Ruge-Wehling B., Stein N. Unlocking the secondary gene-pool of barley with next-generation sequencing. *Plant Biotechnol. J*. 2014;12:1122-1131. DOI 10.1111/pbi.12219.
- Westwood J.H., dePamphilis C.W., Das M., Fernández-Aparicio M., Honaas L.A., Timko M.P., Wafula E.K., Wickett N.J., Yoder J.I. The Parasitic Plant Genome Project: New tools for understanding the biology of *Orobanche* and *Striga*. *Weed Sci*. 2012;60(02):295-306. DOI 10.1614/WS-D-11-00113.1.
- Winfield M.O., Wilkinson P.A., Allen A.M., Barker G.L., Coghill J.A., Burrige A., Hall A., Brenchley R.C., D'Amore R., Hall N., Bevan M.W., Richmond T., Gerhardt D.J., Jeddeloh J.A., Edwards K.J. *Plant Biotechnol. J*. 2012;10(6):733-742. DOI 10.1111/j.1467-7652.2012.00713.x.
- Xu X., Pan S., Cheng S., Zhang B., Mu D., Ni P., Zhang G., ... Goverse A., van Ham R.C.H.J., Visser R.G.F. (The Potato Genome Sequencing Consortium). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*. 2011;475(7355):189-195. DOI 10.1038/nature10158.
- Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K.-S., Li S., Liu B., Deng Y., ... Zhu L., Yuan L., Yang H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*. 2002;296(5565):79-92. DOI 10.1126/science.1068037.
- Zhang H., Scheuring C., Zhang M., Zhang Y., Wu C., Dong J., Li Y. Construction of BIBAC and BAC libraries from a variety of organisms for advanced genomics research. *Nat. Protoc*. 2012;7(3):479-499. DOI 10.1038/nprot.2011.456.
- Zhang J., Zhang Y., Du Y., Chen S., Tang H. Dynamic metabonomic responses of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants to salt stress. *J. Proteome Res*. 2011;10(4):1904-1914. DOI 10.1021/pr101140n.
- Zhou G., Chen Y., Yao W., Zhang C., Xie W., Hua J., Xing Y., Xiao J., Zhang Q. Genetic composition of yield heterosis in an elite rice hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109(39):15847-15852. DOI 10.1073/pnas.1214141109.
- Zhu C., Bortesi L., Baysal C., Twyman R. M., Fischer R., Capell T., Schillberg S., Christou P. Characteristics of genome editing mutations in cereal crops. *Trends Plant Sci*. 2017; 22(1):38-52. DOI 10.1016/j.tplants.2016.08.009.

---

#### ORCID ID

D.A. Afonnikov 0000-0001-9738-1409

**Acknowledgements.** This work was supported by State Budgeted Project № 0324-2019-0039.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received September 6, 2018. Revised December 17, 2018. Accepted January 5, 2019.

## Простой и эффективный метод экстракции полярных метаболитов из листьев гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) для GC-MS метаболомного анализа

С.Б. Теплякова<sup>1</sup>✉, А.А. Шаварда<sup>2,3</sup>, Т.В. Шеленга<sup>1</sup>, Е.А. Дзюбенко<sup>1</sup>, Е.К. Потокина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ e-mail: Serafima.teplyakova@mail.ru

Гуар *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. – новая для России сельскохозяйственная культура, востребованная в газо-, нефтедобывающей и пищевой промышленности. В связи с развитием «омиксных» технологий и для выявления ценных для селекции генов представляет интерес сравнительное изучение различных сортов и линий гуара с помощью метаболомики и функциональной геномики. Для массового скрининга метаболомных профилей образцов гуара из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова с использованием GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) метаболомного анализа на первых этапах важно подобрать наиболее оптимальный метод экстракции метаболитов из анализируемых образцов. Результатом метаболомного анализа чаще всего является статистическая модель различий в корреляционной структуре метаболитной сети изучаемых объектов. Надежное квантирование метаболитных профилей критично для различения сортов одной культуры, так как профили метаболитов в тканях листа у растений одного вида, культивируемых в равных условиях, практически не отличаются по набору метаболитов. В метаболомной практике при подготовке образцов к GC-MS-анализу распространено два способа экстракции полярных соединений. Один из широко используемых методов пробоподготовки основан на длительной экстракции метаболитов из цельных незамороженных тканей с помощью растворителя метанола, а другой – на краткосрочной метанольной экстракции метаболитов из замороженного и подвергнутого гомогенизации материала. Преимущества и недостатки этих двух методов побудили нас к разработке нового подхода, позволяющего избежать затруднений при анализе метаболомных профилей листьев различных сортов гуара. Предложенный нами метод объединяет преимущества двух выше указанных способов пробоподготовки, а именно: исключает потерю метаболитов на этапе центрифугирования и способствует полной деструкции всех клеточных стенок, обеспечивая максимальный уровень экстракции полярных метаболитов. Метод состоит в том, что лист быстро замораживается в жидком азоте с последующим размораживанием в холодном метаноле. При этом ткани листа сохраняют морфологическую целостность, и последующее центрифугирование, необходимое при гомогенизации, исключается. Нами была показана эффективность использования этого усовершенствованного метода на образцах листьев трех линий гуара. Установлено, что количество экстрагируемых метаболитов увеличивается более чем в пять раз по сравнению с метанольной экстракцией из свежего листа без замораживания и более чем в два раза в сравнении с экстракцией метанолом после замораживания и гомогенизации. Экстракция метаболитов новым методом позволяет проводить GC-MS-анализ образцов гуара с наименьшими потерями и высокой точностью, необходимой при выявлении сортовых различий.

Ключевые слова: *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.; гуар; газовая хроматография; масс-спектрометрия; метаболомика; экстракция метаболитов.

**Для цитирования:** Теплякова С.Б., Шаварда А.А., Шеленга Т.В., Дзюбенко Е.А., Потокина Е.К. Простой и эффективный метод экстракции полярных метаболитов из листьев гуара (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) для GC-MS метаболомного анализа. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):49-54. DOI 10.18699/VJ19.460

## A simple and efficient method to extract polar metabolites from guar leaves (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) for GC-MS metabolome analysis

S.B. Teplyakova<sup>1</sup>✉, A.L. Shavarda<sup>2,3</sup>, T.V. Shelenga<sup>1</sup>, E.A. Dzyubenko<sup>1</sup>, E.K. Potokina<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Komarov Botanical Institute, RAS, St. Petersburg, Russia

✉ e-mail: Serafima.teplyakova@mail.ru

Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) is an agricultural crop species new to Russia and is in demand by the gas, oil and food industries. Due to the progress of “omics” technologies and the marker-assisted selection, there is a huge interest in the studies that compare the metabolites of various guar varieties, employing metabolomics as a method of functional ge-

nomics. For a large-scale screening of guar germplasm from the VIR collection, it is important to choose an efficient method to extract metabolites from samples. The accuracy of the assessment of the content of metabolites in samples is crucial for distinguishing varieties within the crop, since the metabolome profiles of plants within the same species differ mainly in the quantitative ratio of metabolites, and not in their qualitative composition. In metabolome practice, two methods of extracting polar compounds are usually employed in the preparation of samples for GC-MS analysis. One of the widely used methods of sample preparation is the long-term extraction of metabolites from whole tissues with the aid of a methanol solvent. Another method of sample preparation is based on the short-term methanol extraction of metabolites from frozen and homogenized material. The advantages and disadvantages of these two methods revealed in the course of our work have prompted us to develop a new approach that avoids some difficulties in analyzing the metabolic profiles of leaves of various guar varieties. The method we suggested combines the advantages of the two above-mentioned approaches of sample preparation, namely eliminates the loss of metabolites due to centrifugation and ensures the complete destruction of all cell walls, ensuring the maximum extraction level of polar metabolites. The essence of the new method is that the leaf is rapidly frozen in liquid nitrogen with subsequent thawing in cold methanol. Thus, leaf tissues retain morphological integrity, and subsequent centrifugation, necessary for homogenization, is skipped. We have checked the effectiveness of this improved method by experiments with leaf samples of three guar genotypes. It has been shown that the amount of extracted metabolites increases more than 5-fold compared to extraction with methanol from fresh unfrozen leaf tissues and more than 2-fold compared to extraction with methanol after freezing and homogenization. Extraction of metabolites using the new method allows the GC-MS analysis of guar samples to be conducted with the least loss and high accuracy required to distinguish varieties.

**Key words:** *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub; guar; gas chromatography; mass spectrometry; metabolomics; metabolite extraction.

**For citation:** Teplyakova S.B., Shavarda A.L., Shelenga T.V., Dzyubenko E.A., Potokina E.K. A simple and efficient method to extract polar metabolites from guar leaves (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) for GC-MS metabolome analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):49-54. DOI 10.18699/VJ19.460 (in Russian)

## Введение

Метаболомный подход позволяет получить информацию о физиологическом состоянии исследуемого объекта. Растительный организм синтезирует большое количество веществ, необходимых для поддержания жизнедеятельности. Описано не менее 200 000 веществ, относящихся к низкомолекулярным метаболитам и не являющихся природными полимерами (Hall et al., 2002; Wishart, 2011). С другой стороны, по разным оценкам, разнообразие молекул в одном конкретном организме существенно ниже и не превышает 10 000 различных структур (Fiehn, 2001; Wishart, 2011). К сожалению, никакая разработанная до настоящего времени аналитическая техника не позволяет полностью проанализировать такую сложную систему метаболитов, состоящую из соединений, обладающих совершенно различной природой и физико-химическими свойствами.

Один из наиболее востребованных способов анализа количественного и качественного составов метаболитов в исследуемом объекте – нецелевой (non-targeted) анализ первичных метаболитов, осуществляемый с применением газовой-жидкостной хроматографии (GC), сопряженной с масс-спектрометрией (МС) (Fiehn et al., 2000; Lisec et al., 2006; Kanani, Клара, 2007; Alonso et al., 2015). Набор соединений, идентифицируемых с помощью любой из используемых аналитических платформ, определяется главным образом возможностями применяемого метода. В частности, система GC-MS ограничена только соединениями, обладающими достаточной летучестью. Большинство этих соединений имеют небольшой молекулярный вес и относятся к первичным метаболитам.

Метаболомные данные могут быть сопряжены с постгеномным анализом (Fiehn et al., 2000; Fiehn, 2002). Так, совершенствование методов и протоколов метаболомного анализа позволяет все с большей точностью улавливать межвидовые различия (Bundy et al., 2002; Shinbo et al.,

2006; Farag et al., 2014; Лоскутов и др., 2016) или отличать организмы, имеющие генетические модификации, от организмов «дикого типа» (Roessner et al., 2001; Catchpole et al., 2005).

В последнее время появилась перспектива различать по метаболомным профилям сорта сельскохозяйственных культур (Смоликова и др., 2015). Описаны попытки сравнения сортов рапса (Смоликова и др., 2015), кукурузы (Röhlig et al., 2009) на основе различий в концентрации сахаров и сахароспиртов, аминокислот, жирных кислот. Ключевую роль в таких исследованиях играет выбор методики экстракции метаболитов и пробоподготовки (Lisec et al., 2006; Kanani et al., 2008). В зависимости от целей метаболомного анализа применяют различные по полярности виды растворителей – метанол, метанол/вода, метанол/хлороформ/вода – в разных соотношениях (Martineau et al., 2011; Puzanskiy et al., 2018). Нецелевой анализ профиля полярных соединений проводят преимущественно на основе метанола (Fiehn et al., 2000; Lisec et al., 2006; Kanani Клара, 2007).

Существует несколько способов метанольной экстракции: из гомогената тканей образца и из цельного листа. Одним из самых распространенных способов пробоподготовки является гомогенизация замороженной в жидком азоте ткани с экстракцией при высоких температурах и последующим центрифугированием (Fiehn et al., 2000; Fiehn, 2002; Lisec et al., 2006). При этом наличие термической обработки позволяет добиться максимально высоких результатов (Lisec et al., 2006), а гомогенизация гарантирует разрушение клеточных стенок и, соответственно, экстракцию метаболитов из всех разрушенных клеток. Наряду с этим широко используется метод пробоподготовки, исключая агрессивные воздействия (Maharjan, Ferenc, 2003). Этот метод заключается в метанольной экстракции веществ из цельного листа без гомогенизации материала и термической обработки, а также без стадии

центрифугирования, на которой неизбежна потеря части веществ. Минимизация физико-химических воздействий на анализируемые образцы на стадии пробоподготовки позволяет получить наименее искаженную информацию об исходной представленности метаболитов в неповрежденных тканях (Kanani et al., 2007).

Выбор способа экстракции метаболитов зависит от целей исследования, а также от биологического материала. Предмет нашего исследования – сорта гуара, для изучения которых до настоящего времени не использовался метаболомный подход. В литературе отсутствуют данные о наиболее результативном методе пробоподготовки этого растения для GC-MS-анализа.

На начальных этапах метаболомного анализа требуется подбор наиболее эффективного метода экстракции метаболитов для этой культуры. Таким образом, цель настоящего исследования заключалась в подборе метода более полной экстракции метаболитов для хроматографического анализа, сопряженного с масс-спектрометрией, из листьев растений гуара.

### Материалы и методы

Исследование проведено на трех линиях гуара (линии № 1, 2 и 3), относящихся к трем различным образцам (К-52572, К-52569, К-52580) из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Каждая линия представляла собой потомство одного растения, репродуцированного на Кубанской опытной станции ВИР в 2017 г. Растения для эксперимента выращивались в грунте в условиях теплицы на Пушкинском филиале ВИР в 2018 г. Во время эксперимента растения не подвергались агробιοлогическим обработкам. Полив производился ежедневно вручную. Для анализа у всех растений одновременно был отобран верхний молодой лист (второй настоящий лист). Высота растений составляла около 10 см, растения находились на равной стадии развития.

Экстракцию метаболитов проводили тремя способами (А, В, С):

	А	В	С
Линия 1	20.9*	36.1	22.5
Линия 2	26.1	30.4	22.7
Линия 3	32.3	24.3	32.6

\* Масса листа, мг.

**Способ экстракции А.** Лист помещали в центрифужные пробирки (Eppendorf, Германия) объемом 2 мл. Фиксацию материала и последующую экстракцию метаболитов производили в 1.5 мл холодного 100 % метанола в течение 1 сут при температуре +4 °С, перемешивание на ворткексе (шейкере) не проводилось. Полученный экстракт переносили в чистые пробирки объемом 1.5 мл и выпаривали в центрифужном вакуумном испарителе Labconco (США).

**Способ экстракции В.** Лист и два стеклянных шарика помещали в центрифужные пробирки объемом 2 мл. Фиксацию материала проводили, помещая пробирку в жидкий азот. Гомогенизировали с помощью шаровой вибрационной мельницы Retsch MM 400 в течение 2 мин при 30 колебаниях/с (30 Гц). Экстракцию метаболитов произ-

водили в 1.5 мл холодного 100 % метанола в течение 1 ч при температуре +4 °С, периодически (один раз в 15 мин) перемешивая на ворткексе Multi-Vortex V-32 до равномерного распределения гомогенизированного материала в растворителе. Полученный экстракт перемешивали с помощью ворткекса и центрифугировали (12000 g 5 мин при +4 °С). Супернатант отбирали в пробирки объемом 1.5 мл и выпаривали в центрифужном вакуумном испарителе Labconco.

**Способ экстракции С.** Лист помещали в центрифужные пробирки объемом 2 мл. Фиксацию материала проводили, помещая пробирки в жидкий азот. Экстракцию метаболитов производили в 1.5 мл холодного 100 % метанола в течение 1 ч при температуре +4 °С, перемешивание на ворткексе (шейкере) не проводилось. Полученный экстракт переносили в пробирки объемом 1.5 мл и выпаривали в центрифужном вакуумном испарителе Labconco.

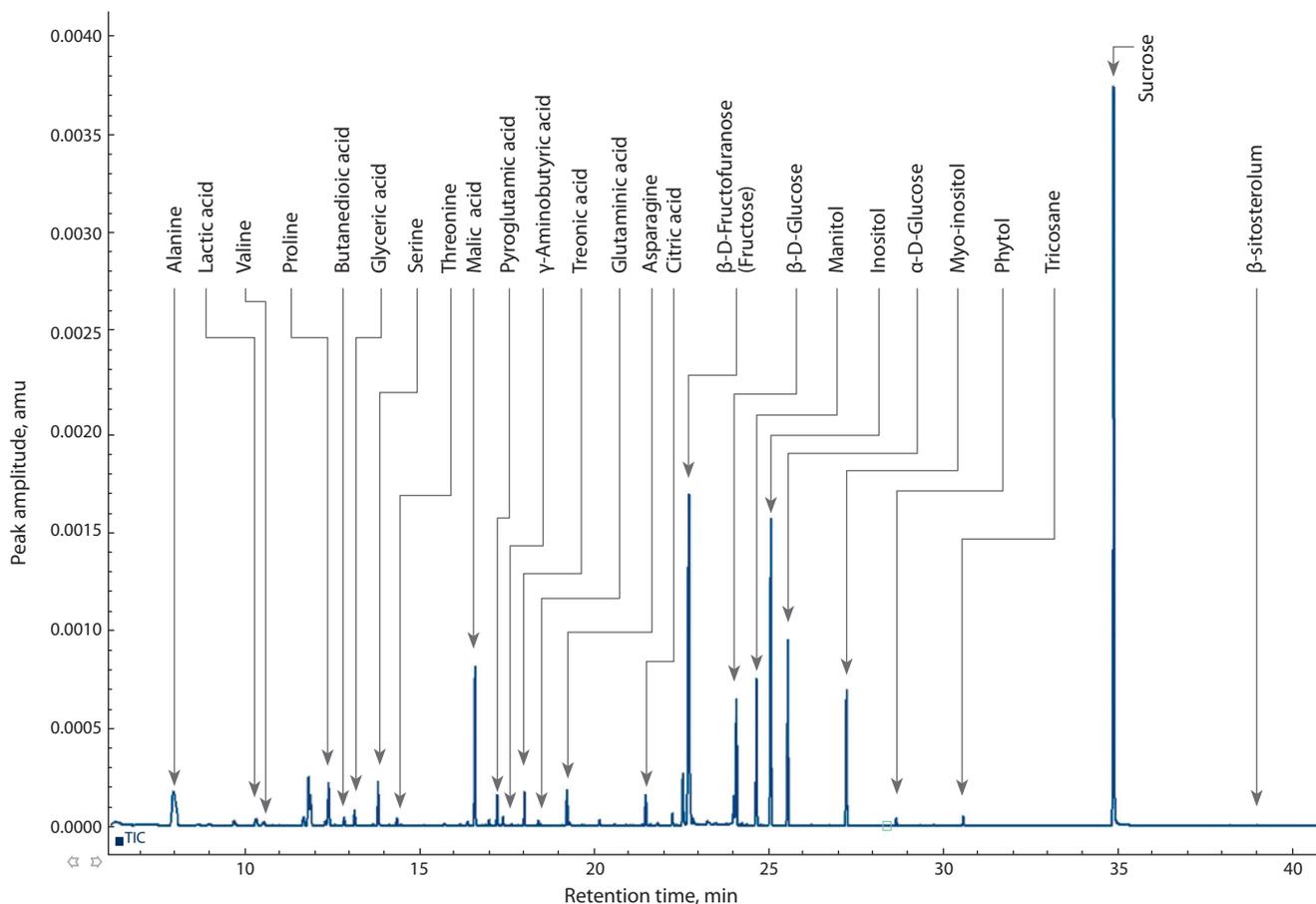
Далее по единой схеме, вне зависимости от выбора метода экстракции, к выпаренному сухому остатку добавляли 50 мкл BSTFA (N,O-Bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide, Sigma), 50 мкл пиридина (Pyridine) и 20 мкл внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали трикозан (Tricosane, Sigma), растворенный в пиридине (1 мкг/мкл).

Хроматографический анализ был произведен на газожидкостном хроматографе Agilent (США) 6850 с масс-селективным детектором 5975В. Разделение анализа производилось на капиллярной колонке умеренной полярности Agilent DB-5HT (5 % фенилметилсилоксан, длина 30 м, внутренний диаметр 250 мкм, толщина пленки 0.25 мкм). Анализ проводился в условиях программирования температуры термостата 70-320 °С при скорости нагревания 6° в мин; газ-носитель – гелий в режиме постоянной скорости потока (1 мл/мин). Использованная инъекция без деления потока, температура испарителя 250 °С. Скорость сканирования масс-селективного детектора 2 скана/с в диапазоне от 50 до 800 m/z. Хроматограммы регистрировались по сигналу полного ионного тока с помощью программы Agilent ChemStation.

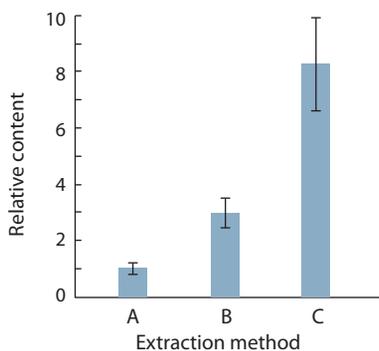
Разметку пиков и расчет относительных концентраций соединений в пробе производили с использованием программного обеспечения UniChrome 5.0.19.1162 ([www.unichrom.com](http://www.unichrom.com)). Методами полуколичественного (semi-quantitative) анализа производили расчет относительных концентраций соединений по отношению к концентрации используемого внутреннего стандарта Трикозан (1 мкг/мкл). Идентификацию веществ проводили в программе AMDIS 32 (<https://chemdata.nist.gov/>) с помощью библиотеки NIST/EPA/NIH 08 Mass Spectral Library (<http://www.nist.gov/srd>). Статистическую обработку метаболомных данных проводили с использованием программы MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) методами многомерной статистики (Chong et al., 2018). В частности, был использован дискриминантный анализ проекций на латентные структуры (PLSDA, Partial Least Squares Regression).

### Результаты

В полученных хроматограммах для каждой пробы было детектировано 71 вещество, 41 из которых было иденти-



**Fig. 1.** Metabolites extracted from guar leaves of genotype 2 (method C). The predominant peaks are marked by gray arrows.  
Designation: amu, arbitrary machine units.

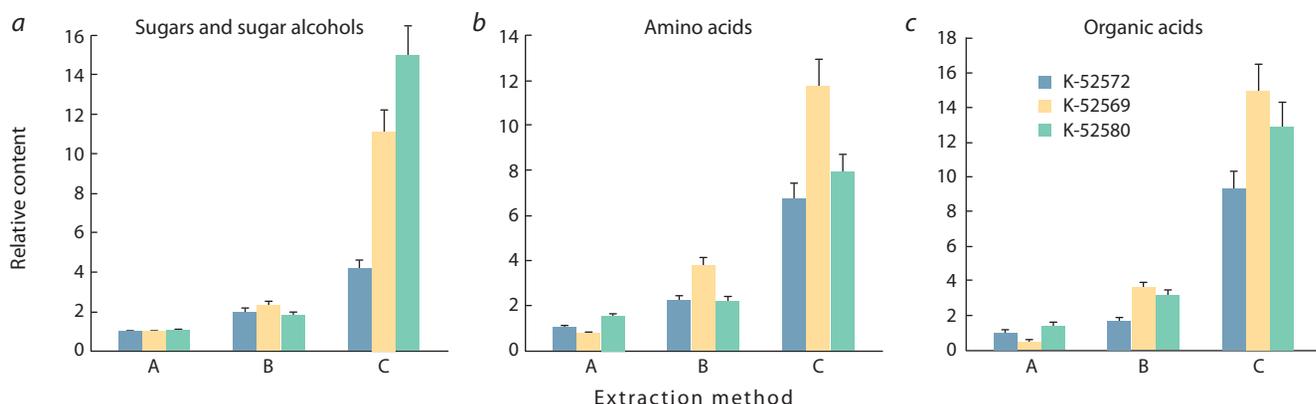


**Fig. 2.** Comparison of the mean bulk content of metabolites in leaves of three guar genotypes extracted by methods A, B, and C.

фицировано. На рис. 1 показана хроматограмма профиля метаболитов с обозначением пиков, наиболее представленных по содержанию соединений в листе гуара линии 2. В числе идентифицированных соединений преобладали аминокислоты и органические кислоты.

Сопоставление результатов проведенного GC-MS-анализа показало, что, независимо от способа экстракции (A, B или C) и принадлежности к определенной линии, качественный состав метаболитов оставался неизменным (71 соединение). Однако по количественному содержанию аналитов наблюдалось существенное различие. По результатам полуколичественного анализа, максимальное содержание общего пула метаболитов было достигнуто при использовании способа экстракции C. Эффективность экстракции способом C повышалась в два раза по сравнению с эффективностью экстракции способом B, и более чем в пять раз в сравнении со способом A (рис. 2). При этом тенденция максимальной вытяжки соединений способом C наблюдается при экстракции метаболитов из всех трех исследуемых линий гуара, что говорит об эффективности методики вне зависимости от биологического образца.

При экстракции способом C одинаково хорошо выделяются метаболиты, принадлежащие к разным классам соединений (рис. 3). Сравнение содержания метаболитов из класса веществ сахаридов и сахароспиртов (см. рис. 3, а) показало наибольшее содержание соединений при экстракции метаболитов способом C. Экстракция аминокислот при выделении метаболитов способом C происходит в среднем в три раза более результативно, в отличие от способа B и в среднем в десять раз, в отличие от способа A (см. рис. 3, б). У всех линий гуара при пробоподготовке по способу C наблюдается высокое содержание аланина, пролина, серина, аспарагиновой кислоты, чуть меньшее содержание валлина, треонина, аспарагина. Наиболее высокое содержание данных аминокислот наблюдается у линии 2. Максимальное содержание аспарагина наблюдалось у линии 1. Содержание этих аминокислот в тех же пропорциях,



**Fig. 3.** Comparison of the contents of metabolites of different classes (a, sugars and sugar alcohols; b, amino acids; c, organic acids). The metabolites were extracted by methods A, B, and C from leaves of three guar genotypes.

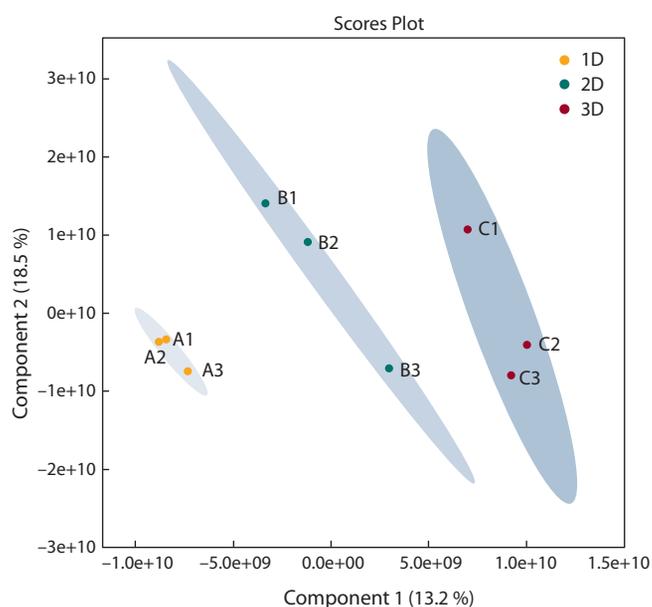
однако в меньших концентрациях, наблюдается и при экстракции метаболитов способом В.

Экстракция метаболитов способом С позволяет достичь максимально эффективной экстракции органических кислот, наряду с сахарами и аминокислотами (см. рис. 3, в). При выделении метаболитов способом С прослеживается высокое содержание органических кислот: молочной, янтарной, яблочной, а также гамма-аминомасляной. Наибольшее содержание органических кислот при экстракции способом С было отмечено у линии 2 (яблочная, гамма-аминомасляная), а также у линии 3 (молочная, янтарная). При экстракции способом В практически не наблюдается различий в содержании молочной, янтарной органических кислот у линий 2 и 3, однако заметно их относительно высокое содержание по сравнению с линией 1.

Результат дискриминантного анализа проекций на латентные структуры (PLSDA) показал, что метод экстракции существенно влияет на результаты анализа профиля метаболитов, содержащихся в листьях линий гуара (рис. 4, компонента 1, 13.2 % объясненной дисперсии). Межсортовые различия по концентрации метаболитов объясняют до 18.5 % наблюдаемой дисперсии (см. рис. 4, компонента 2). Однако эти различия проявляются только при условии использования в процессе пробоподготовки способа В или С, но не способа А. Разделить линии гуара при экстракции метаболитов способом А не представляется возможным.

### Обсуждение

Низкую концентрацию метаболитов, экстрагированных способом А, можно объяснить отсутствием равномерного механического воздействия на клеточные стенки. Одно лишь химическое воздействие метанола, по-видимому, не может обеспечить полноценного разрушения клеточного «барьера» и полную вытяжку спирторастворимых соединений из всей массы растительной пробы. Экстракция происходит лишь частично и случайно. Ошибки в оценке количества метаболитов, связанные с этой случайной экстракцией, могут быть препятствием при оценке достоверных различий метаболомных профилей гуара. Ранее считалось, что метод экстракции В позволяет избежать такого «вероятностного» процесса экстрагирования метаболитов, так как разрушение клеточных стенок



**Fig. 4.** The PLSDA plot of the distribution of three guar genotypes based on different concentrations of 71 detected metabolites extracted by three methods A (1D), B (2D), and C (3D).

происходит в равной степени для всего материала. Однако этот метод имеет еще один недостаток, связанный с возможной потерей части экстрагированных метаболитов в процессе центрифугирования, что также может являться помехой для точной оценки концентраций метаболитов, содержащихся в листьях линий гуара.

По результатам проведенного анализа метаболомного профиля линий гуара, установлено, что способ экстракции С является наиболее эффективным. Его результативность основана на физико-механическом разрушении всех клеточных стенок при резком воздействии температуры  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  с последующим быстрым размораживанием при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . При таком шоковом температурном воздействии практически все растительные клетки повреждаются кристаллами воды, которые разрушают клеточные стенки, препятствующие экстракции. Способ С не предусматривает также процедуры гомогенизации и центрифугирования,

что позволяет избежать потери метаболитов в процессе пробоподготовки. В итоге конечная концентрация метаболитов существенно повышается, в связи с чем мы исследуем систему, более приближенную к своему нативному состоянию.

## Заключение

Таким образом, при экстракции метаболитов из растений гуара применимы методики В и С. Наиболее полным и объективно отражающим метаболомный профиль анализируемого образца можно считать предлагаемый нами новый способ С, заключающийся в пробоподготовке материала без использования гомогенизации и центрифугирования, основанный на воздействии резкого перепада температур, что позволяет снизить потери веществ и добиться более полной экстракции метаболитов из листьев гуара.

## Список литературы / References

Лоскутов И.Г., Шеленга Т.В., Конарев А.В., Шаварда А.Л., Блинова Е.В., Дзюбенко Н.И. Метаболомный подход к сравнительному анализу диких и культурных видов овса (*Avena L.*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):636-642. DOI 10.18699/VJ16.185.  
[Loskutov I.G., Shelenga T.V., Konarev A.V., Shavarda A.L., Blinova E.V., Dzyubenko N.I. The metabolomic approach to the comparative analysis of wild and cultivated species of oats (*Avena L.*). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):636-642. DOI 10.18699/VJ16.185. (in Russian)]

Смоликова Г.Н., Шаварда А.Л., Алексейчук И.В., Чанцева В.В., Медведев С.С. Метаболомный подход к оценке сортовой специфичности семян *Brassica napus L.* Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):121-127. DOI 10.18699/VJ15.015.  
[Smolikova G.N., Shavarda A.L., Alekseychuk I.V., Chantseva V.V., Medvedev S.S. The metabolomic approach to the assessment of cultivar specificity of *Brassica napus L.* seeds. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015; 19(1):121-127. DOI 10.18699/VJ15.015. (in Russian)]

Alonso A., Marsal S., Julià A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. Front. Bioeng. Biotechnol. 2015; 3(23):1-20. DOI 10.3389/fbioe.2015.00023.

Bundy J.G., Spurgeon D.J., Svendsen C., Hankard P.K., Osborn D., Lindon J.C., Nicholson J.K. Earthworm species of the genus *Eisenia* can be phenotypically differentiated by metabolic profiling. FEBS Letters. 2002;521(1-3):115-120. DOI 10.1016/s0014-5793(02) 02854-5.

Catchpole G., Beckmann M., Enot D., Mondhe M., Zywicki B., Taylor J., Fiehn O. Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005;102(40):14458-14462. DOI 10.1073/pnas.0503955102.

Chong J., Soufan O., Li C., Caraus I., Li S., Bourque G., Wishart D., Xia J. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. Nucl. Acids Res. 2018;46(1):486-494. DOI 10.1093/nar/gky310.

Farag M.A., Gad H.A., Heiss A.G., Wessjohann L.A. Metabolomics driven analysis of six *Nigella* species seeds via UPLC-qTOF-MS and GC-MS coupled to chemometrics. Food Chem. 2014;151:333-342. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.11.032.

Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. Comp. Funct. Genomics. 2001;2(3):155-168. DOI 10.1002/cfg.82.

Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol. Biol. 2002;48:155-171. DOI 10.1007/978-94-010-0448-0\_11.

Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey R., Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. Nat. Biotechnol. 2000;18(11):1157-1161. DOI 10.1038/81137.

Hall R., Beale M., Fiehn O., Hardy N., Sumner L., Bino R. Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. Plant Cell. 2002;14(7):1437-1440. DOI 10.1105/tpc.140720.

Kanani H., Chrysanthopoulos P.K., Klapa M.I. Standardizing GC-MS metabolomics. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2008;871(2):191-201. DOI 10.1016/j.jchromb.2008.04.049.

Kanani H.H., Klapa M.I. Data correction strategy for metabolomics analysis using gas chromatography-mass spectrometry. Metab. Eng. 2007;9(1):39-51. DOI 10.1016/j.ymben.2006.08.001.

Liseč J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A.R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. Nat. Protoc. 2006;1(1):387-396. DOI 10.1038/nprot.2006.59.

Maharjan R.P., Ferenci T. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. Anal. Biochem. 2003;313(1):145-154. DOI 10.1016/S0003-2697(02) 00536-5.

Martineau E., Tea I., Loač G., Giraudeau P., Akoka S. Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells. Anal. Bioanal. Chem. 2011;401(7):2133-2142. DOI 10.1007/s00216-011-5310-y.

Puzanskiy R.K., Yemelyanov V.V., Kliukova M.S., Shavarda A.L., Shtark O.Y., Yurkov A.P., Shishova M.F. Optimization of metabolite profiling for Black Medick (*Medicago lupulina*) and Peas (*Pisum sativum*). Applied Biochem. Microbiol. 2018;54(4):442-448. DOI 10.1134/S0003683818040129.

Roessner U., Luedemann A., Brust D., Fiehn O., Linke T., Willmitzer L., Fernie A.R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. The Plant Cell. 2001;13(1):11-29. DOI 10.1105/tpc.13.1.11.

Röhlig R.M., Eder J., Engel K.H. Metabolite profiling of maize grain: differentiation due to genetics and environment. Metabolomics. 2009;5(4):459-477. DOI 10.1007/s11306-009-0171-5.

Shinbo Y., Nakamura Y., Altaf-Ul-Amin M., Asahi H., Kurokawa K., Arita M., Kanaya S. KNApSACk: a comprehensive species-metabolite relationship database. Plant Metabolomics. 2006;57:165-181. DOI 10.1007/3-540-29782-0\_13.

Wishart D.S. Advances in metabolite identification. Bioanalysis. 2011; 3(15):1769-1782. DOI 10.4155/bio.11.155.

## ORCID ID

S.B. Teplyakova orcid.org/0000-0002-5624-4245  
A.L. Shavarda orcid.org/0000-0003-1778-2814  
T.V. Shelenga orcid.org/0000-0003-3992-5353  
E.A. Dzyubenko orcid.org/0000-0003-4576-1527  
E.K. Potokina orcid.org/0000-0002-2578-6279

**Acknowledgements.** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-29-08027 ofi-m. Use was made of the equipment of the resource center "Development of Molecular and Cellular Technologies", Science Park, St.-Petersburg State University.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received October 11, 2018. Revised December 3, 2018. Accepted December 21, 2018

## Effect of lethal yellow ( $A^Y$ ) mutation and photoperiod alterations on mouse behavior

E.Y. Bazhenova, D.V. Fursenko, N.V. Khotskin, I.E. Sorokin, A.V. Kulikov

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

e-mail: v\_kulikov@bionet.nsc.ru

Decrease in natural illumination in fall/winter months causes depressive-like seasonal affective disorders in vulnerable individuals. Obesity is another risk factor of depression. The lethal yellow ( $A^Y$ ) mutation causes ectopic expression of agouti protein in the brain. Mice heterozygous for  $A^Y$  mutation ( $A^Y/a$ ) are obese compared to their wild-type littermates ( $a/a$ ). The main aims of the study were to investigate the effects of  $A^Y$  mutation, photoperiod and the interaction between these factors on daily activity dynamics, feeding, locomotor and exploratory activities, anxiety-related and depressive-like behaviors in mild stress condition. Six weeks old mouse males of  $A^Y/a$  and  $a/a$  lines were divided into four groups eight animals each and exposed to long- (14 h light and 10 h darkness) or short- (4 h light and 20 h darkness) day conditions for 28 days. Then the behavior of these mice was successively investigated in the home cage, open field, elevated plus-maze and forced swim tests. We did not observe any effect of  $A^Y$  mutation on the general activity, water and food consumption in the home cage; locomotion and exploration in the open field test; anxiety-related behavior in the open field and elevated plus-maze tests. At the same time,  $A^Y$  mutation increased depressive-like immobility time in the forced swim test ( $F_{1,28} = 20.03$ ,  $p = 0.00012$ ). Short-day conditions decreased nocturnal activity in the home cage, as well as locomotion ( $F_{1,28} = 16.33$ ,  $p = 0.0004$ ) and exploration ( $F_{1,28} = 16.24$ ,  $p < 0.0004$ ) in the open field test. Moreover, short-day exposition decreased time spent in the center of the open field ( $F_{1,28} = 6.57$ ,  $p = 0.016$ ) and in the open arms of the elevated plus-maze ( $F_{1,28} = 12.08$ ,  $p = 0.0017$ ) tests and increased immobility time in the forced swim test ( $F_{1,28} = 9.95$ ,  $p = 0.0038$ ). However, no effect of the interaction between  $A^Y$  mutation and photoperiod on immobility time in the forced swim test was observed. Therefore, short-day photoperiod and  $A^Y$  mutation increased depressive-like behavior in the forced swim test by means of different mechanisms.

Key words: lethal yellow; photoperiod; activity; anxiety; depressive-like behavior; mice.

**For citation:** Bazhenova E.Y., Fursenko D.V., Khotskin N.V., Sorokin I.E., Kulikov A.V. Effect of lethal yellow ( $A^Y$ ) mutation and photoperiod alterations on mouse behavior. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):55-61. DOI 10.18699/VJ19.461

## Влияние мутации lethal yellow ( $A^Y$ ) и изменений фотопериода на поведение мыши

Е.Ю. Баженова, Д.В. Фурсенко, Н.В. Хоцкин, И.Е. Сорокин, А.В. Куликов

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

e-mail: v\_kulikov@bionet.nsc.ru

Снижение естественного освещения в осеннее/зимнее время вызывает депрессивно-подобные сезонные аффективные расстройства у предрасположенных индивидов. Ожирение является другим фактором риска депрессии. Мутация lethal yellow ( $A^Y$ ) вызывает эктопическую экспрессию белка агуты в мозге. Мыши, гетерозиготные по мутации  $A^Y$  ( $A^Y/a$ ), страдают ожирением по сравнению с их однопометниками дикого типа ( $a/a$ ). Основная цель работы – исследование влияния мутации  $A^Y$ , фотопериода и взаимодействия между этими факторами на суточную динамику активности, потребление пищи, локомоторную и исследовательскую активность, тревожность и депрессивно-подобное поведение в условиях умеренного стресса. Самцы  $A^Y/a$  и  $a/a$  возрастом 6 недель были разделены на четыре группы и содержались 28 дней при длинном (14 ч день:10 ч ночь) и коротком (4 ч день:20 ч ночь) фотопериоде. Затем поведение этих мышей последовательно исследовали в домашней клетке, тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание». Мы не обнаружили влияния мутации  $A^Y$  на общую активность, потребление пищи и воды в домашней клетке; двигательную активность, исследовательское поведение в тесте «открытое поле»; тревожность в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». В то же время мутация  $A^Y$  усиливает депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание» ( $F_{1,28} = 20.03$ ,  $p = 0.00012$ ). Короткий день снижал ночную активность мышей в домашней клетке, как и локомоторную ( $F_{1,28} = 16.33$ ,  $p = 0.0004$ ) и исследовательскую ( $F_{1,28} = 16.24$ ,  $p < 0.0004$ ) активность в тесте «открытое поле». Более того, короткий день снижал время в центре в тесте «открытое поле» ( $F_{1,28} = 6.57$ ,  $p = 0.016$ ) и в открытых рукавах в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» ( $F_{1,28} = 12.08$ ,  $p = 0.0017$ ), а также увеличивал время неподвижности в

тесте «принудительное плавание» ( $F_{1,28} = 9.95, p = 0.0038$ ). При этом не выявлено влияния взаимодействия генотип  $\times$  фотопериод на выраженность этих признаков. Следовательно, мутация  $A^Y$  и короткий фотопериод усиливают депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание» посредством различных механизмов.

Ключевые слова: lethal yellow; фотопериод; активность; тревожность; депрессивно-подобное поведение; мыши.

## Introduction

Seasonal alterations of natural illumination in high or moderate latitudes trigger numerous adaptive changes in the nervous system and behavior of all wild animals. Although humans mainly live at constant illumination, its decrease during fall/winter months can cause seasonal affective disorders (SAD) or subsyndromal SAD characterized by carbohydrate craving, overeating, weight gain, decreased libido, hypersomnia and prominent fatigue (Levitan, 2007) in some vulnerable individuals. SAD and subsyndromal SAD are observed in 11–21 % of individuals and are a considerable social and economic problem due to high risk of disability (Miller, 2005).

Laboratory mice have been proposed as an animal model of SAD (Otsuka et al., 2014). However, the reported data about effect of photoperiod alteration on mouse behavior are contradictory (Otsuka et al., 2014; Young et al., 2018).

Obesity and concomitant type 2 diabetes increase risk of depressive disorders (Stunkard et al., 2003; Simon et al., 2006; Luppino et al., 2010; Lojko et al., 2015). Mice lacking leptin receptor are obese and show depressive-like features (Sharma et al., 2010). Another model of hereditary obesity is  $A^Y/a$  mice, heterozygous for lethal yellow ( $A^Y$ ) mutation (Boston et al., 1997; Bazhan et al., 2013).

The main aims of the study were the following: to investigate the effects of (1)  $A^Y$  mutation, (2) short/long photoperiod and (3) these factors interaction on brain monoamines and behavior. Here we compared: the effect of the long- and short-day conditions on the daily activity in the home cage, the locomotor, exploratory activities, anxiety-related, depressive-like behavior in heterozygous  $A^Y/a$  mice and their wild-type littermates ( $a/a$ ).

## Materials and methods

**Animals and experiments.** The study was conducted at the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals at the Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch, Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia) using equipment supported by the Russian Ministry of Education and Science (project No. RFMEFI62117X0015). Experiments were carried out on SPF-state mouse males C57BL/6- $A^Y$  ( $A^Y/a$ ,  $n = 16$ ) and their wild type littermates C57BL/6 ( $a/a$ ,  $n = 16$ ). These mouse genotypes were bred by crossing  $a/a$  females and  $A^Y/a$  males. Such breeding results only in obtaining  $A^Y/a$  and  $a/a$  mice (50:50) which have similar genetic background, are born and nurtured by the mothers of the  $a/a$  genotype. The genotype of mice is assayed by the fur color which is yellow in  $A^Y/a$  mice (Boston et al., 1997) and black in  $a/a$  mice. At the beginning of the experiment the  $A^Y/a$  and  $a/a$  mice were 6 weeks old, weighed  $20.9 \pm 0.3$  g and  $20.0 \pm 0.3$  g ( $F_{1,30} = 5.03, p = 0.032$ ), respectively. The males of the same genotype ( $A^Y/a$  or  $a/a$ ) were kept for 28 days in groups of four in individually ventilated cages (Optimice, Animal Care Systems, Inc.) in rooms with 20-fold air exchange at temperature  $24 \pm 2$  °C, humidity 45–50 %, and at long (14 h

of light: 10 h of darkness, 14L:10D, 40 lx) or short (4 h of light: 20 h of darkness, 4L:20D, 40 lx) photoperiods with daybreak at 01:00 (14L:10D) or 11:00 (4L:20D) and sunset at 15:00 (14L:10D and 4L:20D). The 14L:10D photoperiod is the standard photoperiod in our SPF-vivarium. Food and litter were autoclaved at 121 °C before use. Animals were provided with deionized water (produced in a Millipore device) with Severyanka (Eko-proekt, St. Petersburg, Russia) mineral supplement and feed *ad libitum*. There were four experimental groups of eight animals: (1)  $a/a$  kept at 14L:10D, (2)  $a/a$  kept at 4L:20D, (3)  $A^Y/a$  kept at 14L:10D and (4)  $A^Y/a$  kept at 4L:20D. Two days before the tests, the animals were isolated in the same cages to reduce group effect. The animals were kept at the same photoperiods during the tests. First, the dynamics of locomotion, sleep, water and food consumption in the home cage was tested using PhenoMaster (TSE, Germany). Then, the mice were tested for three successive days in open field (OF), elevated plus-maze (EPM) and forced swim (FS) tests.

The maintenance of mice was supported by the basic research project No. 0324-2018-0016. All procedures comply with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes and were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Russian National Center of Genetic Resources of Laboratory Animals based in SPF-vivarium of Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia (protocol No. 32 of March 18, 2016).

**Home cage activity.** Daily dynamics of locomotor activity, sleep duration, water and food consumption were investigated in PhenoMaster (TSE, Germany) according to the manufacturer's instruction. The device consists of eight individual cages equipped with infrared sensors those tracing the animal movements. Drinking bowls and feeders were also equipped with sensors, allowing the accurate measurement of water and food consumption. The data from the sensors were recorded each minute and processed by the software from the manufacturer. The animals learned to use drinking bowls and feeders for two successive days and then they were isolated in PhenoMaster cages and their locomotion, sleep duration, water and food consumed were recorded for 48 h. The first 24-hour period (1–24 h) was considered as an adaptive one and was not taken into account. Therefore, the baseline animal activity was assessed only on the basis of data recorded for the second 24-hour period (25–48 h) (Khotskin et al., 2017). According to the manufacturer's instructions, the software determined the state of sleep as lack of mobility for 40 s or more. This sleep estimation correlates with the EEG estimation of the sleep state (Pack et al., 2007; Fisher et al., 2012; Bais et al., 2015). The dynamics of locomotor activity and sleep duration were respectively evaluated by the distance travelled (m) and accumulated sleep time (min) during one hour, while the water and food consumption were measured as water (ml) and food (g) quantity consumed during 24 h.

Other behavioral tests were held between 15:00 and 18:00 in the dark time. The EthoStudio software was applied for automatic tracking of mouse behavior in OF, EPM and FS tests (Kulikov et al., 2008, 2010, 2014). In OF and FS tests we used the transmitted (inverted) light for automatic tracking of mouse behavior when the light was transmitted through the arena to a WEB camera placed at 80 cm above the arena and connected to a computer via a USB 3.0 port. Since a mouse regardless of its color (white, agouti or black) is opaque, it contrasts with background in the transmitted light (Kulikov et al., 2008).

**Open field test (OF).** The OF test was carried out on a brightly illuminated white plastic arena of 55 cm in diameter with the wall of 30 cm in height. The 25 % zone in the center of the arena was selected as the center. The arena was made of opaque polyvinyl chloride and placed on a semitransparent platform. The arena was brightly illuminated (300 lx) with two halogen lamps (35 W) placed 40 cm below the platform. A mouse was placed at the wall of the arena and its movement was automatically tracked for 5 min. The EthoStudio software automatically calculates two behavioral traits: the time spent in the center (%) is calculated as the ratio of mouse-associated pixels in the center to the total number of mouse-associated pixels and the distance travelled during the test (m), while the number of vertical postures were recorded by an experienced rater blind to experiment (Kulikov et al., 2008). The time in the OF center is negatively associated with fear (Carol et al., 2002; Prut, Belzung, 2003), while the numbers of vertical postures are associated with exploration (Crusio, 2001; Alves et al., 2012). The apparatus was cleaned with wet and dry napkins after each test.

**Elevated plus-maze test (EPM).** The EPM test was carried out in the apparatus made of gray plastic including two closed and two open arms (30 cm in length  $\times$  5 cm in width). The close arms were framed by plastic walls of 30 cm in height. The apparatus was elevated at 60 cm above the floor and dimly illuminated with diffuse light ( $\approx$ 100 lx) of a halogen lamp (25 W) placed a meter above. Newly developed Microsoft Kinect 1 3-D sensor was applied for the first time for automatic tracking of mouse behavior in the EPM. This sensor was earlier successfully applied to track pig behavior (Kulikov et al., 2014). Microsoft Kinect 1 3-D sensor was placed 60 cm above the surface of the EPM and connected to a computer via a USB port. In contrast to standard digital video tracking systems based only on color or brightness of pixels, the present version of the EthoStudio software uses also the depth data provided by the 3-D sensor. Depth data contains the distance (m) from each pixel of the animal and arena to the sensor. The height threshold algorithm marks pixels higher or lower the threshold (1.5 cm in height) as associated with animal (1) or background (0), respectively (Kulikov et al., 2014). The main advantage of the 3-D sensor over standard digital video is that the former can track animal of any color in open and closed arms of the EPM.

A mouse was placed in the center of the EPM with the head targeted to a closed arm and its movement was automatically tracked for 5 min. Since the 3-D sensor can track animal both in open and closed arms the EthoStudio software can evaluate the following traits: the times (%) spent in the center, closed and open arms based on the ratio of the number of mouse-associated pixels in these parts of the maze to the

total number of mouse-associated pixels. The time spent in the center and in the closed arms is, respectively, negatively and positively associated with fear (Carol et al., 2002; Prut, Belzung, 2003). The apparatus was cleaned with wet and dry napkins after each test.

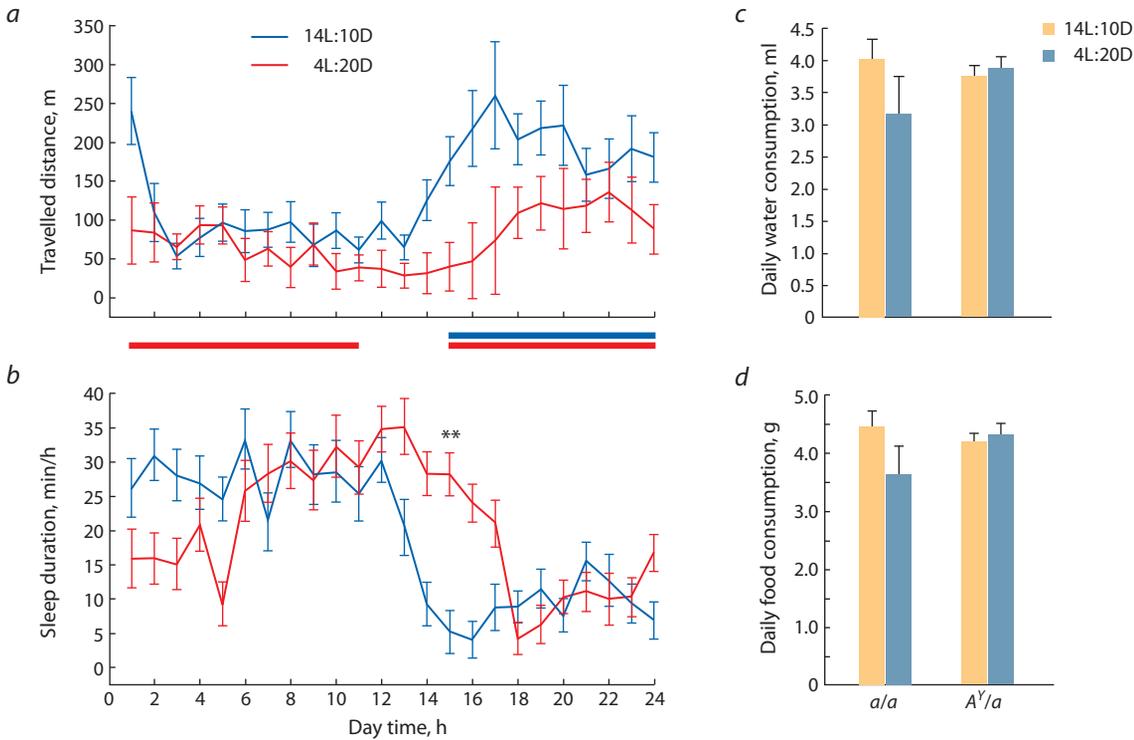
**Forced swim test (FS).** Mice were placed for 6 min into a clear plastic tank (18 cm in diameter and 30 cm in height) filled with water at temperature 25 °C for 2/3 of the volume (20 cm). The water tank was placed on a semitransparent platform and illuminated (150 lx) with one halogen lamp (35 W) placed 40 cm below the platform (Kulikov et al., 2010). Behavior in the FS test was automatically evaluated for the last four minutes of the test using EthoStudio software by immobility time (s) and rate of alteration of the animal silhouette (%). The last parameter is the ratio of the number of mouse-associated pixels that have changed their position between two adjacent frames to the mean number of mouse-associated pixels in these frames (%). We used the mean rate calculated for the last four minutes of the test as the index of active resistance. The immobility time was calculated as the time (s) when the rate of the animal silhouette alteration was less than 17 %.

**Statistics.** The data were presented as the mean  $\pm$  SEM. The mean values were compared using two way ANOVA (“genotype” and “photoperiod” factors). Daily dynamics of the locomotor activity and sleep in the home cage was compared using repeated measure ANOVA with “genotype” and “photoperiod” as the between and the “day time” as the within variables. The differences between groups were determined using the Fisher LSD post hoc multiple pairwise comparisons. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

**Photoperiodic changes in weight of  $a/a$  and  $A^Y/a$  mice.** The effect of the “genotype” factor on weight was observed: at the end of experiment mice of  $A^Y/a$  genotype ( $32.4 \pm 0.4$  g) were heavier than of  $a/a$  genotype ( $26.7 \pm 0.4$  g;  $F_{1,28} = 110.81$ ,  $p < 0.0001$ ). At the same time, no effect of the “photoperiod” factor ( $F_{1,28} = 2.03$ , n. s.) or the “genotype”  $\times$  “photoperiod” interaction ( $F_{1,28} < 1$ , n. s.) on animals’ weight was found.

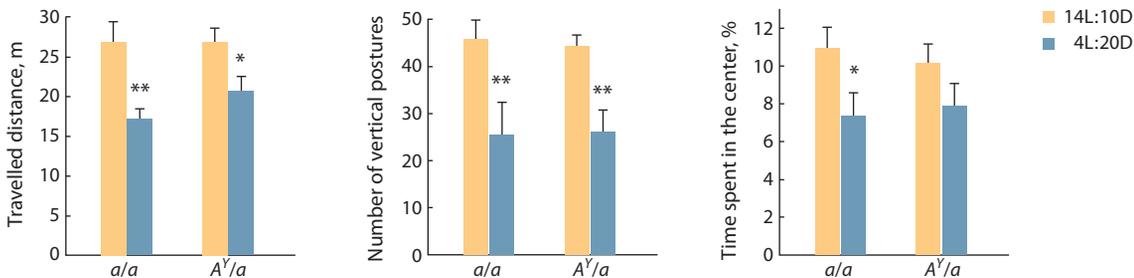
**Photoperiodic changes in home cage behavior in  $a/a$  and  $A^Y/a$  mice.** No effect of the factors “genotype” (locomotion,  $F_{1,24} < 1$ , n. s.; sleep duration,  $F_{1,24} = 1.2$ , n. s.), “photoperiod” (locomotion,  $F_{1,24} = 2.7$ , n. s.; sleep duration,  $F_{1,24} < 1$ , n. s.) and the “genotype”  $\times$  “photoperiod” interaction ( $F_{1,24} < 1$ , n. s., for both traits) on locomotion and sleep duration was observed. At the same time, the effects of the “day time” factor on locomotion ( $F_{23,552} = 8.05$ ,  $p < 0.00001$ ) and sleep duration ( $F_{23,552} = 14.83$ ,  $p < 0.00001$ ) were observed: in mice of both genotypes. The effects of “photoperiod”  $\times$  “day time” interaction on the daily dynamics of locomotion ( $F_{23,552} = 3.42$ ,  $p < 0.00001$ ) and sleep duration ( $F_{23,552} = 6.65$ ,  $p < 0.00001$ ) were also observed. This indicates an influence of photoperiod on the daily dynamics of mouse activity. Mice exposed to long-day conditions were more active ( $199.54 \pm 36.27$  m/h in darkness vs  $96.69 \pm 21.01$  m/h in light,  $p = 0.000018$ ) in the dark-time period, while activity mice exposed to short-day conditions did not differ in the dark- and light-time periods ( $81.98 \pm 36.27$  m/h in darkness vs  $33.89 \pm 21.01$  m/h in light, n. s.) (Fig. 1, a). At the same time, mice exposed to long-day ( $9.05 \pm 1.44$  min/h in darkness vs  $26.20 \pm 3.04$  min/h in light,



**Fig. 1.** Daily dynamics of locomotor activity (distance travelled, m/h) (a), sleep duration (min/h) (b) as well as the daily consumption of water (ml) (c) and food (g) (d) in the home cage in  $a/a$  and  $A^Y/a$  mice exposed to long- and short-day conditions.

Blue and red bars under the panel (a) show the dark time for long- and short-day exposition, correspondingly. Since no effect of the “genotype” factor on the locomotor activity and sleep time is observed, the points of the corresponding curves are the means of values for  $a/a$  and  $A^Y/a$  mice exposed to the same photoperiod.

\*\* $p < 0.01$  difference between long- and short-day conditions.



**Fig. 2.** Travelled distance (m), number of vertical postures and time spent in the center (%) in the OF test in  $a/a$  and  $A^Y/a$  mice exposed to long- and short-day conditions.

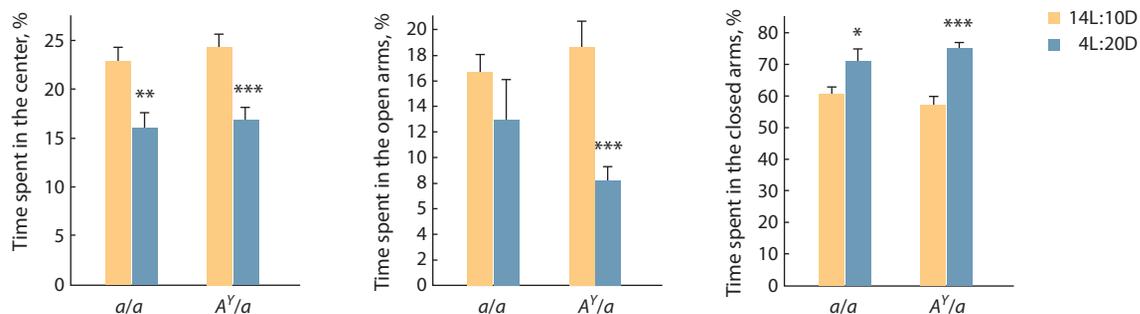
\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs mice of the same genotype exposed to long-day conditions.

$p < 10^{-6}$ ) and short-day ( $18.16 \pm 1.44$  min/h in darkness vs  $31.87 \pm 3.04$  min/h in light,  $p = 0.000018$ ) conditions slept more time in the light phase than in the dark phase (see Fig. 1, b). So, the observed difference in daily dynamics of sleep between mice exposed to long- and short-day conditions results from the shift of light phase (long-day, between 01:00 and 15:00; short-day, between 11:00 and 15:00).

We did not observe any effect of “genotype” (water, food,  $F_{1,24} < 1$ , n. s.), “photoperiod” (water,  $F_{1,24} = 1.16$ ,  $p = 0.29$ , n. s.; food,  $F_{1,24} = 1.41$ ,  $p = 0.25$ , n. s.) factors and their interaction (water,  $F_{1,24} = 2.11$ ,  $p = 0.16$ , n. s.; food,  $F_{1,24} = 2.66$ ,  $p = 0.12$ , n. s.) on water and food consumption (see Fig. 1, c and d).

### Photoperiodic changes in locomotor activity, anxiety-related and depression-like behavior in $a/a$ and $A^Y/a$ mice.

In the OF test we revealed effects of the “photoperiod” factor on the traveled distance ( $F_{1,28} = 16.33$ ,  $p = 0.0004$ ), time spent in the center ( $F_{1,28} = 6.57$ ,  $p = 0.016$ ) and the numbers of vertical postures ( $F_{1,28} = 16.24$ ,  $p < 0.0004$ ). However, no effect of the “genotype” factor ( $F_{1,28} < 1$ , n. s.) or the interaction “genotype” × “photoperiod” ( $F_{1,28} < 1$ , n. s.) on these traits was observed. Short-day conditions decreased horizontal (traveled distance) ( $a/a$ ,  $p = 0.0016$ ;  $A^Y/a$ ,  $p = 0.035$ ) and vertical (vertical postures) ( $a/a$ ,  $p = 0.0053$ ;  $A^Y/a$ ,  $p = 0.012$ ) activities, while anxiety-related time in the center was decreased only in  $a/a$  mice ( $p = 0.035$ ), but not in  $A^Y/a$  ones ( $p = 0.17$ ) (Fig. 2).



**Fig. 3.** Time spent (%) in the center, open and closed arms in the EPM test in  $a/a$  and  $A^Y/a$  mice exposed to long- and short-day conditions.

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs mice of the same genotype exposed to long-day conditions.

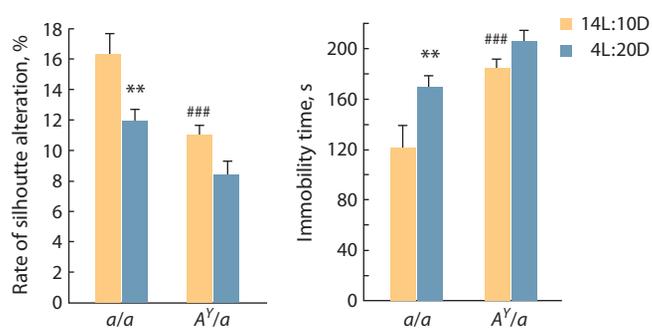
In the EPM test we did not observed any effect of the “genotype” factor ( $F_{1,28} < 1$ , n. s.) and the interaction “genotype”  $\times$  “photoperiod” ( $F_{1,28} < 1$ , n. s.) on time spent in the center, open and closed arms. At the same time, significant effects of the “photoperiod” factor on the time spent in the center ( $F_{1,28} = 27.04$ ,  $p = 0.000016$ ), open ( $F_{1,28} = 12.08$ ,  $p = 0.0017$ ) and closed ( $F_{1,28} = 25.02$ ,  $p = 0.000026$ ) arms were revealed. Mice of both genotypes exposed to short-day spent less time in the center ( $A^Y/a$ ,  $p = 0.0006$ ;  $a/a$ ,  $p = 0.0016$ ) and open arms ( $A^Y/a$ ,  $p = 0.001$ ;  $a/a$ ,  $p = 0.21$ , n. s.), but spent more time in the closed arms ( $A^Y/a$ ,  $p = 0.0001$ ;  $a/a$ ,  $p = 0.014$ ) of the EPM compared to mice exposed to long-day (Fig. 3).

In the FS test the influences of factors “genotype” (rate of silhouette alteration,  $F_{1,28} = 21.54$ ,  $p = 0.00007$ ; immobility time,  $F_{1,28} = 20.03$ ,  $p = 0.00012$ ) and “photoperiod” (rate of silhouette alteration,  $F_{1,28} = 13.36$ ,  $p = 0.0011$ ; immobility time,  $F_{1,28} = 9.95$ ,  $p = 0.0038$ ), but not the factors’ interaction ( $F_{1,28} < 1$ , n. s. for both traits) on the rate of silhouette alteration and immobility time were revealed. The rate of silhouette alteration was lower ( $p = 0.0005$ ) and immobility time was higher ( $p = 0.0004$ ) in  $A^Y/a$  mice exposed to the long-day conditions compared to  $a/a$  animals exposed to the same photoperiod (Fig. 4). Short photoperiod decreased the rate of silhouette alteration ( $p = 0.003$ ) and increased immobility time ( $p = 0.0045$ ) in  $a/a$ , but not in  $A^Y/a$  mice (see Fig. 4).

## Discussion

In the present study, new information about the effects of the “genotype” ( $A^Y$  mutation), “photoperiod” and “genotype”  $\times$  “photoperiod” interaction was obtained.

The  $A^Y$  mutation results from large deletion in the promoter of the mouse *agouti* gene that puts the *agouti* gene under control of the promoter of an ubiquitously expressed *Raly* gene (Perry et al., 1994). Although, normally, agouty protein is expressed only in hair follicles, this deletion causes ectopic expression of agouti protein in many tissues including the brain, adipose and other tissues (Boston et al., 1997). Agouti protein inhibits melanocortin-4 receptors (Lu et al., 1994) involved in the regulation of total metabolism, feeding, anxiety and depressive-like behavior (Caruso et al., 2014; Gagnoli, 2014). However, since its creation,  $A^Y/a$  mice are mainly used to study the effect of obesity and type 2 diabetes on the peripheral control of metabolism, immunity, reproduction etc. This is the first systematic study of the effect of the  $A^Y$  muta-



**Fig 4.** Rate of mouse silhouette alteration (%) and immobility time (s) for the last 4 min in the FS test in  $a/a$  and  $A^Y/a$  mice exposed to long- and short-day conditions.

\*\* $p < 0.01$  vs mice of the same genotype exposed to long-day conditions; ### $p < 0.001$  vs  $a/a$  mice exposed to long-day conditions.

tion on the mouse behavior as well as on the vulnerability to altered photoperiod.

In the present study we did not find any effect of the “genotype” factor ( $A^Y$  mutation) on the general activity, sleep duration and feeding in the home cage; locomotor and exploratory activity in the OF test, anxiety-related behavior at mild stress conditions in the OF and EPM tests. At the same time, the  $A^Y$  mutation dramatically reduced active escape behavior (evaluated by the rate of silhouette alteration) and increased depressive-like immobility in the FS test. There are two possible mechanisms of the depressant-like effect of  $A^Y$  mutation: a direct via blockade of melanocortin mechanism of mood regulation or an indirect via obesity. The first hypothesis does not seem to be true, since melanocortin-4 receptor inhibitors show antidepressant effect (Chaki, Okuyama, 2005; Chaki et al., 2005; Chaki, Okubo, 2007). The second hypothesis seems to be more correct, since the leptin receptor deficiency results in obesity and increased depressive-like behavior in the FS test in *Lepr<sup>db</sup>/Lepr<sup>db</sup>* mice (Sharma et al., 2010).

We first showed marked effect of photoperiod on daily dynamics of mouse activity in the home cage. Mice are nocturnal animals and under “normal”, long-day conditions, they showed “normal” daily dynamics: they were more active in the darkness. At the same time, no such daily dynamics was observed in mice exposed to short-day condition: they did not increase their locomotor activity in the darkness.

There are contradictory data about the effect of photoperiod alterations on anxiety-related and depressive-like behavior. Some authors reported that exposition of C57BL/6 mice for 21 days to short-day condition (8L:16D) increased anxiety-related and depressive-like immobility in the EPM and FS tests, respectively (Otsuka et al., 2014). Other authors reported that exposition of C57BL/6 mice for 14 days to long-day conditions (19L:5D) increased anxiety-related and depressive-like immobility in the EPM and FS tests, respectively (Young et al., 2018).

Here we first showed that exposition to short-day conditions reduced locomotion (travelled distance), exploration (numbers of vertical postures), time spent in the center in the OF test, time spent in the center and open arms in the EPM test, as well as increased time spent in the closed arms in the EPM test. These findings can be interpreted as increase of anxiety-related behavior. We also found that the prolonged exposition to short photoperiod increased depressive-like behavior evaluated by decrease in the rate of silhouette alteration and increase in immobility time in the FS test in mice exposed to short-day conditions. Therefore, our results indicate that prolonged exposition to short-day condition increased anxiety-related and depressive-like behavior in mice. This results and conclusion agree with those of T. Otsuka with coauthors (2014), but contradict to those of J.W. Young and coauthors (2018). We think that these discrepancies result from the difference in experimental protocols. We and T. Otsuka with coworkers (2014) used a mild lighting conditions for long-day exposition 14 h, 40 lx and 16 h, 50 lx, respectively. At the same time, J.W. Young and coauthors (2018) used more intensive lighting, 19 h, 130 lum ( $\approx 150$  lx) which is stressful for mice and frequently used as a stressor in the chronic unpredictable stress model (Monteiro et al., 2015) and in the OF test. Therefore, the protocol of J.W. Young and coauthors (2018) is a model for study the effect of intensive lighting rather than photoperiod alteration.

A key problem of the present study was to study the effect of genetic obesity on the vulnerability to short-day photoperiod. We did not find any effect of the “genotype”  $\times$  “photoperiod” interaction on the studied behavioral traits in the home cage, OF, EPM and FS tests. Therefore, genetic obesity cause by  $A^Y$  mutation does not seem to increase vulnerability to short-day photoperiod. Although exposition to short day conditions and  $A^Y$  mutation separately increase immobility time in the FS test, they increase this depressive-like behavior by means of different mechanisms.

## Conclusions

One practical conclusion can be based on the results. Obese  $A^Y/a$  and  $Lepr^{db}/Lepr^{db}$  mice show similar elevated depressive-like behavior in the FS test. At the same time, breeding of  $A^Y/a$  mice is more simple than that of  $Lepr^{db}/Lepr^{db}$  mice. Moreover, being a dominant mutation that can be easily determined by the fur color of its carriers,  $A^Y$  mutation is a very useful tool for studying the interaction between hereditary obesity and other neurological mutations.

## References

Alves R., Barbosa De Carvalho G., Antonio M., Venditti C. High- and low-rearing rats differ in the brain excitability controlled by the allosteric benzodiazepine site in the GABA<sub>A</sub> receptor. *J. Behav. Brain Sci.* 2012;2:315-325. DOI 10.4236/jbbs.2012.23036.

- Bains R.S., Wells S., Sillito R.R., Armstrong J.D., Cater H.L., Banks G., Nolan P.M. Assessing mouse behaviour throughout the light/dark cycle using automated in-cage analysis tools. *J. Neurosci. Methods.* 2018;300:37-47. DOI 10.1016/j.jneumeth.2017.04.014.
- Bazhan N.M., Yakovleva T.V., Kazantseva A.Y., Makarova E.N. Exaggerated anorexigenic response to restraint stress in  $A(y)$  mice is associated with elevated CRFR2 mRNA expression in the hypothalamus. *Physiol. Behav.* 2013;120:19-25. DOI 10.1016/j.physbeh.2013.06.023.
- Boston B.A., Blaydon K.M., Varnerin J., Cone R.D. Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. *Science.* 1997;278:1641-1644. DOI 10.1126/science.278.5343.1641.
- Carola V., D'Olimpio F., Brunamonti E., Mangia F., Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav. Brain Res.* 2002;134:49-57. DOI 10.1016/S0166-4328(01)00452-1.
- Caruso V., Lagerström M.C., Olszewski P.K., Fredriksson R., Schiöth H.B. Synaptic changes induced by melanocortin signaling. *Nat. Rev. Neurosci.* 2014;15:98-110. DOI 10.1038/nrn3657.
- Chaki S., Okubo T. Melanocortin-4 receptor antagonists for the treatment of depression and anxiety disorders. *Curr. Top. Med. Chem.* 2007;7:1145-1151. DOI 10.2174/156802607780906618.
- Chaki S., Okuyama S. Involvement of melanocortin-4 receptor in anxiety and depression. *Peptides.* 2005;26:1952-1964. DOI 10.1016/j.peptides.2004.11.029.
- Chaki S., Oshida Y., Ogawa S.I., Funakoshi T., Shimazaki T., Okubo T., Nakazato A., Okuyama S. MCL0042: A nonpeptidic MC4 receptor antagonist and serotonin reuptake inhibitor with anxiolytic- and antidepressant-like activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2005;82:621-626. DOI 10.1016/j.pbb.2005.11.001.
- Crusio W.E. Genetic dissection of mouse exploratory behavior. *Behav. Brain Res.* 2001;125:127-132. DOI 10.1016/S0166-4328(01)00280-7.
- Fisher S.P., Godinho S.I.H., Potheary C.A., Hankins M.W., Foster R.G., Peirson S.N. Rapid assessment of sleep-wake behavior in mice. *J. Biol. Rhythms.* 2012;27:48-58. DOI 10.1177/0748730411431550.
- Gragnoletti C. Hypothesis of the neuroendocrine cortisol pathway gene role in the comorbidity of depression, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Appl. Clin. Genet.* 2014;7:43-53. DOI 10.2147/TACG.S39993.
- Khotskin N.V., Sorokin I.E., Kulikova E.A., Kulikov A.V. Effect of *Zbtb33* gene knockout and bacterial lipopolysaccharide on home cage behavior in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21(7):804-809. DOI 10.18699/VJ17.297. (in Russian)
- Kulikov A.V., Morozova M.V., Kulikov V.A., Kirichuk V.S., Popova N.K. Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test. *J. Neurosci. Methods.* 2010;191:26-31. DOI 10.1016/j.jneumeth.2010.06.002.
- Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. *J. Neurosci. Methods.* 2008;170:345-351. DOI 10.1016/j.jneumeth.2008.01.024.
- Kuliko V.A., Khotskin N.V., Nikitin S.V., Lankin V.S., Kulikov A.V., Trapezov O.V. Application of 3-D imaging sensor for tracking minipigs in the open field test. *J. Neurosci. Methods.* 2014;235:219-225. DOI 10.1016/j.jneumeth.2014.07.012.
- Levitan R.D. The chronobiology and neurobiology of winter seasonal affective disorder. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2007;9:315-324. DOI 10.1016/j.jcin.2015.10.034.
- Lojko D., Buzuk G., Owecki M., Ruchala M., Rybakowski J.K. Atypical features in depression: Association with obesity and bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 2015;185:76-80. DOI 10.1016/j.jad.2015.06.020.
- Lu D., Willard D., Patel I.R., Kadwell S., Overton L., Kost T., Luther M., Chen W., Woychik R.P., Wilkison W.O., Cone R.D. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature.* 1994;371:799-802. DOI 10.1038/371799a0.

- Luppino F.S., de Wit L.M., Bouvy P.F., Stijnen T., Cuijpers P., Penninx B.W.J.H., Zitman F.G. Overweight, obesity, and depression. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2010;67:220-229. DOI 10.1001/archgenpsychiatry.2010.2.
- Miller A.L. Epidemiology, etiology, and natural treatment of seasonal affective disorder. *Altern. Med. Rev.* 2005;10:5-13.
- Monteiro S., Roque S., de Sá-Calçada D., Sousa N., Correia-Neves M., Cerqueira J.J. An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. *Front. Psychiatry.* 2015;6:6. DOI 10.3389/fpsy.2015.00006.
- Otsuka T., Kawai M., Togo Y., Goda R., Kawase T., Matsuo H., Iwamoto A., Nagasawa M., Furuse M., Yasuo S. Photoperiodic responses of depression-like behavior, the brain serotonergic system, and peripheral metabolism in laboratory mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;40:37-47. DOI 10.1016/j.psyneuen.2013.10.013.
- Pack A.I., Galante R.J., Maislin G., Cater J., Metaxas D., Lu S., Zhang L., Von Smith R., Kay T., Lian J., Svenson K., Peters L.L. Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice. *Physiol. Genomics.* 2007;28:232-238. DOI 10.1152/physiolgenomics.00139.2006.
- Perry W.L., Copeland N.G., Jenkins N.A. The molecular basis for dominant yellow agouti coat color mutations. *BioEssays.* 1994;16:705-707. DOI 10.1002/bies.950161002.
- Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;463:3-33. DOI 10.1016/S0014-2999(03)01272-X.
- Sharma A.N., Elased K.M., Garrett T.L., Lucot J.B. Neurobehavioral deficits in *db/db* diabetic mice. *Physiol. Behav.* 2010;101:381-388. DOI 10.1016/j.physbeh.2010.07.002.
- Simon G.E., Von Korff M., Saunders K., Miglioretti D.L., Crane P.K., Van Belle G., Kessler R.C. Association between obesity and psychiatric disorders in the US adult population. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2006;63:824-830. DOI 10.1001/archpsyc.63.7.824.
- Stunkard A.J., Faith M.S., Allison K.C. Depression and obesity. *Biol. Psychiatry.* 2003;54:330-337. DOI 10.1016/S0006-3223(03)00608-5.
- Young J.W., Cope Z.A., Romoli B., Schrurs E., Joosen A., Van Enkhuijzen J., Sharp R.F., Dulcis D. Mice with reduced DAT levels recreate seasonal-induced switching between states in bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2018;43:1721-1731. DOI 10.1038/s41386-018-0031-y.

---

**Acknowledgements.** The study has been supported by the Russian Science Foundation (grant No. 17-15-01032).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received October 31, 2018. Revised November 30, 2018. Accepted November 30, 2018.

## Sex differences in the expression of lipid oxidation and glucose uptake genes in muscles of fasted mice

N.A. Feofanova<sup>1, 2</sup>✉, T.V. Yakovleva<sup>2</sup>, E.N. Makarova<sup>2</sup>, N.M. Bazhan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: nataly.feofanova@gmail.com

Fasting has become increasingly popular for treatment and prevention of obesity. Sex differences in the mechanisms of adaptation to fasting may contribute to choosing a therapeutic strategy for correction of metabolic disorders. Hepatokine fibroblast growth factor 21 (FGF21) is involved in the adaptation to fasting. Muscles are assumed to be the main energy-consuming tissue in the body, as muscle metabolism plays an important role in the adaptation to nutritional deficit. However, there is still little information on sex differences in muscle and FGF21 physiological response to fasting. Our aim was to find out whether there were sex differences in hormonal regulation and the expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in skeletal muscles in response to fasting. We estimated the effect of 24-hour fasting on the expression of genes involved in lipid (*Ucp3*, *Cpt1*) and carbohydrate (*Slc2a4*) metabolism in muscles and evaluated changes in body weight and blood plasma levels of glucose, insulin, free fatty acids (FFA), adiponectin, and FGF21 in male and female C57BL/6J mice. None of the genes studied (*Ucp3*, *Cpt1* and *Slc2a4*) showed sex-related changes at mRNA levels in control groups, but females exposed to fasting demonstrated a significant increase in the expression of all genes as compared to control. Fasting significantly decreased body weight and glucose blood plasma levels in animals of both sexes but exerted no effect on the levels of insulin or FFA. The adiponectin and FGF21 levels were increased in response to fasting, the increase in females being significant. We were first to show sex dimorphism in muscle gene expression and FGF21 blood level in response to fasting. In females, the greater increase in FGF21 and adiponectin blood levels was positively associated with the greater upregulation of lipid oxidation and glucose uptake gene expression.

Key words: muscle; gene expression; fasting; metabolism; sex difference; mice; C57BL/6J strain.

**For citation:** Feofanova N.A., Yakovleva T.V., Makarova E.N., Bazhan N.M. Sex differences in the expression of lipid oxidation and glucose uptake genes in muscles of fasted mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):62-66. DOI 10.18699/VJ19.462

## Половые различия в экспрессии мышечных генов, вовлеченных в окисление липидов и захват глюкозы, у голодавших мышей

Н.А. Феофанова<sup>1, 2</sup>✉, Т.В. Яковлева<sup>2</sup>, Е.Н. Макарова<sup>2</sup>, Н.М. Бажан<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: nataly.feofanova@gmail.com

Голодание становится все более популярным средством для лечения и профилактики ожирения. Данные о половых различиях механизмов адаптации к голоданию могут быть актуальными при выборе терапевтической стратегии для коррекции нарушений обмена веществ. Гепатокин фактор роста фибробластов 21 (FGF21) вовлечен в регуляцию адаптации к голоданию. Основным потребителем энергии в организме является мышечная ткань, поэтому регуляция метаболизма мышц играет важную роль в ответе организма на пищевой дефицит. Однако половые особенности в физиологическом ответе FGF21 и мышечной ткани на голод пока еще недостаточно изучены. Целью данного исследования было изучение половых особенностей гормональных изменений в крови и экспрессии генов метаболизма глюкозы и жиров в скелетных мышцах в ответ на голод. Мы оценивали влияние 24-часового лишения пищи на экспрессию генов, участвующих в метаболизме липидов (*Ucp3*, *Cpt1*) и углеводов (*Slc2a4*) в мышцах, и изменения массы тела, уровня глюкозы, инсулина, свободных жирных кислот, адипонектина и FGF21 в крови у самцов и самок мышей C57BL/6J. У самцов и самок контрольных групп не выявлено половых различий в уровне мРНК генов *Ucp3*, *Cpt1* и *Slc2a4* в мышцах, под влиянием голода самки продемонстрировали значительное увеличение экспрессии всех генов по сравнению с контролем. Голодание достоверно снижало массу тела и уровень глюкозы в крови у животных обоих полов и не влияло на уровни инсулина и свободных жирных кислот в крови. Уровни адипонектина и FGF21 повышались в ответ на голодание, у самок это повышение было статистически достоверным. Мы впервые

продемонстрировали половой диморфизм в экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм липидов и углеводов (*Ucp3*, *Cpt1* и *Slc2a4*) в мышцах, и уровне FGF21 в крови в ответ на голод: у самок происходит более выраженное повышение экспрессии генов, ассоциированное с ростом уровня FGF21 и адипонектина.

Ключевые слова: мышцы; экспрессия генов; голод; метаболизм; половые различия; мыши; линия C57BL/6J.

## Introduction

Nowadays, starvation is less challenging for the world population than hundreds of years ago; however, voluntary food deprivation is becoming increasingly popular, sometimes saving individuals from life-threatening obesity, sometimes being a symptom of mental disorders. Women are approximately threefold more vulnerable than men to psychiatric eating disorders and approximately twofold more vulnerable to severe and morbid obesity. They also appear to suffer more from these disorders in terms of physical and psychological functioning (Asarian, Geary, 2013). However, most animal studies have been made on males, whereas sex differences in the predisposition to metabolic disorders and mechanisms of physiological adaptation to fasting, in particular, are not understood.

Muscles are considered to be the main energy-consuming tissue in the body, and sex difference in muscle metabolism plays an important role in the adaptation to the shortage of energy substrates available during fasting (Thiebaud et al., 1982). Fasting increases the concentration of free fatty acids (FFA) in blood plasma and forces adaptive changes in the whole body and in skeletal muscle metabolism that enhance fat oxidation and reduce carbohydrate oxidation (Lundsgaard, Kiens, 2014). It is known that fasting increases the expression of genes implicated in the regulation of lipids as fuel substrate in skeletal muscles, such as the genes for uncoupling protein-3 (*Ucp3*), lipoprotein lipase, and muscle carnitine palmitoyltransferase I (*Cpt1*) (Hildebrandt, Neuffer, 2000). There is an increasing body of evidence for a distinct sex dimorphism in the intrinsic properties of skeletal muscle, i. e., fiber type composition and capillarization, which is likely to affect the capacity for oxidative versus glycolytic energy turnover. Microarray data suggests that gender has a stronger influence on gene expression than age and training status in the human vastus lateralis muscle (Roth et al., 2002). Therefore, molecular mechanisms controlling muscle metabolism adaptation to fasting can be different in males and females.

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is one of the recently discovered factors induced in multiple organs in response to diverse nutrition stressors, such as fasting and amino acid deprivation, and it is assumed as a factor of adaptation to disturbances in energy homeostasis (Zhang et al., 2015). FGF21 can stimulate beta oxidation, induce thermogenesis, and enhance insulin sensitivity (Kharitonov, Adams, 2013). There is evidence from animal models (Zhang et al., 2012) and human studies (Foo et al., 2013) that physiologic effects of FGF21 in males and females differ. Interestingly, higher FGF21 expression and serum levels are observed in response to cafeteria diet in males than in females (Gasparin et al., 2018). However, there is still little data on sex difference in FGF21 involvement in the regulation of muscle metabolic response to fasting.

In this study, we consider changes of metabolic genes expression in muscle after 24-hour food deprivation in male

and female C57BL/6J mice. The goal of this study was to investigate the sex-dependent regulation of genes related to fatty acid and carbohydrate metabolism (*Ucp3*, *Cpt1* and *Slc2a4*) in muscle and its relationship with blood plasma levels of FGF21, free fatty acids, adiponectin, and insulin in response to fasting. Fasting-induced increase in expression of genes involved in FFA oxidation (*Cpt1* and *Ucp3*) and glucose uptake (*Slc2a4*) was more pronounced in females than in males. In females, the predominant upregulation of genes related to glucose and lipid metabolism was positively associated with the predominant increase in FGF21 and adiponectin blood plasma levels.

## Materials and methods

**Ethical approval.** All experiments were performed according to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Council of Europe No. 123, Strasbourg 1985) and Russian national instructions for the care and use of laboratory animals. The protocols were approved by the Independent Ethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics (Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences).

**Animals.** C57BL/6J mice were kept in the vivarium of the Institute of Cytology and Genetics. The mice were housed under a 12:12-h light-dark regime at an ambient temperature of 22 °C. The mice were provided *ad libitum* access to commercial mouse chow (Assortiment Agro, Turakovo Village, Moscow oblast, Russia) and water.

To investigate the effects of food deprivation, 15-week old female and male mice were deprived of food at 9.00 am. Animals were killed by decapitation through 24 h of food deprivation. The mice from control groups were decapitated simultaneously with food-deprived mice. All mice were housed individually during 3 weeks before experiment. Each experimental group included 7–10 animals.

Trunk blood samples were taken to measure FGF21, glucose, insulin, adiponectin, and free fatty acids concentrations, and samples of muscle tissue were taken to measure gene expression.

**Plasma assays.** Concentrations of FGF21 were measured with Rat/Mouse Fibroblast Growth Factor ELISA Kit, concentrations of insulin were measured with Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, concentrations of adiponectin were measured with Mouse Adiponectin ELISA Kit (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Concentrations of glucose were measured with Fluitest GLU (Analyticon Biotechnologies AG, Germany). Concentrations of free fatty acids were measured with NEFA FS DiaSys (Diagnostic Systems GmbH, Germany).

**Relative quantitation real-time PCR.** Total RNA was isolated from tissue samples with ExtractRNA (Evrogen, Moscow, Russia) according to manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized with Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Evrogen, Moscow, Russia) and oligo(dT) as a primer. Applied Biosystems

TaqMan gene expression assays (*Ucp3*, *Cpt1*, *Slc2a4*) with  $\beta$ -actin as endogenous control (TaqMan endogenous controls with FAM dye label and MGB mouse  $\beta$ -actin (ACTB)) and qPCRmix-HS LowROX Master Mix (Evrogen, Moscow, Russia) were used for relative quantitation real-time PCR. Sequence amplification and fluorescence detection were done with the Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System. Relative quantitation was performed by the comparative CT method, where CT is the threshold cycle.

**Statistical analysis.** The results are presented as means  $\pm$  SE from the indicated number of mice. Two-way ANOVA was used with factors “sex” (male, female) and “experimental group” (control, food deprivation) with multiple comparisons using the post hoc Fisher LSD test. Significance was determined as  $p < 0.05$ . The STATISTICA 6 software package (StatSoft) was used for analysis.

## Results

### Body weight and blood parameters

Sex significantly affected body weight ( $F = 208.8, p < 0.001$ ). Fasting induced a significant decrease in body weight ( $F = 44.2, p < 0.001$ ). After 24-hour fasting, both males and females lost about 7 % of body weight ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1, a).

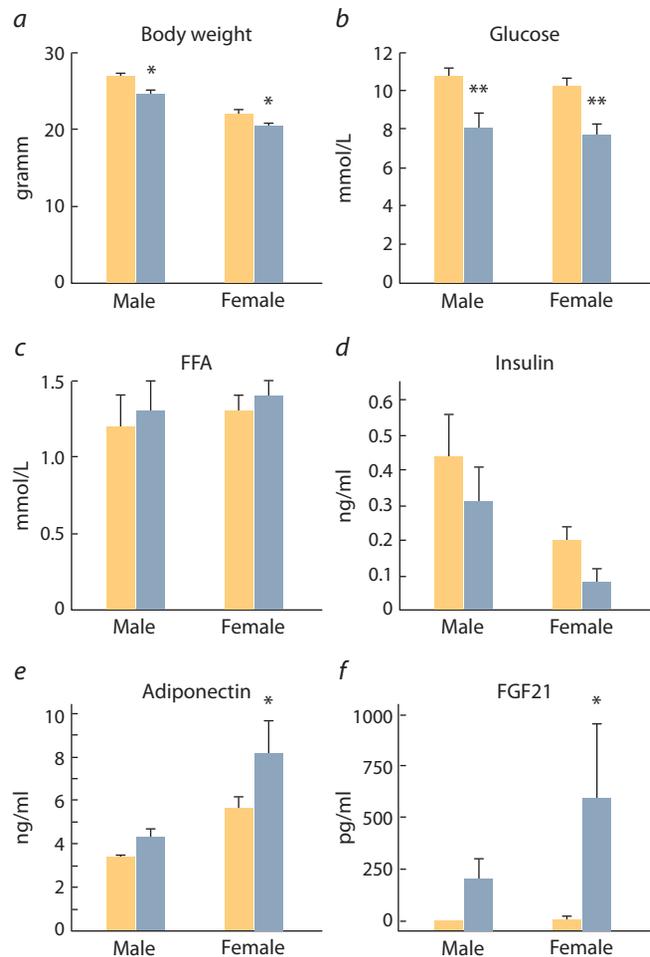
Plasma glucose concentrations in fed mice did not differ between males and females from control groups. Fasting significantly decreased blood plasma glucose ( $F = 21.7, p < 0.01$ ). Compared to the control group, plasma glucose levels significantly decreased in fasted animals of both sexes ( $p < 0.01$ ) (see Fig. 1, b).

Sex and fasting did not affect plasma FFA or insulin concentrations (see Fig. 1, c, d). Both sex and fasting affected adiponectin blood plasma concentrations: they were significantly higher in females than in males ( $F = 14.3, p < 0.01$ ), and in fasted mice higher than in control mice ( $F = 4.96, p < 0.05$ ). In females, the fasting-induced increase in adiponectin levels was more pronounced than in males ( $p < 0.05$ ) (see Fig. 1, e).

Fasting significantly increased FGF21 blood plasma concentrations ( $F = 4.5, p < 0.05$ ). In females, there was a significant difference between control and fasted groups ( $p < 0.05$ ) (see Fig. 1, f).

### Expression of skeletal muscle energy metabolism genes

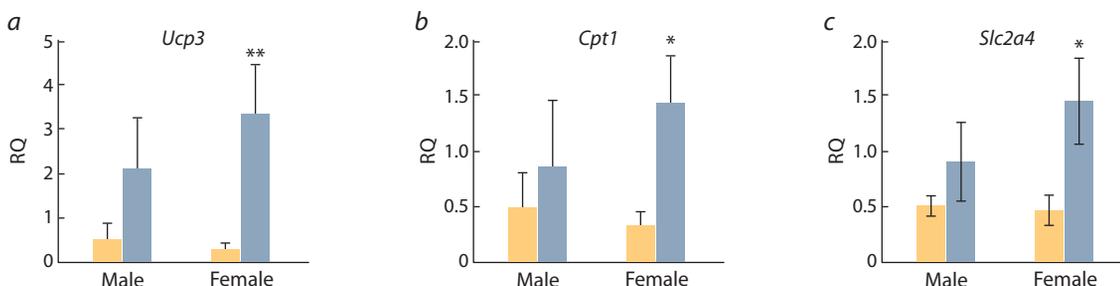
For all genes (*Ucp3*, *Cpt1* and *Slc2a4*) there were no sex-related changes in basal muscle mRNA levels (Fig. 2). Fasting increased *Ucp3* mRNA levels ( $F = 4.64, p = 0.04$ ). The



**Fig. 1.** Body weight, plasma glucose, free fatty acid, insulin, adiponectin, and FGF21 concentrations in control (white bars) and fasted (gray bars) C57BL/6J male and female mice.

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus control. Post-hoc LSD Fisher.

fasting-induced increase of muscle *Ucp3* mRNA was more pronounced in females ( $p < 0.01$ ), while in males changes were not statistically significant (see Fig. 2, a). *Cpt1* and *Slc2a4* gene expression changed in females after fasting. Both *Cpt1* and *Slc2a4* mRNA levels in fasted females were higher than in control females ( $p < 0.05$ ) (see Fig. 2, b, c). In males *Cpt1* and *Slc2a4* mRNA level changes in response to 24-hour food deprivation were statistically insignificant.



**Fig. 2.** Thigh muscle *Ucp3*, *Cpt1*, and *Slc2a4* mRNA expression in control (white bars) and fasted (gray bars) male and female C57BL/6J mice.

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus control. Post-hoc LSD Fisher.

## Discussion

Our results regarding the expression of genes involved in the regulation of FFA oxidation (*Ucp3*, *Cpt1*) and glucose uptake (*Slc2a4*) in muscles demonstrate that the upregulation of these genes at the mRNA level in response to 24-h fasting is much more pronounced in females than in males.

Fasting glucose levels in plasma reflect the interplay between basal whole-body glucose disposal and endogenous glucose production. Blood plasma glucose responses to fasting in males and females were similar; they decreased significantly in both sexes. However, females demonstrated almost 3-fold higher increase in the muscle expression of glucose transporter *Slc2a4*, whereas the increase in males was not statistically significant. This finding suggests more intense glucose turnover in fasted females compared to fasted males.

*Ucp3* expression level is assumed to be one of the main sensors of FFA in muscles, and it can be regulated by hormonal and dietary manipulations. Starvation increases muscle *Ucp3* expression when fat stores are being rapidly mobilized (Samec et al., 1998a). FFAs act as an interorgan signal between fat stores and skeletal muscle tissue. It is of interest that circulating FFAs upregulate *Ucp3* mRNA expression during starvation in slow-twitch (oxidative) muscles, such as the soleus muscle, but not in fast-twitch fibers (glycolytic/oxidative-glycolytic) muscles, which constitute the major fiber type of the total skeletal muscle mass (Samec et al., 1998b). We found no significant changes in the blood plasma FFA level in response to fasting in either males or females. There is evidence that *Ucp3* expression changes are not always correlated with the blood FFA level. Some studies point to unchanged FFA levels and expression of key genes responsible for the uptake, transport, oxidation, and re-esterification of fatty acids during 10 to 40-h fasting accompanied by a dramatic increase in *Ucp3* gene expression in human skeletal muscles (Tunstall et al., 2002). A signal other than circulating FFAs must be implicated in the induction of *Ucp3* expression. FGF21 is known to induce *Ucp3* expression in cardiomyocytes *in vitro* (Planavila et al., 2015). As we found that blood plasma FGF21 levels were positively associated with the *Ucp3* expression level, we suggest that FGF21 is involved in the upregulation of *Ucp3* expression in skeletal muscles.

Several research teams have shown that the expression levels of genes related to the transport of fatty acids into the muscle are greater in women than in men. Skeletal muscles from women show higher expression levels of fatty acid transporter CD36, hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase (Lundsgaard, Kiens, 2014). Glycolytic capacity appears to be greater in men. Higher activities of glycogen phosphorylase, pyruvate kinase, phosphofructokinase, and lactate dehydrogenase have been demonstrated in muscles of young untrained men compared with women (Green et al., 1984). A greater capillary supply and a greater area percentage of type I fibers in women are likely to enhance nutritive flow and increase oxidative glucose and fatty acid metabolism, thereby contributing to gender differences in skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity (Lundsgaard, Kiens, 2014). Our data are in good agreement with these facts. They suggest that the increased potential for beta-oxidation rather than for glycolysis is realized in female muscles under fasting conditions. It could be of adaptive significance, as females normally

have a lesser skeletal muscle mass and greater adipose mass than men.

Blood plasma concentrations of adiponectin are positively associated with whole-body insulin sensitivity (Furler et al., 2006; Hojlund et al., 2006). In our study, adiponectin levels in both the control and fasted groups were significantly higher in females than in males, and they increased in females but not in males in response to fasting. This result is consistent with human studies (Lundsgaard, Kiens, 2014). Adiponectin promotes insulin sensitivity in skeletal muscles, increasing Glut4 (*Slc2a4* product) translocation to plasma membrane and glucose uptake, and enhances fatty acid oxidation via AMPK-dependent mechanisms (Nicholson et al., 2018). FGF21 is known to directly stimulate adiponectin secretion in rodents, and adiponectin is required for FGF21 effects, as adiponectin-knockout mice are refractory to changes in energy expenditure evoked by FGF21 administration (Holland et al., 2013). We suggest that FGF21 is involved in the regulation of lipid metabolism gene expression in muscle via adiponectin stimulation.

In this study, we were first to show sex dimorphism in muscle gene expression and FGF21 blood levels in response to fasting. In females, more pronounced increase of FGF21 and adiponectin blood levels was positively associated with more pronounced upregulation of lipid oxidation and glucose intake gene expression.

## References

- Asarian L., Geary N. Sex differences in the physiology of eating. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013;305(11):1215-1267. DOI 10.1152/ajpregu.00446.2012.
- Foo J.P., Aronis K.N., Chamberland J.P., Paruthi J., Moon H.S., Mantzoros C.S. Fibroblast growth factor 21 levels in young healthy females display day and night variations and are increased in response to short-term energy deprivation through a leptin-independent pathway. *Diabetes Care.* 2013;36(4):935-942. DOI 10.2337/dc12-0497.
- Furler S.M., Gan S.K., Poynten A.M., Chisholm D.J., Campbell L.V., Kriketos A.D. Relationship of adiponectin with insulin sensitivity in humans, independent of lipid availability. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14(2):228-234. DOI 10.1038/oby.2006.29.
- Gasparin F.R.S., Carreño F.O., Mewes J.M., Gilgioni E.H., Pagadiggoria C.L.S., Natali M.R.M., Utsunomiya K.S., Constantin R.P., Ouchida A.T., Curti C., Gaemers I.C., Elferink R.P.J.O., Constantin J., Ishii-Iwamoto E.L. Sex differences in the development of hepatic steatosis in cafeteria diet-induced obesity in young mice. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.* 2018;1864(7):2495-2509. DOI 10.1016/j.bbadis.2018.04.004.
- Green H.J., Fraser I.G., Ranney D.A. Male and female differences in enzyme activities of energy metabolism in vastus lateralis muscle. *J. Neurol. Sci.* 1984;65(3):323-331.
- Hildebrandt A.L., Neuffer P.D. Exercise attenuates the fasting-induced transcriptional activation of metabolic genes in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000;278(6):1078-1086. DOI 10.1152/ajpendo.2000.278.6.E1078.
- Hojlund K., Frystyk J., Levin K., Flyvbjerg A., Wojtaszewski J.F., Beck-Nielsen H. Reduced plasma adiponectin concentrations may contribute to impaired insulin activation of glycogen synthase in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2006; 49(6):1283-1291. DOI 10.1007/s00125-006-0240-5.
- Holland W.L., Adams A.C., Brozinick J.T., Bui H.H., Miyauchi Y., Kusminski C.M., Bauer S.M., Wade M., Singhal E., Cheng C.C., Volk K., Kuo M.S., Gordillo R., Kharitononkov A., Scherer P.E. An FGF21-adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice. *Cell. Metab.* 2013;7(5):790-797. DOI 10.1016/j.cmet.2013.03.019.

- Kharitononkov A., Adams A.C. Inventing new medicines: The FGF21 story. *Mol. Metab.* 2013;3(3):221-229. DOI 10.1016/j.molmet.2013.12.003.
- Lundsgaard A.M., Kiens B. Gender differences in skeletal muscle substrate metabolism – molecular mechanisms and insulin sensitivity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2014;135:195. DOI 10.3389/fendo.2014.00195.
- Nicholson T., Church C., Baker D.J., Jones S.W. The role of adipokines in skeletal muscle inflammation and insulin sensitivity. *J. Inflamm. (Lond)*. 2018;15:9. DOI 10.1186/s12950-018-0185-8.
- Planavila A., Redondo-Angulo I., Ribas F., Garrabou G., Casademont J., Giral M., Villarroya F. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc. Res.* 2015;106(1):19-31. DOI 10.1093/cvr/cvu263.
- Roth S.M., Ferrell R.E., Peters D.G., Metter E.J., Hurley B.F., Rogers M.A. Influence of age, sex, and strength training on human muscle gene expression determined by microarray. *Physiol. Genomics*. 2002;10(3):181-190. DOI 10.1152/physiolgenomics.00028.2002.
- Samec S., Seydoux J., Dulloo A.G. Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? *FASEB J.* 1998a;12(9):715-724.
- Samec S., Seydoux J., Dulloo A.G. Interorgan signaling between adipose tissue metabolism and skeletal muscle uncoupling protein homologs: is there a role for circulating free fatty acids? *Diabetes*. 1998b;47(11):1693-1698.
- Thiebaut D., Jacot E., DeFronzo R.A., Maeder E., Jequier E., Felber J.P. The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man. *Diabetes*. 1982;31(11):957-963.
- Tunstall R.J., Mehan K.A., Hargreaves M., Spriet L.L., Cameron-Smith D. Fasting activates the gene expression of UCP3 independent of genes necessary for lipid transport and oxidation in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;294(2):301-308. DOI 10.1016/S0006-291X(02)00473-4.
- Zhang F., Yu L., Lin X., Cheng P., He L., Li X., Lu X., Tan Y., Yang H., Cai L., Zhang C. Minireview: Roles of fibroblast growth factors 19 and 21 in metabolic regulation and chronic diseases. *Mol. Endocrinol.* 2015;29(10):1400-1413. DOI 10.1210/me.2015-1155.
- Zhang Y., Xie Y., Berglund E.D., Coate K.C., He T.T., Katafuchi T., Xiao G., Potthoff M.J., Wei W., Wan Y., Yu R.T., Evans R.M., Kliewer S.A., Mangelsdorf D.J. The starvation hormone, fibroblast growth factor-21, extends lifespan in mice. *Elife*. 2012;1:e00065. DOI 10.7554/eLife.00065.

---

**ORCID ID**

N.A. Feofanova orcid.org/0000-0002-2591-1623

**Acknowledgements.** The study was supported by the Russian Science Foundation, project 17-15-01036. Use of the equipment of the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals at ICG SB RAS was supported by the Ministry of Education and Science of Russia (unique project identifier RFMEFI62117X0015).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received November 6, 2018. Revised December 13, 2018. Accepted December 13, 2018.

## Роль метилирования ДНК в нарушении костного метаболизма

Б.И. Ялаев<sup>1</sup>, А.В. Тюрин<sup>2</sup>, Р.Я. Миргалиева<sup>3</sup>, Р.И. Хусаинова<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия

<sup>2</sup> Башкирский государственный медицинский университет, кафедра госпитальной терапии, Уфа, Россия

<sup>3</sup> Республиканский медико-генетический центр, Уфа, Россия

e-mail: yalaev.bulat@yandex.ru

Остеопороз (ОП) является одним из многофакторных заболеваний и развивается на основе взаимодействия генетической компоненты с окружающей средой. Однако, несмотря на существенные достижения в понимании молекулярно-генетических аспектов этого заболевания и развитие методов диагностики, для остеопороза не регламентированы эпигенетические маркеры, прогнозирующие риск заболевания на доклинической стадии и позволяющие предсказать его течение и тяжесть с целью проведения профилактических мероприятий для снижения риска переломов. Расширение знаний в области биологии костной ткани, особенно в направлении генетики остеопороза и остеоиммунологии, позволило показать, что остеопороз возникает не только на основе гормональных или механических нарушений, а представляет собой сложный процесс деструкции костной ткани многофакториальной природы. Уменьшение костной массы, нарушение минерализации матрикса и изменение микроархитектуры кости могут иметь разные патогенетические схемы развития, и, кроме того, все еще остаются неизвестные звенья патогенеза ОП. Одним из таких звеньев, вероятно, является ДНК-метилирование, которое представляет собой механизм эпигенетической регуляции экспрессии генов. Ряд данных указывает на то, что этот механизм, наряду с регуляторными микроРНК и посттрансляционными модификациями, вносит существенный вклад в центральные процессы костного ремоделирования и роста костной ткани. Несмотря на это, результаты современных исследований значительно различаются, профиль метилирования ДНК у пациентов с остеопорозом не всегда воспроизводится в полногеномных исследованиях, до сих пор не определены биомаркеры первичного ОП на основе эпигенетических aberrаций, воспроизводимые в различных популяциях. Поэтому актуальной задачей является выяснение значимости накопленных данных. Цель данного обзора – обобщение и систематизация данных о роли ДНК-метилирования в костном метаболизме в норме и патологии, формировании остеопороза, оценка достижений и тенденций в этой области исследований и технологий изучения ДНК-метилирования.

Ключевые слова: остеопороз; эпигенетика; метилирование ДНК; минеральная плотность костной ткани; переломы.

**Для цитирования:** Ялаев Б.И., Тюрин А.В., Миргалиева Р.Я., Хусаинова Р.И. Роль метилирования ДНК в нарушении костного метаболизма. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):67-74. DOI 10.18699/VJ19.463

## The role of DNA methylation in the disorders of bone metabolism

B.I. Yalaev<sup>1</sup>, A.V. Tyurin<sup>2</sup>, R.Y. Mirgalieva<sup>3</sup>, R.I. Khusainova<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre RAS, Ufa, Russia

<sup>2</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

<sup>3</sup> Republican Medical-Genetic Center, Ufa, Russia

e-mail: yalaev.bulat@yandex.ru

Osteoporosis is one of multifactorial diseases, it develops from interactions between the genetic component and the environment. However, the universal epigenetic markers of osteoporosis are not yet defined. Finding the risk factors will predict the risk of osteoporosis at the preclinical stage, help define the course and severity of the disease, and develop preventive measures based on them to reduce the risk of fractures. Expanding knowledge in the field of bone biology, especially in the genetics of osteoporosis and osteoimmunology, showed that osteoporosis is a disease that occurs not only due to hormonal or mechanical disorders, but also as a clinically and genetically heterogeneous disease, and there are still unknown pathogenetic links in its structure. Decreases in bone mass and matrix mineralization as well as changes in bone microarchitecture can have different pathogenetic patterns of development and, moreover, there are unknown links of the pathogenesis of osteoporosis. It is possible that DNA methylation is one of these links and a mechanism for epigenetic regulation of gene expression. Evidence exists that this mechanism alongside regulatory miRNAs and post-translational modifications makes a significant contribution to the central processes of bone remodeling; however, the results of various studies vary greatly, and, therefore, there is a need to understand the significance of the accumulated data and to make them consistent.

The purpose of this review is to compile and systematize data on the role of DNA methylation in bone metabolism in normal and pathological conditions, in the formation of osteoporosis, and to assess achievements and trends in this field of research and technologies for studying DNA methylation.

Key words: osteoporosis; epigenetics; DNA methylation; bone mineral density; fractures.

**For citation:** Yalaev B.I., Tyurin A.V., Mirgalieva R.Y., Khusainova R.I. The role of DNA methylation in the disorders of bone metabolism. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1): 67-74. DOI 10.18699/VJ19.463 (in Russian)

## Введение

Метилирование ДНК – один из ключевых механизмов регуляции транскрипционной активности генов, эмбрионального развития, структуры хроматина, инактивации X-хромосомы, хромосомной стабильности и геномного импринтинга. Представляет собой форму ковалентной модификации ДНК без изменения ее последовательности, при которой происходит перенос метильной группы (CH<sub>3</sub>) с S-аденозилметионина в позицию 5 пиримидинового кольца цитозина. Метилирование промоторных регионов генов часто приводит к подавлению транскрипции, затрудняя связывание транскрипционных факторов, либо к их мобилизации на CpG-сайтах. Подавление процессов транскрипции и трансляции приводит к конденсации хроматина и вызывает затухание экспрессии гена в определенном участке генома (Филина и др., 2012). Помимо всего прочего, специфика метилирования ДНК тесным образом связана с процессами посттрансляционных модификаций гистонов, нуклеосомным позиционированием и неравномерным распределением генов. Ряд данных указывает на то, что конфигурация нуклеосом и их позиционирование частично регулируются через метилирование ДНК, которое способствует процессам компактизации хроматина (Reppe et al., 2015).

Процесс метилирования ДНК играет важную роль в возраст-ассоциированных заболеваниях, таких как остеопороз (ОП) – метаболическое заболевание костной ткани, возникающее в результате нарушения баланса метаболических процессов и ремоделирования костной ткани (Tarantino et al., 2017). Как показывает статистика, заболевание приводит к более чем 9 миллионам переломов в год, каждая третья женщина и каждый пятый мужчина старше 50 лет подвержены резкому увеличению риска переломов с высокой долей смертности и инвалидизации (Sozen et al., 2017). Как следствие, остеопороз считается одной из наиболее острых проблем в сфере здравоохранения и представляет серьезный социально-экономический вызов современному обществу.

В клинической практике для лечения ОП применяют фармакологические препараты, направленные либо на ингибирование процесса резорбции (антирезорбтивные препараты), либо на стимуляцию костноформирующих процессов (анаболические препараты), однако вместе с ними часто назначают витаминные комплексы с кальцием и витамином D для поддержания или увеличения прочности костей. В первом случае наиболее распространенными медикаментами являются бифосфанаты, а для стимуляции формирования костной ткани применяют препараты на основе производных фтора и др. (Tu et al., 2018). Однако, несмотря на наличие широкого спектра препаратов и методов современной диагностики, частота забо-

левания только увеличивается, и в большинстве случаев переломы наступают больных ОП до обращения в клинику, что ведет к высокой степени инвалидизации. По этой причине необходимы не только поиск универсальных биомаркеров высокого риска, но и разработка методов терапии и, если учитывать гетерогенную природу остеопороза и низкую прогностическую значимость отдельных генов, поиск и исследование взаимосвязи одновременно большого числа генов, вовлеченных в костный метаболизм в связке с их эпигенетическими регуляторами. Это позволило бы идентифицировать паттерн генетических локусов, на которые можно влиять через эпигенетические механизмы, и разработать алгоритм ранней диагностики первичного остеопороза и его таргетной терапии.

## Роль эпигенетических факторов в гомеостазе костной ткани

Наиболее ранние исследования эпигенетических факторов касательно костной ткани начались с исследований ДНК-метилирования кандидатных генов, ацетилирования гистонов и изучения профилей микроРНК, для которых уже была показана высокая роль в регуляции костного ремоделирования и, частично, в патогенезе остеопороза (Гребенникова и др., 2015).

На данный момент науке известны несколько механизмов посттрансляционных модификаций: ацетилирование, фосфорилирование, метилирование, сумоилирование, поли(ADP)(АДФ)-рибозилирование, нековалентная изомеризация пролина и дезаминирование. Результатом активности этих модификаторов является изменение структуры хроматина, при котором определенные участки либо деконденсируются, активизируя транскрипцию ДНК, либо конденсируются, значительно снижая транскрипционную активность или полностью блокируя ее. Паттерн этих модификаций образует так называемый гистоновый код, который формирует общую картину транскрипционной активности генома без изменения ее последовательности (Rojas et al., 2015).

Учитывая сложный состав костной ткани и разнообразие протекающих в ней процессов, начиная от опорной функции и заканчивая функцией резервирования ионов, таких как кальций и фосфат, очевидно, что эта ткань должна обеспечивать быстрые реакции на органические изменения и внешние стимулы, и эпигенетические факторы, вероятно, играют не последнюю роль в этой системе. Эпигенетические модификации, в свою очередь, обратимы и чувствительны к эндогенным и экзогенным стимулирующим сигналам, что оказывает влияние как на физиологические, так и на патофизиологические процессы в организме. По этой причине изменения одного или нескольких эпигенетических механизмов могут быть

связаны, в том числе, и с нарушением регуляции гомеостаза кости с последующим изменением регуляции формирования и резорбции костной ткани и процессами ее минерализации (Marini et al., 2016).

Несмотря на то что роль различных эпигенетических механизмов в патогенезе ОП обычно исследуют по отдельности, не исключен и разный уровень их синергизма. Учитывая причастность регуляторных микроРНК или посттрансляционных модификаций к большому количеству биологических процессов, очевидно, что взаимовлияния этих факторов и их изменения с ДНК-метилированием могут играть значительную роль в формировании остеопороза (Moskalev, Vaiserman, 2018).

К настоящему времени уже достоверно известно о существовании нескольких эпигенетических модификаторов, участвующих в регуляции костной ткани. Так, например, установили, что деацетилазы гистонов (HDACs), которые отвечают за регуляцию статуса ацетилирования гистонов, играют огромную роль в поддержании правильного развития скелета, пика его костной массы, накопления и поддержания костной массы в течение жизни и при старении (Marini et al., 2016).

Помимо роли ацетилирования гистонов в костном метаболизме, достаточно хорошо изучена система гистоновой метилирования – тонко настроенной антагонистической системы активности метилтрансферазы лизин гистонов и лизин-деметилазы гистонов. Речь идет о различиях модуляции дифференциации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в остеогенный или адипогенный путь, так как обнаружено, что метилтрансферазы SETDB1 и EZH2 ингибируют остеогенную дифференцировку МСК через подавление *RUNX2*, транскрипционных факторов TCF7 и Osterix (*OSX*) и способствуют тем самым адипогенезу МСК. И, напротив, метилтрансферазы KDM4B, KDM6A и KDM6B усиливают остеогенез, индуцируя транскрипцию *RUNX2*, *BMP*, *OCN*, *DLX5* и связанных HOX-генов. Однако, несмотря на важность этих процессов в формировании костной ткани, большее внимание исследователей привлекает метилирование ДНК (Ghayor, Weber, 2016).

### **Роль ДНК-метилирования в дифференцировке костных клеток и ремоделировании костной ткани**

Известно, что паттерны ДНК-метилирования могут различаться как в специализированных клетках (остеобластах, остеокластах), так и в прогениторных (стволовых клетках, детерминированных на дифференцировку в определенный тип клеток). В то же время данных об изменении уровня метилирования в тех или иных генах, вовлеченных в формирование костной ткани или патогенез остеопороза, все еще недостаточно, чтобы сформировать полную картину о роли ДНК-метилирования в гомеостазе костной ткани (Moore et al., 2013).

Установлено, что в остеобластах метилирование ДНК параллельно регулирует экспрессию нескольких генов, участвующих в функциях костных клеток (Repre et al., 2015). В частности, обнаружено, что ген щелочной фосфатазы (*ALPL*) (Cho et al., 2014), склеростина (*SOST*), *OSX* (Osterix), *DLX5* (гомеобоксный ген) (Lee et al., 2006; Zhang D. et al., 2015), эстрогенового рецептора альфа

(*ESR1*), остеопонтина (*OPN*), лиганда RANK *RANKL*, остеопротегерина (*OPG*), секретированного ферментированного белка 1 (*SFRP1*) и лептина (*LEP*) регулируются ДНК-метилированием. Метилирование промотора *ALPL* связано обратной зависимостью с транскрипцией и экспрессией ряда генов и дифференциально регулируется в разных функциональных группах клеток костной ткани. Так, в остеобластах ген *ALPL* гипометилирован, у остеоцитов метилирование повышено, а у остеокластов выражено гиперметилирование этого гена (Repre et al., 2015). Склеростин, кодируемый геном *SOST*, преимущественно экспрессируется в остеоцитах (Li et al., 2005). Первоначально этот белок считался антагонистом неклассического костного морфогенетического белка (BMP). Позднее склеростин был идентифицирован как белок, взаимодействующий с рецепторами LRP5/6 и способствующий ингибированию сигнального пути Wnt, что приводит к уменьшению образования кости. Идентифицированные CpG-сайты в гене *SOST* расположены либо близко к кодирующей последовательности, либо в предполагаемых участках связывания с транскрипционными факторами. Выявлено, что метилирование ДНК может эффективно препятствовать связыванию транскрипционных факторов, приводя к ингибированию экспрессии гена *SOST*, что коррелировало с вариабельностью минеральной плотности костной ткани (МПКТ) (Li et al., 2005). Было обнаружено, что у женщин, вне зависимости от возраста, уровень мРНК гена *SOST* и содержание сывороточного склеростина ассоциированы с возрастом, индексом массы тела и МПКТ бедренной кости ( $p < 0.0005$ ). Высказано предположение, что у женщин с остеопорозом, вероятно, включается гомеостатический механизм, уменьшающий потерю костной массы посредством усиления процессов формирования костной ткани через Wnt-сигнальную систему (Delgado-Calle et al., 2012).

Одним из малоизученных, но представляющих интерес с точки зрения ремоделирования костной ткани является тирозин-киназный рецептор ROR2. Это специфический рецептор или корецептор для WNT5A (член семейства структурно связанных генов, которые кодируют секретлируемые сигнальные липид-модифицированные гликопротеины). Промотор гена этого рецептора значительно деметилирован в ходе индукции дифференцировки прогениторных клеток костной ткани в остеобласты. Было показано, что в прогениторных клетках, которые дифференцируются в остеобласты, в отличие от зрелых остеоцитов, экспрессия гена *ROR2* увеличена в 300 раз. В настоящий момент роль и функции этого гена, а также aberrации его метилирования в костной ткани все еще остаются неизученными. Таким образом, ДНК-метилирование напрямую связано с работой данного гена, и необходимо оценить его вклад в различные звенья патогенеза костной ткани (Tarfiel et al., 2011).

В работе (Cho et al., 2014) показано, что один из членов семейства белков WNT – Wnt3a – способен активировать экспрессию двух генов: *BMP2* (морфогенетический белок 2-го типа) и *ALPL* (щелочная фосфатаза). Эти белки играют большую роль в дифференцировке остеобластов. Авторы установили, что в клетках неостеогенного пути промоторные регионы генов *BMP2* и *ALPL* высокомети-

лированы. Раскрытие механизмов этой системы может быть применено в терапии остеопороза, например, с использованием 5AzadC (азацитидин, представляет собой аналог пиримидинового нуклеозида цитидина, ключевого компонента РНК и ДНК) для деметилирования промоторных регионов генов, контролирующих или усиливающих остеогенез (Cho et al., 2014).

Похожие результаты были описаны при исследовании метилирования промоторных регионов гена транскрипционного фактора *DLX5* (гомеобокс-содержащий ген 5) и гена *OSX*, или Osterix (кодирует остеобласт-специфический транскрипционный фактор), которые были деметилированы в остеогенной линии клеток. Использование деметилирующего агента 5AzadC приводило к увеличению экспрессии этих генов. Такие же результаты получены при исследовании мультипотентных клеток пульпы зубов. После обработки культуры данных клеток 5AzadC в них повысилась активность щелочной фосфатазы и увеличилась экспрессия генов *DLX5*, *OSX* и *RUNX2*. Эксперимент с использованием мезенхимальных стволовых клеток и деметилирующих агентов, подобных 5-азацитидину, тоже приводил к усилению остеогенной дифференцировки (Zhang D. et al., 2015).

Таким образом, ДНК-метилирование имеет высокий уровень вовлеченности в процессы костного ремоделирования через систему регуляторных генов и тесно связано с генами-регуляторами роста и дифференцировки остеобластов и остеокластов, а также усилителями и ингибиторами сигнальных путей, координирующих процесс костного ремоделирования.

### Современные достижения в изучении метилирования ДНК при остеопорозе

Технологии секвенирования нового поколения позволяют системно исследовать влияние эпигенетических механизмов на регуляцию экспрессии генов. В частности, они позволяют определять профиль метилирования ДНК и общий профиль РНК одних и тех же образцов, благодаря чему можно с большой точностью определить эффекты метилирования ДНК (или микроРНК) на экспрессию одновременно большого количества генов.

В исследовании (Zhang J.G. et al., 2015) для выявления эпигенетических изменений у пациентов с остеопорозом провели измерение уровня транскриптомы и микроРНК на микрочипах, а также исследование метилома в норме и патологии (с низким уровнем МПКТ или наличием остеопоротических переломов). Сопоставив данные, авторы отобрали наиболее значимые пути и взаимодействующие гены, которые были ассоциированы с остеопорозом или вариабельностью МПКТ, после чего была построена сеть из 12 взаимодействующих генов и 11 микроРНК. Как оказалось, некоторые гены из этого модуля, такие как *PIK3R5* (регуляторная субъединица 5 фосфанозитида 3-киназы), *STAT5A* (сигнальный преобразователь и активатор транскрипции 5A) и *AKT1* (протеинкиназа B), ассоциированы с вариабельностью МПКТ и взаимосвязаны с локусами количественных признаков МПКТ. Интересно, что экспрессия этих генов закономерно снижалась с повышением уровня метилирования при переходе от группы с высоким

уровнем МПКТ к группе с низким уровнем (Zhang J.G. et al., 2015).

Командой J.A. Morris et al. (2017) было проведено крупномасштабное EWAS исследование (исследование ассоциаций эпигенома) с измерением уровня метилирования до 473 882 CpG-сайтов и его сравнением с уровнем МПКТ в нижней части шейки бедра и поясничного отдела позвоночника с выборкой объемом до 4614 человек из Европы и Северной Америки. Однако исследователи не обнаружили значимого изменения метилирования, достоверно связанного с уровнем МПКТ (Morris et al., 2017).

Примерно в это же время ассоциации были получены группой Cheishvili et al. (2018). Основной целью их исследования было найти такие участки в геноме, метилирование которых наиболее значительно ассоциировано с первичным остеопорозом у женщин и которые могли бы быть потенциальными биомаркерами раннего периода этого заболевания (Cheishvili et al., 2018). Первичный анализ генома у нормальных женщин и у женщин с ранним остеопорозом позволил выявить 4454 дифференциально метилированных CpG-сайта, а анализ метилирования ДНК двенадцати участников с прогрессирующим остеопорозом при сравнении с контрольной группой выявил 13 293 дифференциально метилированных CpG-сайта.

Вскоре после анализа данных исследователями были выделены 13 CpG-сайтов, уровень метилирования которых статистически наиболее надежно коррелировал с остеопорозом (Cheishvili et al., 2018). Некоторые из них оказались локализованы в следующих генах: *ZNF267* (белок цинкового пальца 267), *ABLIM2* (актин-связывающий белок 2-го типа), *RHOJ* (член семейства белков Ras, гомолог J), *CDKL5* (циклинзависимая киназа 5-го типа), *PDCD1* (белок запрограммированной клеточной смерти 1-го типа). *ZNF267* участвует в регуляции транскрипции многих генов и оказался гипометилирован у пациентов с остеопорозом, *ABLIM2* действует как скаффолд-белок, стимулирующий транскрипционную активность *ABRA* (кодирует актин-связывающий белок), *RHOJ* – член семейства белков RHO, участвует в процессе роста и выживания клеток PI3K/AKT/mTOR пути, его белок связан также с ангиогенезом. *CDKL5*, кодирующий циклинзависимую киназу, был гиперметилирован у всех исследуемых с остеопорозом. Другим гиперметилированным геном оказался *PDCD1*, участвующий в регуляции активности T- и B-клеток и действующий в роли индуктора клеточной смерти. Исследователи установили, что *CDKL5*, идентифицированный в данном EWAS-анализе, может вызывать посттрансляционные модификации MeCP2 – метил-CpG-связывающий белок 2, который играет одну из главных ролей при развитии синдрома Ретта. Кроме того, известно, что *RHOJ* имеет свойство понижать активность белков миозина IX класса Myo9a и Myo9b, и это представляется интересным, так как было показано, что Myo9b – ключевой регулятор поддержания функции остеокластов и отключение этого белка увеличивает активность белков Rho (Rho ГТФазы – семейство клеточных сигнальных белков, «малых» G-белков). Важно также и то, что опосредованный белками Rho путь сигналинга имеет значительное влияние на дифференциацию остеокластов. Что касается

гена *ZNF267*, который у женщин с остеопорозом гипометилирован, то предполагается, что он может блокировать активность матриксной металлопротеиназы 10 (MMP-10), участвующей в дифференцировке миобластов в остеобласты, и поскольку *ZNF267* негативно регулирует этот фермент, вероятно, он играет роль в снижении активности формирования костей. Было показано, что белок PDCD1 взаимодействует с различными компонентами иммунной системы и играет ключевую роль в периферической иммунной толерантности. Известно, что дефицит этого белка снижает остеокластогенез, препятствуя таким образом развитию остеопоротического фенотипа (Cheishvili et al., 2018).

Несмотря на данные глобальных исследований, все еще не обнаруживается четкой взаимосвязи между определенными паттернами метилирования и остеопорозом. Поэтому все чаще возникают проекты, направленные на исследование паттернов ДНК-метилирования непосредственно в костном биопсийном материале. Попытка охарактеризовать паттерны метилирования генов, которые значительно ассоциированы с вариабельностью уровня МПКТ у 84 постменопаузальных женщин, была предпринята в работе (Reppe et al., 2017). Проанализировано более 480 тыс. метилированных CpG-сайтов, для исследования отобрано 100 генов, которые непосредственно вовлечены в метаболизм МПКТ. Выяснилось, что активность генов *MEPE*, *SOST*, *WIF1* и *DKK1* – метаболических ингибиторов костной ткани, сильно коррелировала с метилированием в большом количестве CpG-сайтов в различных генах. Авторы идентифицировали 64 метилированных CpG-сайта, уровень которых достоверно различался у остеопоротических пациентов и у контрольной группы. Наиболее высокий уровень значимости был обнаружен для гена *RAD23* – гомолога В (cg14919562), пероксисомального фактора биогенеза 14 (cg14170597), тенаскина ХВ (cg03822479, *TNXB*), переносчика растворенных веществ 25 (митохондриальный переносчик железа), члена типа 37 (cg26617611, *SLC25A37*) и кислотного кластерного сортирующего белка 2 фосфофурина (cg08105005, *PACS2*). Отмечена редукция уровня метилирования в гене *RAD23* у женщин с остеопорозом, хотя у четырех женщин уровень метилирования был повышен. Для оценки влияния метилирования CpG-сайтов на уровень МПКТ в шейке бедра был применен метод линейной регрессии; обнаружено, что метилирование объясняет около 19 % вариации уровня МПКТ (Reppe et al., 2017).

Помимо измерения и ассоциации паттернов ДНК-метилирования с наличием переломов и уровнем МПКТ, предпринимаются попытки соотнести данные профиля метилирования во взаимосвязи с регуляторными последовательностями ДНК. Так, Del Real et al. (2017) решили провести подобную работу, изучив роль мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в патогенезе остеопороза. Результаты показали, что наиболее дифференциально метилированные локусы расположены в областях с энхансерной активностью, удаленных от генов и их промоторов. Эти области были связаны с ростом МСК и дифференциацией остеобластов. МСК у пациентов с переломами показали повышенную пролиферацию и повышение активности остеогенеза через активность генов *RUNX2/OSX*.

Авторы утверждают, что связь между метилированием и экспрессией переменна (Del Real et al., 2017).

Эпидемиологические исследования доказали, что возникновение и развитие ОП связано с условиями жизни в пренатальном и раннем постнатальном периоде развития ребенка. Как установлено, вес при рождении связан прямой зависимостью с костной массой в молодом и взрослом возрасте, а нарушение роста в начале постнатального развития является маркером повышенного риска перелома бедер у взрослых. Вероятно, здесь не последнюю роль играет ДНК-метилирование, однако этому не существует прямых доказательств (Harvey et al., 2014). Увеличение числа случаев переломов из-за остеопороза вызвано характерной для развитых и развивающихся стран тенденцией к увеличению продолжительности жизни и возрастанию доли людей пожилого возраста в популяции. По этой причине медицина нуждается в дальнейшем совершенствовании профилактики первичного и вторичного ОП с обязательным включением в клинику новых открытых диагностических маркеров, среди которых большое значение могут иметь эпигенетические модификаторы, в том числе ДНК-метилирование.

### Технологии изучения ДНК-метилирования

В 1969 г. Б.Ф. Ванюшиным была предложена одна из первых эпигенетических гипотез, согласно которой метилирование определенных участков гена влияет на уровень его экспрессии. Эта гипотеза легла в основу теории эпигенетики (Ванюшин, 2013). А в 1978 г. Э. Берд и его группа показали, что метилирование участков ДНК можно выявить с использованием чувствительных к метилированию ферментов, что предвосхитило начало интенсификации эпигенетических исследований (Эллис и др., 2010). С тех пор технологии исследования метилирования ДНК были значительно улучшены, и их можно разделить на три категории (Vaccarelli, 2018):

- 1) геноспецифический анализ (изучение локального метилирования). Направлен на качественное и количественное определение уровня метилирования отдельных генов;
- 2) анализ уровня глобального метилирования. Позволяет проводить количественный и качественный анализ эпигенетических маркеров одновременно в разных участках генома независимо от их локализации;
- 3) полногеномный анализ. Базирующийся на полногеномных методах исследования и технологиях микроматричного анализа (micro array), этот метод позволяет изучать одновременно большое количество известных CpG-сайтов по всему геному.

Надо отметить, что диапазон методов определения статуса ДНК-метилирования достаточно разнообразен, и в настоящее время существует большое количество подходов, включая такие технологии, как высокоэффективная жидкостная хроматография через УФ-детектор, полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ), иммуноферментный анализ, люминесцентный анализ и др. (Kurdyukov, Bullock, 2016). Существенным недостатком этих методов, с точки зрения поиска молекулярно-генетических маркеров заболеваний, является измерение общего статуса метилирования ДНК, при котором невоз-

можно оценить статус или профиль метилирования в отдельных CpG-сайтах или CpG-островках. Для того чтобы увеличить чувствительность, точность и производительность в этой области, со временем были разработаны технологии, позволяющие измерять и идентифицировать уровень метилирования ДНК с высокой точностью как в одном, так и в большом количестве CpG-сайтов (или CpG-островков). Благодаря этому можно оценить общий вклад изменения паттернов метилирования в проявление определенных фенотипических признаков одновременно в сотнях тысяч CpG-сайтов либо осуществить сравнительный анализ с профилем транскриптомы, протеомы и пр. (Kurdyukov, Bullock, 2016).

«Золотым стандартом» современных методов оценки статуса или профиля ДНК-метилирования считается бисульфитная конверсия ДНК. Этот метод предполагает предварительную процедуру денатурации ДНК, которая затем инкубируется в присутствии бисульфита, в результате чего происходит реакция сульфирования цитозина в 6-м положении. После этого проводится гидролитическое дезаминирование цитозин-сульфата, который при последующей реакции с щелочью превращается в урацил. Конвертации подвергается только неметилированный цитозин, а 5-метилцитозин не вступает в реакцию с бисульфитом, что в итоге позволяет идентифицировать и количественно определять метилированные участки генома. Служа отправной точкой, эта процедура позволила адаптировать ряд молекулярно-генетических методов для исследования ДНК-метилирования, которые часто объединяют под названием методов «бисульфитной конверсии» (Li et al., 2013). На сегодняшний день наиболее популярными среди них считаются следующие методы.

**Пиросеквенирование.** Основано на предварительной бисульфитной конверсии ДНК. В основе метода лежит амплификация интересующей последовательности, которая затем клонируется для процедуры секвенирования. Эта технология позволяет определить аллель-специфическое метилирование одновременно в большом количестве фрагментов ДНК. Как и прямое секвенирование, пиросеквенирование может быть применено для изучения глобального статуса метилирования и считается одним из наиболее эффективных методов с высокой разрешающей способностью. Его активно применяют также для анализа метилирования мобильных генетических элементов ДНК (Wong et al., 2006). Как правило, оценивают уровень метилирования LINE-элементов, так как они позволяют оценить глобальный статус метилирования из-за высокой частоты повторов и длины фрагментов. Особенно часто пиросеквеницию применяют для высокопроизводительного анализа образцов ДНК опухолевых клеток. Кроме того, ее используют для исследования метилирования импринтированных генов (Colin et al., 2016).

**Метил-специфическая ПЦР.** Один из наиболее доступных и эффективных методов исследования метилирования ДНК, позволяющий оценивать статус метилирования на любых CpG-сайтах или CpG-островках. Вначале проводится бисульфитная конверсия ДНК, затем исследователи идентифицируют изменения в исходной последовательности с использованием традиционной ПЦР с применением специфического набора праймеров

как для метилированной, так и для неметилированной ДНК. Метод был внедрен в 1996 г. Германом и его коллегами. Он удобен для анализа небольшого количества генов, содержащих CpG-динуклеотиды (Ku et al., 2011; Скрябин и др., 2013).

**Иммунопреципитация метилированной ДНК.** Этот метод позволяет оценить статус ДНК-метилирования благодаря свойству некоторых белков высокоспецифично связывать метилированный цитозин. Их разделяют на два типа: антитела, которые распознают 5-метилцитозин, и метил-CpG-связывающие белки. В случае, когда применяют первый тип белка, говорят об иммунопреципитации метилированной ДНК, а при использовании второго – об иммунопреципитации хроматина. Принципиальная схема метода такова: ДНК расщепляется физическим или рестрикционным методом, затем она осаждается с использованием белков, которые распознают 5-метилцитозин. После очистки от неспецифических фрагментов метилированная ДНК элюируется из комплексов с белками. Данный метод позволяет определить общий статус метилирования ДНК, но не позволяет установить статус метилирования CpG-динуклеотида (Gupta et al., 2010).

**HRM-анализ.** Анализ метилирования ДНК может быть проведен чувствительной к метилированию ПЦР с анализом кривой плавления высокого разрешения (Methylation-Sensitive High Resolution Melting – MS-HRM). Этот метод особенно актуален с точки зрения малого количества требуемой ДНК. В основе принципа лежит приобретение различной последовательности исследуемых участков ДНК после бисульфитной конверсии, которое позволяет выявить разный профиль кривых плавления и на основе этого идентифицировать наличие или отсутствие метилирования на определенном CpG-сайте (или CpG-островке) (Wojdacz, Dobrovic, 2007; Hussman, Hansen, 2018).

**Реал-тайм ПЦР.** Еще одним методом количественного определения метилирования является ПЦР в реальном времени MethyLight, основанная на чувствительном, количественном и специфичном определении метилированных сайтов. При этом могут использоваться Taq-Man-зонды, специфичные для метилированных или неметилированных последовательностей. ДНК также предварительно подвергают бисульфитной конверсии. MethyLight широко применяется для анализа большого количества образцов. Несмотря на высокую чувствительность к детектированию сигнала метилирования, обычный анализ MethyLight может анализировать только один ген за раз, что потенциально ограничивает анализ множественных маркеров (Susan et al., 2004; Olkhov-Mitsel et al., 2014).

**Метилочипы.** Высокопроизводительным методом является использование чиповых технологий. С их помощью возможно осуществить одновременный анализ большого количества метилированных участков. Так, компания Illumina разработала систему 450K Infinium Methylation BeadChip, содержащую более 450000 потенциально метилируемых CpG-сайтов. В данном методе ДНК на начальном этапе также подвергается бисульфитной конверсии, после чего проводится стандартная процедура гибридизации на чипах фрагментов амплифицированной ДНК (Li et al., 2013; Yi-an et al., 2013).

Технологии исследований ассоциации эпигенома (EWAS) на основе микроматричного анализа, а также технологии секвенирования следующего поколения (пиросеквенирование и пр.) считаются наиболее востребованными в области изучения эпигенетических факторов многофакторных заболеваний. В то же время для исследования небольшого числа кандидатных генов наиболее оптимальными решениями могут считаться методы HRM-анализа и метил-специфической ПЦР.

## Заключение

Идентификация ранних предикторов многофакторных заболеваний – одна из наиболее приоритетных задач современной молекулярной медицины. Как видно из описанных исследований, в метаболизм и ремоделирование костной ткани вовлечено большое количество регуляторных систем. Значимость и высокая роль метилирования ДНК в регуляторных процессах неоднократно были подтверждены многими исследованиями. Однако данный эпигенетический механизм все еще остается малоизученным в структуре ряда многофакторных заболеваний, в том числе остеопороза. Предпринято немалое количество попыток охарактеризовать aberrации ДНК-метилирования не только в исследованиях кандидатных генов, но и в глобальных исследованиях ассоциаций эпигенома человека. Прежде всего из них следует, что ДНК-метилирование – это крайне чувствительный и тканеспецифичный процесс, который может сильно варьировать в зависимости от возраста, пола, микроокружения травмированных участков и условий окружающей среды. Несмотря на полномасштабные исследования, результаты довольно сильно различаются, но из них следует, что более объективны исследования, направленные на изучение ДНК-метилирования непосредственно в самой костной ткани. При этом важно учитывать как можно большее количество микропараметров отбираемого материала, начиная от его клеточной гомогенности и заканчивая системным подходом одновременного исследования уровня экспрессии генов и их связи с другими эпигенетическими модификаторами, включая микроРНК и посттрансляционные модификации.

## Список литературы / References

Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(4/2):805-832. [Vanyushin B.F. Epigenetics today and tomorrow. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(4/2):805-832. (in Russian)]

Гребенникова Т.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Дедов И.И. Эпигенетические аспекты остеопороза. Вестн. РАМН. 2015;70(5):541-548. DOI 10.15690/vramn.v70.i5.1440. [Grebennikova T.A., Belaya Z.E., Rozhinskaya L.Y., Mel'nichenko G.A., Dedov I.I. Epigenetic aspects of osteoporosis. Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015;70(5):541-548. DOI 10.15690/vramn.v70.i5.1440. (in Russian)]

Скрябин Н.А., Кашеварова А.А., Денисов Е.В., Лебедев И.Н. Методы исследования метилирования ДНК: возможности и перспективы использования в онкологии. Сиб. онкол. журн. 2013; 6:64-60. [Skryabin N.A., Kashevarova A.A., Denisov E.V., Lebedev I.N. Methods of DNA methylation analysis: potential and limitations of their application in oncology. Sibirskii Onkologicheskii Zhurnal = Siberian Journal of Oncology. 2013;6:64-60. (in Russian)]

Филина Ю.В., Габдулхакова А.Г., Арлеевская М.И. Методы анализа метилирования ДНК. Биохимия. 2012;8:15-18. [Filina Yu.V., Gabdulhakova A.G., Arleyevskaya M.I. The methods of analysis of DNA methylation. Biokhimiya = Biochemistry. 2012; 8:15-18. (in Russian)]

Эллис С.Д., Дженуейн Т., Рейнберг Д. (ред.) Эпигенетика. М.: Техносфера, 2010. [Allis C.D., Jenuwein T., Reinberg D. (Eds.) Epigenetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. (Russ. ed.: Ellis S.D., Dzhenuyevn T., Reynberg D. (red.) Epigenetika. Moscow: Tekhnosfera Publ., 2010. (in Russian))]

Baccarelli A. Techniques for epigenetic analysis. How to apply them to human and epidemiology studies. 2018. Available at <https://cdn1.sph.harvard.edu/wp-content/uploads/sites/1291/2012/11/JacksonTutorial.pdf>

Cheishvili D., Parashar S., Mahmood N., Arakelian A., Kremer R., Goltzman D., Szyf M., Rabbani S.A. Identification of an epigenetic signature of osteoporosis in blood DNA of postmenopausal women. J. Bone Miner. Res. 2018;1-34. DOI 10.1002/jbmr.3527.

Cho Y.D., Yoon W.J., Kim W.J., Woo K.M., Baek J.H., Lee G., Ku Y., van Wijnen A.J., Ryoo H.M. Epigenetic modifications and canonical wntless/int-1 class (WNT) signaling enable transdifferentiation of nonosteogenic cells into osteoblasts. J. Biol. Chem. 2014;289(29): 20120-20128. DOI 10.1074/jbc.M114.558064.

Colin D., Sanjay K.G., Raymond Y. Analysis of DNA methylation by pyrosequencing. Methods Mol. Biol. 2016;1343:249-264. DOI 10.1007/978-1-4939-2963-4\_19.

Del Real A., Perez-Campo F.M., Fernandez A.F., Sanudo C., Ibarbia C.G., Perez-Nunez M.I., Criekinge W.V., Braspenning M., Alonso M.A., Fraga M.F., Riancho J.A. Differential analysis of genome-wide methylation and gene expression in mesenchymal stem cells of patients with fractures and osteoarthritis. Epigenetics. 2017; 12(2):113-122. DOI 10.1080/15592294.2016.1271854.

Delgado-Calle J., Sanudo C., Bolado A., Fernandez A.F., Arozamena J., Pascual-Carra M.A., Rodriguez-Rey J.C., Fraga M.F., Bonewald L., Riancho J.A. DNA methylation contributes to the regulation of sclerostin expression in human osteocytes. J. Bone Miner. Res. 2012;27(4):926-937. DOI 10.1002/jbmr.1491.

Ghayer C., Weber F.E. Epigenetic regulation of bone remodeling and its impacts in osteoporosis. Int. J. Mol. Sci. 2016;17(8):E1446. DOI 10.3390/ijms17091446.

Gupta R., Nagarajan A., Wajapeyee N. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. BioTechniques. 2010;49(4):3-11. DOI 10.2144/000113493.

Harvey N., Dennison E., Cooper C. Osteoporosis: a lifecourse approach. J. Bone Miner. Res. 2014;29(9):1917-1925. DOI 10.1002/jbmr.2286.

Hussmann D., Hansen L.L. Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM). Methods Mol. Biol. 2018;1708:551-571. DOI 10.1007/978-1-4939-7481-8\_28.

Ku J.L., Jeon Y.K., Park J.G. Methylation-specific PCR. Methods Mol. Biol. 2011;791:23-32. DOI 10.1007/978-1-61779-316-5\_3.

Kurdyukov S., Bullock M. DNA methylation analysis: choosing the right method. Biology. 2016;5(1):3. DOI 10.3390/biology5010003.

Lee J.Y., Lee Y.M., Kim M.J., Choi J.Y., Park E.K., Kim S.Y., Lee S.P., Yang J.S., Kim D.S. Methylation of the mouse Dlx5 and Osx gene promoters regulates cell type-specific gene expression. Mol. Cell. 2006;22(2):182-188.

Li P., Demirci F., Mahalingam G., Demirci C., Nakano M., Meyers B.C. An integrated workflow for DNA methylation analysis. J. Genet. Genomics. 2013;40(5):249-260. DOI 10.1016/j.jgg.2013.03.010.

Li X., Zhang Y., Kang H., Liu W., Liu P., Zhang J., Harris S.E., Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. J. Biol. Chem. 2005;280(20):19883-19887. DOI 10.1074/jbc.M413274200.

Marini F., Cianferotti L., Brandi M.L. Epigenetic mechanisms in bone biology and osteoporosis: Can they drive therapeutic choices? Int. J. Mol. Sci. 2016;17(8):1329. DOI 10.3390/ijms17081329.

- Moore L.D., Le T., Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23-28. DOI 10.1038/npp.2012.112.
- Morris J.A., Tsai P.C., Joehanes R., Zheng J., Trajanoska K., Sorensen M., Forgetta V., Castillo-Fernandez J., Frost M., Spector T.D., Christensen K., Christiansen L., Rivadeneira F., Tobias J., Evans D., Kiel D.P., Hsu Y.H., Richards J.B., Bell J.T. Epigenome-wide association of DNA methylation in whole blood with bone mineral density. *J. Bone Miner. Res.* 2017;32(8):1644-1650. DOI 10.1002/jbmr.3148.
- Moskalev A.A., Vaiserman A. (Eds.). *Epigenetics of Aging and Longevity*. London: Acad. Press, 2018.
- Olkhov-Mitsel E., Zdravic D., Kron K. Novel multiplex MethyLight protocol for detection of DNA methylation in patient tissues and bodily fluids. *Sci. Rep.* 2014;4:4432. DOI 10.1038/srep04432.
- Reppe S., Datta H., Gautvik K.M. The Influence of DNA methylation on bone cells. *Curr. Genomics*. 2015;16(6):384-392. DOI 10.2174/13892029166666150817202913.
- Reppe S., Lien T.G., Hsu Y.H., Gautvik V.T., Olstad O.K., Yu R., Bakke H.G., Lyle R., Kringen M.K., Glad I.K., Gautvik K.M. Distinct DNA methylation profiles in bone and blood of osteoporotic and healthy postmenopausal women. *Epigenetics*. 2017;12(8):674-687. DOI 10.1080/15592294.2017.1345832.
- Rojas A., Aguilar R., Henriquez B., Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S., van Wijnen A.J., van Zundert B., Allende M.L., Montecino M. Epigenetic control of the bone-master Runx2 gene during osteoblast-lineage commitment by the histone demethylase JARID1B/KDM5B. *J. Biol. Chem.* 2015;290(47):28329-28342. DOI 10.1074/jbc.M115.657825.
- Sozen T., Ozışık L., Başaran N.C. An overview and management of osteoporosis. *Eur. J. Rheumatol.* 2017;4(1):46-56. DOI 10.5152/eurjrheum.2016.048. Epub 2016 Dec 30.
- Susan E.C., Jurgen D., Nancy S.G. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(1):e10. DOI 10.1093/nar/gnh008.
- Tarantino U., Iolascon G., Cianferotti L., Masi L., Marcucci G., Giusti F., Marini F., Parri S., Feola M., Rao C., Piccirilli E., Zanetti E.B., Cittadini N., Alvaro R., Moretti A., Calafiore D., Toro G., Gimigliano F., Resmini G., Brandi M.L. Clinical guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis: summary statements and recommendations from the Italian Society for Orthopaedics and Traumatology. *J. Orthop. Traumatol.* 2017;18(Suppl.1):3-36. DOI 10.1007/s10195-017-0474-7.
- Tarfiei G., Noruzinia M., Soleimani M., Kaviani S., Mahmoodinia M.M., Farshdousti Hagh M., Pujol P. ROR2 promoter methylation change in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell J.* 2011;13(1):11-15.
- Tu K.N., Lie J.D., Wan C.K.V., Cameron M., Austel A.G., Nguyen J.K., Van K., Hyun D. Osteoporosis: A review of treatment options. *Phys. Ther.* 2018;43(2):92-104.
- Wojdacz T.K., Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): A new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):e41. DOI 10.1093/nar/gkm013.
- Wong H.L., Byun H.M., Kwan J.M., Campan M., Ingles S.A., Laird P.W., Yang A.S. Rapid and quantitative method of allele-specific DNA methylation analysis. *BioTechniques*. 2006;41(6):734-739. DOI 10.2144/000112305.
- Yi-an C., Mathieu L., Sanaa C., Darci T.B., Daria G., Brent W.Z., Steven G., Thomas J.H., Rosanna W. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium Human-Methylation450 microarray. *Epigenetic.* 2013;8(2):203-209. DOI 10.4161/epi.23470.
- Zhang D., Li Q., Rao L., Yi B., Xu Q. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J. Endod.* 2015;41(5):640-645. DOI 10.1016/j.joen.2014.12.006.
- Zhang J.G., Tan L.J., Xu C., Hao H., Qing T., Yu Z., Chuan Q., Xiang-Ding C., Hong-Wen D. Integrative analysis of transcriptomic and epigenomic data to reveal regulation patterns for BMD variation. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138524. DOI 10.1371/journal.pone.0138524.

---

#### ORCID ID

B.I. Yalaev [orcid.org/0000-0003-4337-1736](https://orcid.org/0000-0003-4337-1736)  
A.V. Tyurin [orcid.org/0000-0002-0841-3024](https://orcid.org/0000-0002-0841-3024)  
R.Y. Mirgalieva [orcid.org/0000-0003-2582-5028](https://orcid.org/0000-0003-2582-5028)  
R.I. Khusainova [orcid.org/0000-0002-8643-850X](https://orcid.org/0000-0002-8643-850X)

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received October 17, 2018. Revised November 6, 2018. Accepted November 6, 2018.

## Частота распределения генотипов полиморфизма *IL4* (rs 2243250) при псориазе и псориатическом артрите

А.А. Барило , М.В. Смольникова, С.В. Смирнова

Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия  
 e-mail: anntomsk@yandex.ru

Псориаз (ПС) и псориатический артрит (ПсА) – многофакторные заболевания, развитие которых определяется результатом сложного комбинированного взаимодействия генетической предрасположенности и факторов окружающей среды. Изучение генетического полиморфизма в зависимости от клинического течения ПС и ПсА позволит выявить единые диагностические критерии прогрессирования патологии. Целью работы было – проанализировать частоту распределения генотипов полиморфизма промоторного региона *C-590T* (rs2243250) гена *IL4* у больных псориазом и псориатическим артритом. В исследовании были включены больные псориазом ( $n = 49$ ) и псориатическим артритом ( $n = 48$ ), которые с учетом носительства определенных генотипов разделены на группы: 1 – ПС, носители генотипа *C/C IL4* (rs 2243250) ( $n = 31$ ), 2 – ПС, носители генотипов *C/T* и *T/T* ( $n = 18$ ), 3 – ПсА, носители генотипа *C/C* ( $n = 30$ ), 4 – ПсА, носители генотипов *C/T* и *T/T* ( $n = 18$ ). Выделение ДНК из цельной венозной крови проводилось при помощи стандартного набора с сорбентом. Генотипирование аллельных вариантов осуществлялось методом рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов) специфических участков генома. У больных ПС, носителей генотипа *C/C IL4* (rs 2243250), значение индекса PASI (Psoriasis Area and Severity Index) статистически значимо ниже относительно носителей генотипов *C/T* и *T/T*. Отмечена возможная ассоциация носительства генотипов *C/T* и *T/T* при ПсА с псориазом ногтей в сравнении с генотипом *C/C*. При изучении межгрупповых различий определено, что носительство генотипа *C/C* при ПсА может оказывать влияние на клиническое течение псориатического процесса с частыми обострениями и вовлечением в патологический процесс волосистой части головы с площадью поражения более 30 %. Носительство генотипов *C/T* и *T/T* при ПсА может иметь ассоциацию с феноменом Кебнера и метаболическими нарушениями в сравнении с таковыми при ПС. Определены различия в носительстве генотипов *C/C* относительно *C/T* и *T/T IL4* (rs 2243250) у больных псориазом и псориатическим артритом. С учетом крайне низкой численности групп пациентов результаты необходимо рассматривать как предварительные и требующие дальнейшей проверки, но на выборках значительно большего объема.

Ключевые слова: псориаз; псориатический артрит; полиморфизм генов; цитокины; *IL4*.

**Для цитирования:** Барило А.А., Смольникова М.В., Смирнова С.В. Частота распределения генотипов полиморфизма *IL4* (rs 2243250) при псориазе и псориатическом артрите. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):75-80. DOI 10.18699/VJ19.464

## The frequency of distribution of the genotypes of the *IL4* polymorphism (rs 2243250) in psoriasis and psoriatic arthritis

A.A. Barilo , M.V. Smolnikova, S.V. Smirnova

Scientific Research Institute for Medical Problems in the North – Division of Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the RAS”, Krasnoyarsk, Russia  
 e-mail: anntomsk@yandex.ru

Psoriasis (PS) and psoriatic arthritis (PsA) are multifactorial diseases determined by the result of complex combined interaction of genetic and environmental factors. The study of genetic polymorphism of PS and PsA will allow identification of common diagnostic criteria for the progression of pathology. The aim was to analyze the frequency of distribution of genotypes of the promoter region of the *C-590T* (rs2243250) gene *IL4* in patients with psoriasis and psoriatic. The study included patients with psoriasis ( $n = 49$ ) and psoriatic arthritis ( $n = 48$ ), which, taking into account the carriage of certain genotypes, are divided into groups: 1, PS, carriers of the *C/C* genotype ( $n = 31$ ); 2, PS, carriers of the *C/T* and *T/T* genotype ( $n = 18$ ); 3, PsA, carriers of the *C/C* genotype ( $n = 30$ ); and 4, PsA, carriers of the *C/T* and *T/T* genotype ( $n = 18$ ). DNA extraction from whole venous blood was performed using a standard kit with a sorbent. Genotyping allelic variants was carried out by the method of restriction analysis of amplification products (RFLP-analysis) of specific regions of the genome. In PS carriers of the *C/C*

*IL4* (rs2243250), the value of the PASI index is statistically significantly lower relative to the carriers of the *C/T* and *T/T* genotypes. A possible association of the carriage of the *C/T* and *T/T* genotypes in PsA with nail psoriasis was noted in comparison with the *C/C* genotype. When studying intergroup differences, it was determined that the carriage of the *C/C* genotype in PsA can influence the clinical course of the psoriatic process with frequent exacerbations and involvement of more than 30 % of the hairy part in the pathological process. The carriage of the *C/T* and *T/T* genotypes in PsA may be associated with the Koebner phenomenon and the metabolic disorders in comparison with PS. Differences in the carriage of the *C/C* genotypes relative to *C/T* and *T/T/IL4* (rs2243250) in psoriasis and psoriatic arthritis were determined. Given the extremely low number of patient groups, the results should be considered as preliminary and require further testing on much larger samples.

Key words: psoriasis; psoriatic arthritis; genes polymorphism; cytokines; *IL4*.

**For citation:** Barilo A.A., Smolnikova M.V., Smirnova S.V. The frequency of distribution of the genotypes of the *IL4* polymorphism (rs 2243250) in psoriasis and psoriatic arthritis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):75-80. DOI 10.18699/VJ19.464 (in Russian)

## Введение

Псориаз (ПС) – хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание кожи, популяционная частота которого в мире составляет от 0.6 до 4.8 % (Naldi, 2004). Системность воспалительного процесса, неуклонный рост заболеваемости, ассоциация с повышенным риском развития ишемической болезни сердца, фибрилляции предсердий, инсульта, тромбоэмболии, онкологических заболеваний обуславливают актуальность изучения псориаза (Gelfand et al., 2006; Kurd et al., 2010; Wan et al., 2013; Chiesa Fuxench et al., 2016). Псориазический артрит (ПсА) является одной из тяжелых форм псориазической болезни, которая характеризуется эрозивной деструкцией опорно-двигательного аппарата и развивается у 8–30 % больных псориазом (O’Rielly, Rahman, 2010). В подавляющем большинстве случаев воспалительный процесс в суставах при ПсА неуклонно приводит к инвалидизации больных.

Псориаз и псориазический артрит – многофакторные заболевания, развитие которых определяется результатом сложного комбинированного взаимодействия генетической предрасположенности и факторов окружающей среды (Смольникова, Смирнова, 2014). Наиболее перспективным методом исследования предрасположенности и характера течения ПС и ПсА является поиск генов-кандидатов, основанный на анализе конкретных генов, продукты экспрессии которых играют роль в развитии заболевания (Хайрутдинов, 2011). Ген интерлейкина 4 (*IL4*) – один из ключевых генов-кандидатов в результате кодирования иммунорегуляторного цитокина – медиатора воспаления, апоптоза и развития Т-лимфоцитов при ПС и ПсА (Indhumathi et al., 2017). Ген, кодирующий продукцию *IL-4*, расположен на 5q31.1 хромосоме (Bidwell et al., 1999). Известны следующие точечные полиморфизмы в промоторной области гена *IL4*: *C-1098T*, *C-590T*, *C-285T*, *A-81G*, *C-33T* (Kim et al., 2007). Полиморфизм *C-590T* (rs2243250) промоторного региона гена *IL4* имеет важное значение в патогенезе псориаза и псориазического артрита (Indhumathi et al., 2017). Наличие замены в последовательности нуклеотидов (однонуклеотидные полиморфизмы или single-nucleotide polymorphisms, SNPs) влияет на уровень экспрессии и продукции белка (определенного цитокина), что приводит к иммунологическим сдвигам, способствующим формированию патологии с определенными фенотипическими особенностями и клиническим течением (Konenkov et al., 2001). Изучение генетического полиморфизма в зависимости от клинического течения

ПС и ПсА позволит выявить единые диагностические критерии прогрессирования патологии.

Цель работы – проанализировать частоту распределения генотипов полиморфизма *IL4* (rs 2243250) у больных псориазом и псориазическим артритом европеоидов г. Красноярска.

## Материалы и методы

Объектом изучения были больные вульгарным псориазом ( $n = 49$ ) и псориазическим артритом ( $n = 48$ ), жители г. Красноярска. Больные ПС и ПсА были разделены на группы: 1 – больные ПС, носители генотипа *C/C IL4* (rs 2243250) ( $n = 31$ ), 2 – больные ПС, носители генотипов *C/T* и *T/T* ( $n = 18$ ), 3 – больные ПсА, носители генотипа *C/C* ( $n = 30$ ), 4 – больные ПсА, носители генотипов *C/T* и *T/T* ( $n = 18$ ).

Протокол обследования больных и практически здоровых людей (контрольная группа) соответствовал этическим стандартам и был разрешен комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (протокол № 12 от 10.12.2013 г.). Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным письменным согласием пациента.

Все больные соответствовали критериям включения/исключения. Критерии включения больных в исследование: наличие клинически подтвержденного вульгарного псориаза и псориазического артрита, европеоидное происхождение (три поколения), возраст от 18 до 66 лет. Критерии исключения из исследования: наличие сопутствующих декомпенсированных заболеваний, обострение сопутствующих хронических заболеваний, указание в анамнезе на терапию цитостатиками и системными глюкокортикоидами, наличие доброкачественных и злокачественных опухолей, сахарного диабета, системных и психических заболеваний, беременность и лактация.

У больных ПС и ПсА изучались следующие клинические признаки: возраст дебюта псориазических высыпаний на коже, стаж заболевания, частота обострений кожного процесса, жалобы на диспепсию и боль в области правого подреберья, наличие кожного зуда и феномена Кебнера (появление свежих высыпаний на месте повреждения кожного покрова при псориазе), псориаз ногтей, площадь поражения волосистой части головы, степень тяжести кожного процесса по индексу PASI (psoriasis area and severity index), значение индекса массы тела (ИМТ).

При подсчете индекса PASI комбинируются количественные оценки степени выраженности основных клинических проявлений (инфильтрация, зуд, утолщение кожи, отек, гиперемия, шелушение) с оценкой площади поражения по простой линейной шкале. В зависимости от значения индекса PASI выделяют: легкую степень тяжести псориаза – до 9.9 баллов включительно; от 10.0–30.0 баллов – средняя тяжесть процесса; от 30 до 72 баллов (максимально выраженные кожные проявления) – тяжелое течение псориаза. Известно, что поражение волосистой части головы у больных ПС до 30 % определяется как легкая степень тяжести, более 30 % – умеренная и тяжелая степени. В исследование были включены больные с поражением волосистой части головы более 30 %.

Исследована однонуклеотидная замена в промоторном регионе *IL4* (rs 2243250). Выделение ДНК проводилось при помощи стандартного набора для выделения ДНК из цельной венозной крови (ООО «Лаборатория МЕДИ-ГЕН», г. Новосибирск). Генотипирование аллельных вариантов осуществлялось методом рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ) специфических участков генома. Детекция продуктов выполнялась в 2 % агарозном геле.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью статистических пакетов прикладных программ Statistica 6.0. Для количественной характеристики вариации вычисляли медиану (Me) и интерквартильный размах в виде 25 и 75 перцентилей (25 %; 75 %). Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Оценку ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим фенотипом проводили по отношению шансов (ОШ) события в одной группе к шансам этого же события в другой группе с расчетом 95 % доверительного интервала (ДИ). Для сравнения качественных признаков в группах использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йетсена на непрерывность. С учетом низкой численности сравниваемых групп, а также множества выполненных тестов сравнения показателей между группами при статистическом анализе внесены поправки на множественность сравнений (поправка Бонферрони). Уровень значимости принимался при  $p < 0.0125$ .

## Результаты

В ходе проведенных нами исследований полиморфизма промоторного региона *IL4* (rs 2243250) во всех группах обследованных выявлено преобладание генотипа *C/C*, что соответствует мировым данным в других европеоидных популяциях.

Особое внимание в изучении генетических основ патологии уделяется различиям в клиническом течении заболевания и его прогрессировании. Нами проведен анализ распределения частоты генотипов *IL4* (rs 2243250) в группе больных ПС и ПсА с учетом особенностей клинического течения заболеваний.

При исследовании частоты обострений кожного синдрома на основании данных анамнеза установлено, что у больных ПС, носителей генотипа *C/C*, статистически значимо чаще отмечено обострение один-два раза в год

в сравнении с группой больных ПсА, носителей генотипа *C/C*, где чаще выявлено непрерывно-рецидивирующее течение заболевания (табл. 1).

При изучении межгрупповых различий определено, что у больных ПсА с генотипом *C/C IL4* (rs 2243250) чаще отмечены жалобы на кожный зуд в сравнении с группой больных ПС, носителей того же генотипа: 86.7 % (26) и 62.6 % (20) соответственно,  $p = 0.02$ . В группе больных ПсА, носителей генотипа *C/C*, чаще определялись диспепсические жалобы в сравнении с группой больных ПС, носителей того же генотипа: 46.7 % (14) и 19.3 % (6) соответственно,  $p = 0.02$ . Однако эти показатели, как и жалобы на боль в правом подреберье, не достигли уровня статистической достоверности. Тем не менее, согласно данным литературы, отмечена положительная корреляция между интенсивностью зуда и площадью поражения кожи у больных ПС (Szepietowski, Reich, 2016).

Частота встречаемости феномена Кебнера статистически значимо выше в группе больных ПсА, носителей генотипов *C/T* и *T/T IL4* (rs 2243250), в сравнении с группой больных ПС, носителей того же генотипа,  $p = 0.01$ . В группе больных ПсА, носителей генотипа *C/C*, феномен Кебнера встречался чаще в сравнении больными, носителями генотипов *C/T* и *T/T*, однако статистической достоверности значения не достигли,  $p = 0.05$ .

При изучении особенностей локализации псориатического процесса установлено, что в группе больных ПсА, носителей генотипа *C/C*, статистически значимо чаще встречается поражение волосистой части головы с площадью более 30 % в сравнении с группой больных ПС, носителей того же генотипа: 63.3 % (19) и 19.3 % (6),  $p = 0.0004$ .

Известно, что в патологический псориатический процесс вовлекается не только кожа, но и ее придатки – ногти. Распространенность псориатической ониходистрофии у больных ПС колеблется от 10.0 до 80.0 % (Zargari et al., 2018). При изучении особенностей клинических проявлений у больных псориатической болезнью в этой работе установлено, что псориаз ногтей статистически значимо чаще отмечен в группе больных ПсА, носителей генотипа *C/C IL4* (rs 2243250), в сравнении с группой больных ПсА, носителей генотипов *C/T* и *T/T*,  $p = 0.007$ .

В проведенном исследовании выявлены статистически значимые различия относительно степени тяжести кожного процесса и наличия метаболических нарушений у больных псориазом и псориатическим артритом с различными генотипами полиморфизма *IL4* (rs 2243250). Так, определено, что у больных ПсА носительство генотипов *C/T* и *T/T* ассоциировано с дебютом кожного процесса в зрелом возрасте, а при ПС – в молодом, однако значения статистической достоверности не достигли (табл. 2).

Установлено, что индекс охвата и тяжести псориаза PASI статистически значимо выше в группе больных ПсА, носителей генотипа *C/C IL4* (rs 2243250), и больных ПС, носителей генотипов *C/T* и *T/T*, в сравнении группой больных ПС, носителей генотипа *C/C*.

При изучении клинических показателей у больных, носителей генотипов *C/T* и *T/T*, установлено, что ИМТ статистически значимо выше в группе больных ПсА в сравнении с группой больных ПС. Следовательно, носи-

**Table 1.** Frequencies of genotypes and alleles of the *IL4* polymorphism (rs 2243250) and clinical data in psoriasis and psoriatic arthritis patients, % (n)

Clinical data	Groups				OR (95 % CI)	p
	Psoriasis		Psoriatic arthritis			
	Genotype <i>C/C IL4</i> <i>C-590T</i> (1), (n = 31)	Genotype <i>C/T</i> и <i>T/T IL4</i> <i>C-590T</i> (2), (n = 18)	Genotype <i>C/C IL4</i> <i>C-590T</i> (3), (n = 30)	Genotype <i>C/T</i> и <i>T/T IL4</i> <i>C-590T</i> (4), (n = 18)		
Course of the disease						
Psoriasis exacerbation 1–2 times a year	54.8 (17)	50.0 (9)	23.3 (7)	22.2 (4)	OR <sub>1,2</sub> = 1.21 (0.32–4.56) $\chi^2 = 0.1$ OR <sub>1,3</sub> = 3.99 (1.17–14.07) $\chi^2 = 5.09$ OR <sub>3,4</sub> = 1.07 (0.22–5.37) $\chi^2 = 0.07$ OR <sub>2,4</sub> = 3.50 (0.68–19.35) $\chi^2 = 1.93$	p <sub>1,2</sub> = 0.7 p <sub>1,3</sub> = 0.011 p <sub>3,4</sub> = 0.9 p <sub>2,4</sub> = 0.08
Nonremitting psoriasis	22.6 (7)	44.8 (8)	70.0 (21)	55.6 (10)	OR <sub>1,2</sub> = 0.36 (0.09–1.51) $\chi^2 = 1.64$ OR <sub>1,3</sub> = 0.13 (0.03–0.45) $\chi^2 = 11.96$ OR <sub>3,4</sub> = 1.87 (0.47–7.51) $\chi^2 = 0.49$ OR <sub>2,4</sub> = 0.64 (0.14–2.90) $\chi^2 = 0.11$	p <sub>1,2</sub> = 0.1 p <sub>1,3</sub> = 0.001 p <sub>3,4</sub> = 0.3 p <sub>2,4</sub> = 0.5
Clinical manifestations						
Pruritus	62.6 (20)	66.7 (12)	86.7 (26)	83.3 (15)	OR <sub>1,2</sub> = 0.91 (0.22–3.64) $\chi^2 = 0.03$ OR <sub>1,3</sub> = 0.28 (0.06–1.16) $\chi^2 = 2.93$ OR <sub>3,4</sub> = 1.3 (0.19–8.34) $\chi^2 = 0.01$ OR <sub>2,4</sub> = 0.40 (0.06–2.40) $\chi^2 = 0.59$	p <sub>1,2</sub> = 0.9 p <sub>1,3</sub> = 0.02 p <sub>3,4</sub> = 0.8 p <sub>2,4</sub> = 0.2
Koebner phenomenon	41.9 (13)	33.3 (6)	43.3 (13)	72.2 (13)	OR <sub>1,2</sub> = 1.44 (0.37–5.79) $\chi^2 = 0.09$ OR <sub>1,3</sub> = 0.94 (0.30–2.95) $\chi^2 = 0.02$ OR <sub>3,4</sub> = 0.29 (0.07–1.21) $\chi^2 = 2.71$ OR <sub>2,4</sub> = 5.20 (1.03–28.52) $\chi^2 = 4.01$	p <sub>1,2</sub> = 0.6 p <sub>1,3</sub> = 0.9 p <sub>3,4</sub> = 0.05 p <sub>2,4</sub> = 0.01
Scalp psoriasis >30 %	19.3 (6)	27.7 (5)	63.3 (19)	50.0 (9)	OR <sub>1,2</sub> = 0.62 (0.13–2.97) $\chi^2 = 0.11$ OR <sub>1,3</sub> = 0.14 (0.04–0.50) $\chi^2 = 10.44$ OR <sub>3,4</sub> = 1.73 (0.45–6.70) $\chi^2 = 0.37$ OR <sub>2,4</sub> = 0.38 (0.08–1.87) $\chi^2 = 1.05$	p <sub>1,2</sub> = 0.5 p <sub>1,3</sub> = 0.0004 p <sub>3,4</sub> = 0.4 p <sub>2,4</sub> = 0.2
Nail psoriasis	64.5 (20)	66.7 (12)	83.3 (25)	100.0 (18)	OR <sub>1,2</sub> = 0.91 (0.22–3.64) $\chi^2 = 0.03$ OR <sub>1,3</sub> = 0.36 (0.09–1.40) $\chi^2 = 1.90$ OR <sub>3,4</sub> = 0.83 (0.71–0.98) $\chi^2 = 1.80$ OR <sub>2,4</sub> = 0.67 (0.48–0.92) $\chi^2 = 5.00$	p <sub>1,2</sub> = 0.9 p <sub>1,3</sub> = 0.09 p <sub>3,4</sub> = 0.07 p <sub>2,4</sub> = 0.007
Dyspeptic complaints	19.3 (6)	33.3 (6)	46.7 (14)	38.9 (7)	OR <sub>1,2</sub> = 0.48 (0.10–2.17) $\chi^2 = 0.57$ OR <sub>1,3</sub> = 0.27 (0.07–0.98) $\chi^2 = 4.00$ OR <sub>3,4</sub> = 1.38 (0.36–5.34) $\chi^2 = 0.05$ OR <sub>2,4</sub> = 0.79 (0.16–3.77) $\chi^2 = 0.12$	p <sub>1,2</sub> = 0.3 p <sub>1,3</sub> = 0.02 p <sub>3,4</sub> = 0.6 p <sub>2,4</sub> = 0.7
Pain in the right hypochondrium	12.9 (4)	16.7 (3)	33.3 (10)	38.9 (7)	OR <sub>1,2</sub> = 0.74 (0.12–4.93) $\chi^2 = 0.13$ OR <sub>1,3</sub> = 0.30 (0.07–1.25) $\chi^2 = 2.54$ OR <sub>3,4</sub> = 0.79 (0.20–3.13) $\chi^2 = 0.01$ OR <sub>2,4</sub> = 0.31 (0.05–1.84) $\chi^2 = 1.25$	p <sub>1,2</sub> = 0.7 p <sub>1,3</sub> = 0.05 p <sub>3,4</sub> = 0.7 p <sub>2,4</sub> = 0.1

Note: Positive values of signs are shown throughout the table.

тельство генотипов *C/T* и *T/T IL4* (rs 2243250) при ПсА может быть ассоциировано с развитием метаболических нарушений.

Таким образом, при изучении межгрупповых различий установлено, что носительство генотипа *C/C IL4* (rs 2243250) при ПсА может быть ассоциировано с длительным непрерывно-рецидивирующим течением псориаза, высоким индексом PASI, наличием кожного зуда и

вовлечением в патологический процесс волосистой части головы с площадью поражения более 30 % в сравнении с псориазом. У больных ПсА, носителей генотипов *C/T* и *T/T*, статистически значимо чаще определяется изоморфная реакция Кебнера, псориаз ногтей, дебют заболевания в зрелом возрасте в сочетании с метаболическими нарушениями в сравнении с больными ПС, носителями того же генотипа.

**Table 2.** Clinical data in psoriasis and psoriatic arthritis patients with different genotypes for the *IL4* (rs 2243250), Me polymorphism [25; 75]

Clinical data	Groups				<i>p</i>
	Psoriasis		Psoriatic arthritis		
	Genotype C/C (1), (n = 31)	Genotype C/T и T/T (2), (n = 18)	Genotype C/C (3), (n = 30)	Genotype C/T и T/T (4), (n = 18)	
Age of psoriasis onset, years	27.0 (18.0; 40.0)	18.0 (16.0; 25.0)	28.0 (22.0; 43.0)	30.0 (21.0; 42.0)	$p_{1,2} = 0.07$ $p_{1,3} = 0.7$ $p_{3,4} = 0.8$ $p_{2,4} = 0.02$
Psoriasis duration, years	6.0 (1.0; 11.0)	7.5 (4.0; 15.0)	12.0 (4.0; 22.0)	16.0 (13.0; 20.0)	$p_{1,2} = 0.08$ $p_{1,3} = 0.0169$ $p_{3,4} = 0.5$ $p_{2,4} = 0.07$
PASI Score (Psoriasis area severity index)	12.1 (8.0; 16.2)	17.4 (14.4; 18.4)	17.5 (11.9; 22.4)	18.7 (16.7; 21.9)	$p_{1,2} = 0.0123$ $p_{1,3} = 0.007$ $p_{3,4} = 0.4$ $p_{2,4} = 0.1$
Body index mass, kg/cm <sup>2</sup>	24.8 (21.7; 29.7)	23.6 (22.2; 25.5)	27.1 (24.3; 30.8)	27.9 (25.5; 34.9)	$p_{1,2} = 0.6$ $p_{1,3} = 0.07$ $p_{3,4} = 0.7$ $p_{2,4} = 0.005$

Note. *p*, significance of differences according to the Mann-Whitney test.

## Обсуждение

В настоящем исследовании впервые показаны различия в клиническом течении псориатической болезни у больных ПС и ПсА, носителей генотипов C/C относительно C/T и T/T полиморфизма *IL4* (rs 2243250). Так, у больных ПС, носителей генотипа C/C, значение индекса PASI статистически значимо ниже относительно носителей генотипов C/T и T/T. В литературе имеются данные о повышении концентрации IL-4 в сыворотке крови больных ПС, носителей генотипа C/T *IL4* (rs 2243250), поэтому полученная ассоциация генотипа C/C и легкой степени тяжести ПС может быть следствием нормального уровня экспрессии гена *IL4* у носителей этого генотипа, что, вероятно, не способствует активации аутоиммунных воспалительных реакций у этой категории больных (Indhumathi et al., 2017). Данные литературы об ассоциации полиморфизма *IL4* (rs 2243250) с ПС и ПсА немногочисленны и противоречивы (O’Rielly, Rahman, 2010; Munir et al., 2015; Indhumathi et al., 2017). В азиатской популяции отмечена ассоциация аллельного варианта C\* *IL4* (rs 2243250) с развитием ПС, в то время как в индийской популяции установлена протективная роль полиморфизма C-590T (rs2243250) в отношении развития псориатических высыпаний на коже (Munir et al., 2015; Indhumathi et al., 2017). Следовательно, полученные нами результаты могут указывать на то, что имеются возможные различия полиморфизма *IL4* (rs 2243250) при определенных клинических формах ПС.

В литературе отсутствуют сведения о различиях в клиническом течении ПсА в зависимости от наличия того или иного генотипа *IL4* (rs 2243250). В проведенном нами исследовании выявлена возможная ассоциация носительства генотипов C/T и T/T *IL4* (rs 2243250) при ПсА с псориазом ногтей в сравнении с генотипом C/C. Поскольку в литературе описана прямая корреляция между наличием псориатической ониходистрофии и увеличением степени

тяжести кожного процесса, полученные нами результаты могут указывать на тенденцию к ассоциации носительства генотипов C/T и T/T с тяжелым клиническим течением псориатической болезни (Zargari et al., 2018).

При изучении межгрупповых различий определена тенденция к ассоциации носительства генотипа C/C *IL4* (rs 2243250) при ПсА с клиническим течением псориатического процесса с частыми обострениями и вовлечением в патологический процесс волосистой части головы с площадью поражения более 30 %. Следовательно, полученные нами в ходе исследования результаты могут быть связаны с тем, что ПсА, являясь тяжелой клинической формой псориатической болезни, обуславливает развитие псориатического процесса с определенными фенотипическими особенностями.

Установлено, что носительство генотипов C/T и T/T *IL4* (rs 2243250) при ПсА может иметь ассоциацию с наличием феномена Кебнера и метаболических нарушений в сравнении с ПС. Появление псориазiformных высыпаний на коже и повреждение опорно-двигательного аппарата в ответ на травму при псориазе объясняется феноменом Кебнера (изоморфная реакция), согласно которому формирование патологического псориатического очага происходит в месте повреждения кожного покрова (de Vlam et al., 2014). Повышение частоты встречаемости феномена Кебнера у больных ПсА, носителей генотипов C/T и T/T, может указывать на возможную ассоциацию хронического воспаления с носительством аллеля T\* *IL4* (rs 2243250) при артропатической форме заболевания. В литературе описана ассоциативная связь аллеля T\* полиморфизма C-590T (rs2243250) гена *IL4* с гиперпродукцией IL-4, одного из ключевых цитокинов Th2-профиля, играющего важную роль в формировании воспаления при ПС и ПсА (Cantagrel et al., 1999). Следовательно, аллель T\* *IL4* (rs 2243250) ассоциирован с повышенной продукцией IL-4

и, как следствие, с возможным развитием хронического воспаления в суставах и коже при ПсА.

В структуре коморбидных состояний ПсА важная роль отводится наличию избыточной массы тела, свидетельствующей о метаболических нарушениях, формирующихся при прогрессировании псориатической болезни. Согласно данным литературы, наличие высокого уровня ИМТ у больных Пс ассоциировано с развитием ПсА, поскольку жировая ткань играет важную роль в развитии иммунологических нарушений (Truong et al., 2015; Thrum, 2017; Feld et al., 2018). Следовательно, полученные нами результаты могут свидетельствовать о вероятной ассоциации генотипов *C/T* и *T/T IL4* (rs 2243250) с поздним дебютом ПсА в сочетании с избыточной массой тела, которая является маркером атропатической формы псориаза.

### Заключение

Определены различия в носительстве генотипов *C/C* относительно *C/T* и *T/T IL4* (rs 2243250) при псориазе и псориатическом артрите с особенностями клинических проявлений.

С учетом низкой численности групп пациентов результаты необходимо рассматривать как предварительные и требующие дальнейшей проверки с увеличением объема выборки больных.

Изучение полиморфных участков генов цитокинов, обуславливающих изменение уровня конечного продукта, в перспективе позволит усовершенствовать профилактические мероприятия по снижению риска развития тяжелых клинических форм Пс и ПсА в популяции.

### Список литературы / References

Смольникова М.В., Смирнова С.В. Генетические факторы в иммунопатогенезе псориаза и псориатического артрита. Мед. иммунология. 2014;16(3):211-220.  
[Smolnikova M.V., Smirnova S.V. Genetic factors in the immunopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology. 2014;16(3):211-220. (in Russian)]

Хайрутдинов В.Р. Генетический паспорт больного псориазом. Вестн. дерматол. и венерол. 2011;4:14-19.  
[Khairutdinov V.R. Genetic profile of psoriasis patients. Vestnik Dermatologii i Venerologii = Journal of Dermatology and Venereology. 2011;4:14-19. (in Russian)]

Bidwell J.L., Wood N.A., Morse H.R., Olomolaiye O.O., Keen L.J., Laundry G.J. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement 1. Eur. J. Immunogenet. 1999;26(2-3):135-223.

Cantagrel A., Navaux F., Loubet-Lescoulié P., Nourhashemi F., Enault G., Abbal M., Constantin A., Laroche M., Mazières B. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1999;42(6):1093-1100. DOI 10.1002/1529-0131(199906)42:6<1093::AID-ANR5>3.0.CO;2-P.

Chiesa Fuxench Z.C., Shin D.B., Ogdie Beatty A., Gelfand J.M. The risk of cancer in patients with psoriasis: a population-based cohort study in the health improvement network. JAMA Dermatol. 2016;152:282-290. DOI 10.1001/jamadermatol.2015.4847.

de Vlam K., Gottlieb A.B., Mease P.J. Current concepts in psoriatic arthritis: pathogenesis and management. Acta Derm. Venereol. 2014;94(6):627-634. DOI 10.2340/00015555-1833.

Feld J., Nissan S., Eder L., Rahat M.A., Elias M., Rimar D., Laor A., Bitterman H., Zisman D. Increased prevalence of metabolic syndrome and adipocytokine levels in a psoriatic arthritis cohort. J. Clin. Rheumatol. 2018;24(6):302-307. DOI 10.1097/RHU.0000000000000721.

Gelfand J.M., Neimann A.L., Shin D.B., Wang X., Margolis D.J., Troxel A.B. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. JAMA. 2006;296:1735-1741. DOI 10.1001/jama.296.14.1735.

Indhumathi S., Rajappa M., Chandrashekar L., Ananthanarayanan P.H., Thappa D.M., Negi V.S. T helper-2 cytokine/regulatory T-cell gene polymorphisms and their relation with risk of psoriasis in a South Indian Tamil cohort. Hum. Immunol. 2017;78(2):209-215. DOI 10.1016/j.humimm.2016.12.006.

Kim Y.K., Pyo C.W., Choi H.B., Kim S.Y., Kim T.Y., Kim T.G. Associations of IL-2 and IL-4 gene polymorphisms with psoriasis in the Korean population. J. Dermatol. Sci. 2007;48(2):133-139. DOI 10.1016/j.jdermsci.2007.06.014.

Konenkov V.I., Prokofiev V.F., Shevchenko A.V., Golovanova O.V., Smolnikova M.V. Polymorphism of immune response genes as a factor of predisposition to disease development. Russ. J. Immunol. 2001;6(2):123-130.

Kurd S.K., Troxel A.B., Crits-Christoph P., Gelfand J.M. The risk of depression, anxiety, and suicidality in patients with psoriasis: a population-based cohort study. Arch. Dermatol. 2010;146(8):891-895. DOI 10.1001/archdermatol.2010.186.

Munir S., ber Rahman S., Rehman S., Saba N., Ahmad W., Nilsson S., Mazhar K., Nalwai A.T. Association analysis of GWAS and candidate gene loci in a Pakistani population with psoriasis. Mol. Immunol. 2015;64(1):190-194. DOI 10.1016/j.molimm.2014.11.015.

Naldi L. Epidemiology of psoriasis. Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy. 2004;3:121-128.

O'Rielly D.D., Rahman P. Where do we stand with the genetics of psoriatic arthritis? Curr. Rheumatol. Rep. 2010;12(4):300-308. DOI 10.1007/s11926-010-0111-4.

Szepietowski J.C., Reich A. Pruritus in psoriasis: An update. Eur. J. Pain. 2016;20(1):41-46. DOI 10.1002/ejp.768.

Thrum S. Obesity and autoimmunity: Adipose tissue as an immune organ? Z. Rheumatol. 2017;76(4):348-350. DOI 10.1007/s00393-017-0298-0.

Truong B., Rich-Garg N., Ehst B.D., Deodhar A.A., Ku J.H., Vakil-Gilani K., Danve A., Blauvelt A. Demographics, clinical disease characteristics, and quality of life in a large cohort of psoriasis patients with and without psoriatic arthritis. Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. 2015;8:563-569. DOI 10.2147/CCID.S90270.

Wan J., Wang S., Haynes K., Denburg M.R., Shin D.B., Gelfand J.M. Risk of moderate to advanced kidney disease in patients with psoriasis: population based cohort study. BMJ. 2013;347:f5961. DOI 10.1136/bmj.f5961.

Zargari O., Leyli E.K., Azimi S.Z. Nail involvement in patients with psoriatic arthritis in Northern Iran. Autoimmune Dis. 2018;4608490. DOI 10.1155/2018/4608490.

### ORCID ID

A.A. Barilo orcid.org/0000-0001-5349-9122  
M.V. Smolnikova orcid.org/0000-0001-9984-2029  
S.V. Smirnova orcid.org/0000-0002-1197-1481

**Acknowledgements.** The authors are grateful to Prof. A.A. Savchenko, Head of the Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Research Institute for Medical Problems in the North, Krasnoyarsk, Russia.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received September 21, 2018. Revised November 29, 2018. Accepted December 11, 2018.

## Влияние облучения и наночастиц оксида марганца на гликолиз клеток глиомы человека U-87 MG

Н.Б. Илларионова<sup>1</sup>✉, Д.В. Петровский<sup>1</sup>, И.А. Разумов<sup>1, 2</sup>, Е.Л. Завьялов<sup>1, 2</sup>

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: nina.illarionova@gmail.com

Глиомы – это наиболее распространенный тип злокачественной опухоли головного мозга. Стандартное лечение глиом заключается в хирургическом иссечении опухоли с последующей химио- и радиотерапией. Опухолевые клетки характеризуются быстрым делением с потреблением большого количества глюкозы и ее расщеплением в процессе гликолиза. Для поддержания быстрого деления уровень гликолитической активности опухолевой клетки значительно увеличен по сравнению с нормальными клетками. Известно, что некоторые наночастицы (НЧ) обладают свойством накапливаться в опухолях. В частности, НЧ оксида марганца могут проникать в мозг и при значительном накоплении вызывать токсические эффекты. Эти факты послужили предпосылкой для изучения эффектов НЧ оксида марганца на жизнеспособность клеток глиомы. Целью нашей работы было исследование эффектов НЧ оксида марганца, а также их сочетания с гамма-облучением на гликолиз клеток глиомы. Облучение клеток производили на исследовательской гамма-установке радиобиологической «ИГУР-1» на основе <sup>137</sup>Cs. Уровень активности клеточного гликолиза определяли с помощью стандартного метода гликолитического стресса на приборе Seahorse XFp. Жизнеспособность клеток определяли с помощью окрашивания реагентом ViaCount живых и мертвых клеток. Подсчет клеток проводился с помощью проточной цитометрии. Мы показали, что гликолиз клеток глиомы U-87 MG значительно снижался при инкубации в течение 48 ч с НЧ оксида марганца. Облучение в комплексе с НЧ или отдельно не оказывало значительных эффектов на гликолиз глиом. Нами установлено, что через 72 ч после начала инкубации с НЧ оксида марганца жизнеспособность глиом достоверно снижалась. Данное исследование может быть полезным для разработки новой терапии и диагностики глиом.

Ключевые слова: глиома; наночастицы; оксид марганца; гликолиз.

**Для цитирования:** Илларионова Н.Б., Петровский Д.В., Разумов И.А., Завьялов Е.Л. Влияние облучения и наночастиц оксида марганца на гликолиз клеток глиомы человека U-87 MG. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):81-85. DOI 10.18699/VJ19.465

## Effects of radiation and manganese oxide nanoparticles on human glioblastoma cell line U-87 MG glycolysis

N.B. Illarionova<sup>1</sup>✉, D.V. Petrovski<sup>1</sup>, I.A. Razumov<sup>1, 2</sup>, E.L. Zavyalov<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: nina.illarionova@gmail.com

Gliomas are the most common type of malignant brain tumors. Standard treatment of gliomas consists of surgical excision of the tumor with subsequent chemotherapy and radiotherapy. Tumor cells are characterized by rapid division with an increased uptake of glucose and its catabolism during glycolysis. To maintain rapid division, the level of glycolysis of the tumor cell is significantly increased, compared with normal cells. It is known that some nanoparticles (NP) have the property of accumulating in tumors. In particular, NPs of manganese oxide can penetrate into the brain and, with considerable accumulation, cause toxic effects. These facts served as a prerequisite for studying the effects of manganese oxide NPs on the viability of glioma cells. The purpose of this work was to study the effects of manganese oxide NPs, as well as their combination with gamma irradiation on the glycolysis of glioma cells. The cells were irradiated using the research radiobiological gamma-installation IGUR-1 based on <sup>137</sup>Cs. The level of cell glycolysis was determined using the standard glycolytic stress test on a Seahorse XFp platform. Cell viability was determined using the ViaCount reagent staining of living and dead cells. Their count was performed using flow cytometry. We showed that the glycolysis of U-87 MG glioma cells was significantly reduced when incubated for 48 hours with manganese oxide NPs. Irradiation in combination with NPs or alone did not have significant effects on glycolysis of gliomas. Glioma incubation with manganese

oxide NPs for 72 hours led to a significant reduction in cell viability. This study may be useful for the development of new therapies and diagnosis of gliomas.

Key words: glioma; nanoparticles; manganese oxide; glycolysis.

**For citation:** Illarionova N.B., Petrovski D.V., Razumov I.A., Zavyalov E.L. Effects of radiation and manganese oxide nanoparticles on human glioblastoma cell line U-87 MG glycolysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):81-85. DOI 10.18699/VJ19.465 (in Russian)

## Введение

Глиомы – наиболее распространенный злокачественный тип опухолей головного мозга. Метаболизм клеток опухоли и в частности глиомы отличается от метаболизма нормальной клетки (Pavlova, Thompson, 2016). Еще в начале прошлого века Отто Г. Варбург показал, что раковые клетки в гораздо большей степени, чем нормальные клетки, производят энергию за счет гликолиза (Warburg et al., 1927). Для поддержания активного деления опухолевые клетки увеличивают захват глюкозы и глутамин и повышают уровень гликолитической активности, даже в присутствии кислорода. В соответствии с уровнем опасности для продолжительности жизни пациента выделяют четыре степени злокачественности глиом (Louis et al., 2016). Недифференцированные глиомы относят к третьему и четвертому классу злокачественности, средняя продолжительность жизни пациента после диагностики такого рода опухоли составляет 15 месяцев (Stupp et al., 2009). Линия клеток глиобластомы человека U-87 MG, которая относится к четвертому классу степени злокачественности, широко используется как модель рака головного мозга (Lenting et al., 2017). Ее метаболизм хорошо охарактеризован, в том числе в сравнении с метаболизмом астроцитов человека. В частности, установлено, что у клеток линии U-87 MG уровень гликолитической активности в три раза выше, чем у нормальных астроцитов человека (Poteet et al., 2013), а уровень активности окислительного фосфорилирования в два раза выше. Все это указывает на большие энергозатраты, которые нужны для поддержания активного деления опухолевых клеток линии U-87 MG.

Основными направлениями в терапии глиом в настоящее время являются хирургическое иссечение опухоли, химиотерапия и радиотерапия. Однако злокачественные глиомы характеризуются высокой пролиферацией и инвазивностью. Часто после проведенной терапии новый очаг опухоли возникает в стороне от прооперированной области (Claes et al., 2007). Кроме того, некоторые типы глиом становятся не респонсивны к химиотерапии (Sarkaria et al., 2008). В этой связи требуются новые подходы в терапии глиом.

Одним из активно развиваемых подходов в борьбе с опухолями является применение наночастиц (НЧ), которые имеют свойство накапливаться в опухолях (Hernandez-Pedro et al., 2013; Tzeng, Green, 2013). Проводятся исследования по созданию противоопухолевых препаратов с использованием НЧ металлов или их соединений с другими веществами или молекулами, обладающими противоопухолевой активностью (Steichen et al., 2013; Vinardell, Mitjans, 2015; Tran et al., 2017). Результаты изучения биологической активности подобных НЧ говорят о перспективности их применения в развитии методов диагностики и терапии глиом. Наночастицы захватыва-

ются клетками путем эндоцитоза и могут накапливаться во внутриклеточных везикулах (Oh, Park, 2014). Проведенный ранее анализ распределения МРТ-контраста при внутривенном введении НЧ оксида марганца показал, что НЧ накапливались главным образом в клетках глиобластомы человека U-87 MG после их ортотопической ксенотрансплантации в головной мозг иммунодефицитным мышам (Завьялов и др., 2015). В другом исследовании было показано, что НЧ оксида марганца обладали цитотоксичностью в отношении клеток U-87 MG в экспериментах *in vitro* (Razumov et al., 2017). Кроме этого, НЧ оксида марганца усиливали цитотоксические свойства гамма-облучения (Kuper et al., 2016).

В данной работе мы исследовали *in vitro* эффекты оригинальных НЧ оксида марганца ( $Mn_3O_4$ ) на жизнеспособность клеток глиомы U-87 MG, а также интенсивность процессов гликолиза в этих клетках в сравнении с гликолизом в нормальных астроцитах мышей, как после воздействия исследуемых НЧ или гамма-облучения, так и при их совместном воздействии.

## Материалы и методы

**Получение коллоидного раствора НЧ оксида марганца  $Mn_3O_4$ .** Наночастицы оксида марганца получены в лаборатории. Смесь 10 мл 0.5 М раствора  $MnCl_2$  и 15 мл 20 % раствора Полисорбата-20, а также смесь 5 мл 2 М раствора КОН и 20 мл 20 % раствора Полисорбата-20 обрабатывали ультразвуком 10 мин. Оба раствора смешивали и центрифугировали при 18000 g в течение 30 мин. Осадок трижды отмывали дистиллированной водой. Полученные НЧ хранили до начала эксперимента при температуре +4...+6 °С и перед применением обрабатывали ультразвуком (частота 20 кГц, мощность 300 Вт/л; тридцать циклов ON (30 с)/OFF (30 с)). Гидродинамический радиус полученных частиц, измеренный с помощью ZetaSizer Nano (Malvern), выявил два пика – 59 и 249 нм.

**Клеточная линия глиомы человека U-87 MG** была культивирована в среде DMEM 31885 с L-глутамином 1 мкМ, FBS 10 %, пенициллином и стрептомицином 50 мкг/мл (все реагенты GIBCO Laboratories). Эксперименты проводили между 4–10 пассажами клеток после размораживания. Клетки пересеивались по 2500 клеток/лунку в 8-луночный мини-планшет для Seahorse XFr (Agilent) за день до начала инкубации с НЧ оксида марганца. Наночастицы оксида марганца добавляли к ростовой среде в финальной концентрации 0.07 мг/мл и инкубировали с клетками 48 ч для измерения гликолиза и 72 ч для оценки жизнеспособности клеток.

**Первичные астроциты гиппокампа мыши.** Диссоциированная культура гиппокампа мыши получена из эмбрионов мышей линии C57BL/6j в возрасте 17 дней эмбрионального развития. Выделенные гиппокампы эмб-

рионов инкубировали с трипсином 0.25 % (GIBCO Laboratories) в HBSS буфере (14175-053 GIBCO Laboratories) с HEPES 20 мМ (Sigma), 37 °С, 10 мин. Затем гиппокампы были омыты в HBSS буфере с HEPES. Гиппокампы измельчали до отдельных клеток с помощью пипетирования в ростовой среде. Астроциты были посеяны по 5000 клеток/лунку в 8-луночный мини-планшет для Seahorse XFp (Agilent) в среде DMEM 31885 с L-глутамином 1 мкМ, FBS 10 %, пенициллином и стрептомицином 50 мкг/мл (все реагенты GIBCO Laboratories). Клетки выращивали в течение 8 дней. Наночастицы оксида марганца добавляли к ростовой среде в финальной концентрации 0.07 мг/мл и инкубировали с клетками 48 ч для измерения гликолиза.

**Облучение клеток глиомы человека** производили на исследовательской гамма-установке радиобиологической «ИГУР-1» на основе <sup>137</sup>Cs. Продолжительность одного сеанса облучения 1 ч. Доза облучения, полученная клетками за этот период, составила 40 Гр.

**Для исследования клеточного гликолиза** использовали стандартный протокол гликолитического стресса (Agilent). Измерение проводили на оборудовании Seahorse XFp (Agilent). Прибор измеряет скорость протонирования среды (ECAR), которое связано с экспортом лактата, производным гликолиза, вне клетки. Перед измерениями клетки проинкубировали в среде без глюкозы (1 ч). После начала измерения добавили 10 мМ глюкозы для индукции активного гликолиза. Максимальный уровень гликолитической активности достигался блокировкой окислительного фосфорилирования 1 мкМ олигомицином – ингибитором АТФ-синтазы.

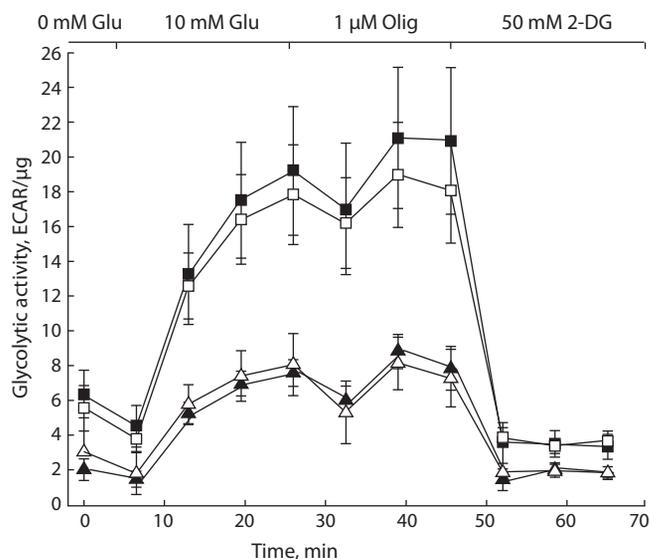
**Тест на жизнеспособность клеток** проводили методом Guava ViaCount, различающим живые и мертвые клетки (Merck). Подсчет клеток выполняли с помощью проточной цитометрии (Guava® easyCyte HT Sampling Flow Cytometer, Merck).

**Статистический анализ.** Полученные результаты обрабатывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

## Результаты и обсуждение

Важным показателем жизнеспособности клеток является их метаболизм. Поскольку метаболизм опухолевой клетки во многом связан с гликолизом, мы измеряли уровень гликолитической активности в клетках глиомы с помощью метода гликолитического стресса на приборе Seahorse XFp (Agilent). Измерения гликолиза производили через 48 ч после начала инкубации клеток в ростовой среде с НЧ марганца и через 24 ч после облучения. При добавлении 10 мМ глюкозы уровень гликолитической активности клеток U-87 MG, инкубированных с НЧ оксида марганца, был достоверно ниже по сравнению с контролем (ANOVA F(1, 36) = 15.37;  $p < 0.001$ ) (рис. 1). При последующей блокировке цепи окислительного фосфорилирования с помощью олигомицина уровень гликолитической активности контрольной группы возрос и был достоверно выше, чем уровень гликолитической активности группы, инкубированной с НЧ (ANOVA F(1, 36) = 15.04;  $p < 0.001$ ).

Интересно, что влияние радиации на клетки глиомы U-87 MG практически не отразилось на уровне их гли-



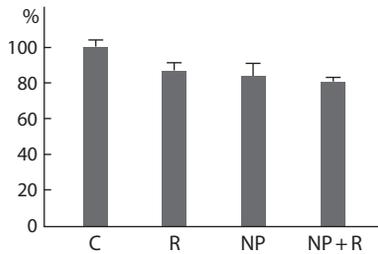
**Fig. 1.** Effect of manganese oxide nanoparticles and irradiation on glycolysis in human U-87 MG glioma cells.

Glyoma cells were incubated with manganese oxide nanoparticles for 48 h and irradiated (40 Gy) 24 h before the glycolysis assay. According to the glycolytic stress test protocol, cells were incubated without glucose (0 mM Glu). Then 10 mM glucose was added to induce active glycolysis, oxidative phosphorylation being arrested by 1 µM oligomycin (Olig) for additional glycolysis intensification. Glycolysis was terminated by adding 2-deoxyglucose (2-DG). Control measurements are designated by black squares, and measurements after irradiation, by open squares. Measurements after 48-h incubation with the nanoparticles are shown with black triangles, and measurements after the incubation and irradiation, with open triangles.

колитической активности за период наблюдения. По этому показателю контрольная группа достоверно не отличалась от группы клеток с облучением. Известно, что линия глиомы человека U-87 MG характеризуется значительной устойчивостью к облучению (Naidu et al., 2010). Базальный уровень гликолитической активности, при отсутствии глюкозы в среде, не различался достоверно между группами.

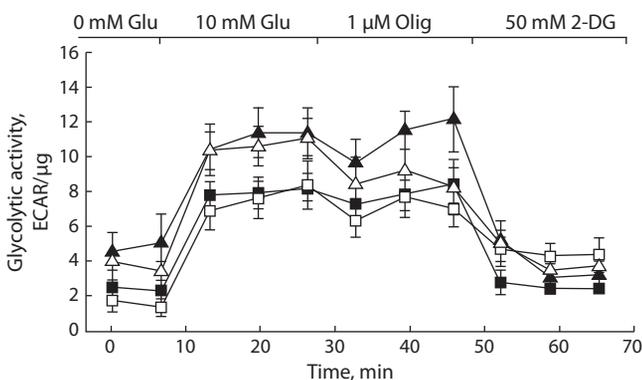
Отмечалось изменение жизнеспособности клеток на фоне изменения уровня гликолиза в клетках U-87 MG в ответ на добавление НЧ и облучение. Мы использовали дифференцированный метод окраски клеток ViaCount (Merck) на живые и мертвые клетки в культуре. Тест на жизнеспособность клеток проводился через 72 ч после начала инкубации с НЧ и через 48 ч после облучения. Результаты оценки жизнеспособности клеток глиомы U-87 MG показали, что через 72 ч после начала инкубации клеток с НЧ доля живых клеток сокращалась на 16 % (ANOVA F(1, 8) = 6.28,  $p < 0.05$ ) (рис. 2). Облучение снизило также выживаемость клеток, но эти изменения были недостоверными. Примечательно, что взаимодействия факторов облучения и инкубации с НЧ не обнаружено. Полученные результаты согласуются с представлениями о радиорезистентности клеток линии U-87 MG четвертого класса злокачественности (Naidu et al., 2010).

Наночастицы в силу своей высокой проникаемости в ткани и накопления в глиомах широко исследуются как



**Fig. 2.** The significant decrease of human glioma cell viability after incubation with manganese oxide nanoparticles (72 h).

Experimental groups of cells: control (C), irradiation (R), nanoparticles (NP), irradiation and nanoparticles (NP + R). Dead and living cells in the groups were counted with the reagent Guava ViaCount for flow cytometry. Y-axis, percentage of living cells with reference to the control.



**Fig. 3.** Effect of manganese oxide nanoparticles and irradiation on murine astrocytes incubated with manganese oxide nanoparticles for 48 h.

Designations follow Fig. 1.

потенциальные инструменты для терапии глиом (Caruso et al., 2011). Подавление гликолиза глиом является одной из стратегий усиления цитотоксических эффектов. Мы наблюдаем значительное снижение уровня гликолиза через 48 ч инкубации с НЧ оксида марганца. Далее, через 72 ч после начала инкубации, количество живых клеток снижается на 16 %. Известно, что избыток марганца имеет цитотоксичный эффект, предположительно из-за воздействия на митохондриальное дыхание. В частности, ранее было показано снижение цитозольного уровня АТФ в клетках эндотелия после 24 ч инкубации с НЧ оксида марганца (MnO) (Landgraf et al., 2015). Вместе с тем, после инкубации в течение 48 ч с НЧ оксида марганца (Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) происходит значительное снижение уровня гликолиза. Таким образом, можно заключить, что НЧ оксида марганца угнетают все системы энергообеспечения клетки глиомы, делая ее уязвимой для неблагоприятного внешнего воздействия.

Для сравнения влияния НЧ оксида марганца на нормальные клетки мозга мы использовали в качестве модели первичные астроциты мыши. Уровень гликолитической активности контрольных астроцитов мыши не отличался значительно от уровня гликолитической активности астроцитов из групп, проинкубированных с НЧ и/или облученных (рис. 3), и был меньше, чем у клеток глиомы

человека U-87 MG (см. рис. 1 и 3). Полученные данные согласуются с принятыми представлениями о повышенном уровне гликолиза в клетках опухоли.

Таким образом, воздействие НЧ оксида марганца приводило к значительному снижению уровня гликолиза клеток глиомы U-87 MG на фоне снижения их жизнеспособности, тогда как накопительная доза облучения в 40 Гр не оказывала достоверного влияния на гликолиз и жизнеспособность клеток глиомы U-87 MG. Кумулятивного эффекта от воздействия облучения и НЧ также не наблюдалось. Полученные результаты могут представлять интерес в свете разработки новых схем терапии глиом, где в качестве аддитивного угнетающего компонента при комплексной химиотерапии на опухолевые клетки могут быть использованы НЧ оксида марганца.

## Список литературы / References

- Zavyalov E.L., Razumov I.A., Gerlinskaya L.A., Romashchenko A.V. *In vivo* MPT-визуализация динамики развития глиобластомы U87 в модели ортотопической ксенотрансплантации мышам линии SCID. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015; 19(4):460-465. DOI 10.18699/J15.061.
- [Zavyalov E.L., Razumov I.A., Gerlinskaya L.A., Romashchenko A.V. *In vivo* MRI visualization of growth and morphology in the orthotopic xenotransplantation U87 glioblastoma mouse SCID model. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):460-465. DOI 10.18699/J15.061. (in Russian)]
- Caruso G., Caffo M., Alafaci C., Raudino G., Cafarella D., Lucerna S., Salpietro F.M., Tomasello F. Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas? *Nanomedicine*. 2011;7(6):744-752. DOI 10.1016/j.nano.2011.02.008.
- Claes A., Idema A.J., Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol*. 2007;114(5):443-458. DOI 10.1007/s00401-007-0293-7.
- Hernandez-Pedro N.Y., Rangel-Lopez E., Magana-Maldonado R., de la Cruz V.P., del Angel A.S., Pineda B., Sotelo J. Application of nanoparticles on diagnosis and therapy in gliomas. *Biomed. Res. Int*. 2013;351031:1-20. DOI 10.1155/2013/351031.
- Kuper K.E., Zavyalov E.L., Razumov I.A., Romashchenko A.V., Stupak A.S., Troicky S.Yu., Goldenberg B.G., Legkodymov A.G., Lemzyakov A.A., Moshkin M.P. Cytopathic effects of X-ray irradiation and MnO nanoparticles on human glioblastoma (U87). *Physics Procedia*. 2016;84:252-255. DOI 10.1016/j.phpro.2016.11.043.
- Landgraf L., Muller I., Ernst P., Schafer M., Rosman C., Schick I., Kohler O., Oehring H., Breus V.V., Basche T., Sönnichsen C., Treme W., Hilger I. Comparative evaluation of the impact on endothelial cells induced by different nanoparticle structures and functionalization. *Beilstein J. Nanotechnol*. 2015;6:300-312. DOI 10.3762/bjnano.6.28.
- Lenting K., Verhaak R., Ter Laan M., Wesseling P., Leenders W. Glioma: Experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017; 133(2):263-282. DOI 10.1007/s00401-017-1671-4.
- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-820. DOI 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Naidu M.D., Mason J.M., Pica R.V., Fung H., Pena L.A. Radiation resistance in glioma cells determined by DNA damage repair activity of Ape1/Ref-1. *J. Radiat. Res*. 2010;51(4):393-404. DOI 10.1269/jrr.09077.
- Oh N., Park J.H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine*. 2014;9(1):51-63. DOI 10.2147/IJN.S26592.

- Pavlova N.N., Thompson C.B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* 2016;23(1):27-47. DOI 10.1016/j.cmet.2015.12.006.
- Poteet E., Choudhury G.R., Winters A., Li W., Ryou M.G., Liu R., Tang L., Ghorpade A., Wen Y., Yuan F., Keir S.T., Yan H., Bigner D.D., Simpkins J.W., Yang S.H. Reversing the Warburg effect as a treatment for glioblastoma. *J. Biol. Chem.* 2013;288(13):9153-9164. DOI 10.1074/jbc.AAC118.005625.
- Razumov I.A., Zavjalov E.L., Troitskii S.Y., Romashchenko A.V., Petrovskii D.V., Kuper K.E., Moshkin M.P. Selective cytotoxicity of manganese nanoparticles against human glioblastoma cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017;163(4):561-565. DOI 10.1007/s10517-017-3849-0.
- Sarkaria J.N., Kitange G.J., James C.D., Plummer R., Calvert H., Weller M., Wick W. Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* 2008;14(10):2900-2908. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-07-1719.
- Steichen S.D., Calderera-Moore M., Peppas N.A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013;48(3):416-427. DOI 10.1016/j.ejps.2012.12.006.
- Stupp R., Hegi M.E., Mason W.P., van den Bent M.J., Taphoorn M.J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Allgeier A., Fisher B., Belanger K., Hau P., Brandes A.A., Gijtenbeek J., Marosi C., Vecht C.J., Mokhtari K., Wesseling P., Villa S., Eisenhauer E., Gorlia T., Weller M., Lacombe D., Cairncross J.G., Mirimanoff R.O. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-466. DOI 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
- Tran S., DeGiovanni P.J., Piel B., Rai P. Cancer nanomedicine: A review of recent success in drug delivery. *Clin. Transl. Med.* 2017;6(1):44. DOI 10.1186/s40169-017-0175-0.
- Tzeng S.Y., Green J.J. Therapeutic nanomedicine for brain cancer. *Ther. Deliv.* 2013;4(6):687-704. DOI 10.4155/tde.13.38.
- Vinardell M.P., Mitjans M. Antitumor activities of metal oxide nanoparticles. *Nanomaterials (Basel).* 2015;5(2):1004-1021. DOI 10.3390/nano5021004.
- Warburg O., Wind F., Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* 1927;8(6):519-530.

---

#### ORCID ID

N.B. Illarionova [orcid.org/0000-0002-5058-8776](https://orcid.org/0000-0002-5058-8776)  
I.A. Razumov [orcid.org/0000-0002-6756-1457](https://orcid.org/0000-0002-6756-1457)  
E.L. Zavyalov [orcid.org/0000-0002-9412-3874](https://orcid.org/0000-0002-9412-3874)

**Acknowledgements.** Experiments were supported by State Budgeted Project 0324-2019-0041. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (ICG SB RAS) was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received November 13, 2018. Revised December 15, 2018. Accepted December 17, 2018.

## Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов

Т.И. Дьячук , О.В. Хомякова, В.Н. Акинина, И.А. Кибкало, А.В. Поминов

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия  
 e-mail: cell\_selection@list.ru

Гаметический эмбриогенез является одной из форм тотипотентности растительной клетки, при которой клетки мужского или женского гаметофитов проявляют способность формировать эмбриониды (спорофит). Регенерация гаплоидных растений из эмбрионидов и последующее удвоение числа хромосом приводят к получению удвоенных гаплоидов, или ДН-линий. Технологии производства удвоенных гаплоидов дают возможность одноступенчатого создания гомозигот из гетерозиготных растений. Разработка эффективных гаплоидных протоколов имеет большое значение для селекции, их применение сокращает время и затраты для создания новых сортов. Микроспоровый или пыльцевой эмбриогенез используется более широко в сравнении с другими методами получения гаплоидных растений. В значительной степени это связано с большим количеством мужских гаметофитов в пределах одного пыльника по сравнению с единичными гаметофитами в зародышевом мешке. Переключение культивируемых *in vitro* микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития, как правило, индуцируется различными стрессами, применяемыми на донорные растения, соцветия, изолированные пыльники или микроспоры в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. Физические и химические предобработки (холодовой и тепловой шок, углеводное голодание, колхицин, бутанол) действуют как триггеры, индуцирующие спорофитный путь развития, и предотвращают гаметофитное развитие микроспор. Накопленные литературные данные позволяют предположить, что холодовой шок влияет фактически как антистрессовый фактор, смягчающий действие реального стресса, вызванного голоданием изолированных от растения пыльников или микроспор. Под воздействием стрессов сильновакуолизованная поляризованная микроспора трансформируется в деполяризованную и дедифференцированную клетку, что является обязательным условием для репрограммирования ее развития в спорофит (эмбрионид). В настоящем обзоре мы обобщили данные о роли различных стрессов в индукции микроспорового эмбриогенеза и некоторые возможные механизмы их действия на клеточном и молекулярном уровне. Выявление новых стрессов и способов их воздействий, повышающих потенциал микроспорового эмбриогенеза, позволит создать эффективные протоколы получения ДН-линий для их использования в селекции экономически ценных видов растений.

Ключевые слова: гаплоиды; удвоенные гаплоиды; гомозиготность; культура пыльников и микроспор; микроспоровый эмбриогенез; стрессы.

**Для цитирования:** Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Акинина В.Н., Кибкало И.А., Поминов А.В. Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):86-94. DOI 10.18699/VJ19.466

## Microspore embryogenesis *in vitro*: the role of stresses

Т.И. Djatchouk , О.В. Khomyakova, V.N. Akinina, I.A. Kibkalo, A.V. Pominov

Agricultural Research Institute of South-East Region, Saratov, Russia  
 e-mail: cell\_selection@list.ru

Gametic embryogenesis is one form of totipotency of plant cells, in which either male or female gametes are induced to form embryoids (sporophytes). Regeneration of haploid plants from embryoids and subsequent chromosome duplication result in doubled haploids and DH-lines. The production of haploids and doubled haploids (DHs) through gametic embryogenesis allows a single-stage development of complete homozygous lines from heterozygous plants. The development of effective haploid protocols to produce homozygous plants has a significant impact on plant breeding, shorting the time and costs required to establish new cultivars. There are several available methods to obtain haploids and DHs-lines, of which anther or isolated microspore culture *in vitro* are the most effective. Microspore embryogenesis is more commonly applied. This is in part because more male gametophytes are contained in a single anther compared to the single female gametophyte per embryo sac. Microspore embryogenesis is regarded as one of the most striking examples of plant cell totipotency. The switch of cultured microspores from gametophytic to sporophytic mode of development has been induced by stress treatments of various kinds applied to donor plants, inflorescences, buds, anthers or isolated microspores both *in vivo* and *in vitro*. Physical or chemical pretreatments (cold and heat shock,

sugar starvation, colchicine, n-butanol, gametocycles) act as a trigger for inducing the sporophytic pathway, preventing the gametophytic pathway development of microspore. The recent investigations have revealed that cold pretreatment during microspore reprogramming acts rather as an anti-stress factor alleviating the real stress caused by nutrient starvation of anthers or microspores isolated from donor plants. Under stress pretreatment a vacuolated and polarized microspore transformed into a depolarized and dedifferentiated cell, which is an obligatory condition for reprogramming their development. We summarize data concerning the role of various stresses in the induction of microspore embryogenesis and possible mechanisms of their action at cellular and molecular levels. Identification of new stresses allows creating efficient protocols of doubled haploid production for end-user application in the breeding of many important crops.

Key words: haploids; doubled haploids; homozygosity; anther and microspore culture; microspore embryogenesis; stresses.

**For citation:** Djatchouk T.I., Khomyakova O.V., Akinina V.N., Kibkalo I.A., Pominov A.V. Microspore embryogenesis *in vitro*: the role of stresses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):86-94. DOI 10.18699/VJ19.466 (in Russian)

## Введение

Получение гаплоидных растений в культуре *in vitro* мужских и женских генеративных структур – одно из востребованных направлений современной биотехнологии. Дальнейшее удвоение числа хромосом гаплоидов приводит к созданию гомозиготных ДН-линий. Главным их преимуществом является использование в селекции для сокращения семи-восьми половых генераций, необходимых для стабилизации гибридного генотипа. Разработаны технологии производства гаплоидов у экономически значимых видов – пшеницы, ячменя, тритикале, риса, рапса (Wędzony, 2003; Pauk et al., 2009; Weyen, 2009; Игнатова, 2011; Шмыкова и др., 2015). С их использованием создано около 300 сортов экономически значимых сельскохозяйственных культур, 150 из которых принадлежат представителям семейства Poaceae. Число сортов, выведенных с применением гаплоидных биотехнологий, постоянно увеличивается (Dunwell, 2010). В ряде регионов мира ДН-сорта становятся доминирующими. Например, в Европе 50 % возделываемых сортов ячменя получены с привлечением гаплоидных биотехнологий, тогда как в Канаде три из пяти сортов пшеницы с наибольшими площадями – это ДН-сорта (Germana, 2011).

Среди существующих различных методов продукции гаплоидных растений наибольшее практическое применение имеет культура пыльников и ее разновидность – культура изолированных микроспор. В отличие от гаметофитного, спорофитный путь развития характеризуется формированием эмбриоподобных структур (псевдозародышей) из микроспор, приводящим к формированию гаплоидных растений. Этот феномен, известный как андрогенез *in vitro* (гаплоидный эмбриогенез, микроспоровый эмбриогенез, андроклиния), возникает, когда пыльники растений, изолированные на определенной стадии развития, культивируются на относительно простых средах с гормональными добавками или без них (Круглова и др., 2005; Clement et al., 2005; Seguí-Simarro, 2010; Germana, 2011; Шмыкова и др., 2015).

Микроспоровый или пыльцевой эмбриогенез является одним из наиболее ярких примеров тотипотентности растительной клетки (Reynold, 1997; Cistué, Kasha, 2005; Seguí-Simarro, 2010). Первые сообщения об индукции спорофитного развития микроспор появились во второй половине XX века (Guha, Maheshwari, 1964). Успеш-

ная индукция микроспорового эмбриогенеза установлена более чем у 250 видов растений (Maluszynski et al., 2003).

Тем не менее до сих пор существуют ограничивающие факторы, сдерживающие широкое применение гаплоидных биотехнологий. Главные из них – генотипическая зависимость и низкая частота регенерации растений. Для многих видов злаков важнейшей проблемой гаплопродукции в культуре пыльников *in vitro* остается высокая доля альбиносных регенерантов (Soriano et al., 2008; Игнатова, 2011; Germana, 2011). Названные проблемы сдерживают разработку эффективных протоколов производства гаплоидных растений и удвоенных гаплоидов, сокращающих сроки и затраты на создание сортов по сравнению с традиционной селекцией.

Универсальных технологий получения гаплоидных растений в культуре *in vitro* пыльников (микроспор) для разных видов не существует, однако основные их этапы остаются неизменными. Они включают: выращивание и отбор донорных растений, предобработку соцветий или пыльников различными стрессовыми факторами, выделение пыльников (микроспор) и их культивирование в условиях *in vitro*, индуцирование эмбриогенеза, регенерацию растений, удвоение числа хромосом растений-регенерантов. На отзывчивость пыльников при культивировании *in vitro* влияют многочисленные эндогенные и экзогенные факторы: условия выращивания донорных растений, генотип, способы и продолжительность предобработки соцветий или пыльников, стадия развития пыльника, состав питательных сред (Smykal, 2000; Круглова и др., 2005; Wędzony et al., 2009; Игнатова, 2011; Germana, 2011).

Важной ступенью в повышении эффективности эмбриогенной (эмбриоидогенной, по (Круглова и др., 2005)) отзывчивости культивируемых пыльников является понимание механизмов индукции спорофитного развития микроспор *in vitro*. Открытие того, что стресс – это генеральный сигнал, ответственный за смену генетической программы развития микроспор и их переход на спорофитный путь развития, позволило унифицировать модель индукции микроспорового эмбриогенеза и оптимизировать многие технологии получения гаплоидных растений (Touraev et al., 1996a, 1999; Devaux, Pickering, 2005; Żur et al., 2008; Wędzony et al., 2009). По сравнению со стрес-

сом, для спорофитного развития микроспор *in vitro* даже применение гормонов может быть менее критичным, что подтверждает тот факт, что эндогенный баланс гормонов является необходимым условием для микроспорового эмбриогенеза *in vitro* (Aionesei et al., 2005).

### Характеристика микроспор как инициальных клеток спорофитного развития

Успешная индукция микроспорового эмбриогенеза *in vitro* зависит от правильной оценки состояния развития мужского гаметофита донорного растения. Морфогенетическая компетентность микроспор проявляется только на определенной стадии их развития. Для большинства видов оптимальной для смены программы развития с гаметофитной на спорофитную обозначается стадия, близкая к первому пыльцевому митозу (Babbar et al., 2004). Критической стадией развития пыльника для индукции морфогенеза *in vitro* по спорофитному пути считается стадия вакуолизированной микроспоры (Clement et al., 2005; Germana, 2011) или сильно вакуолизированной микроспоры (Круглова и др., 2005, 2017). По мнению А. Touraev с соавт. (1996а), продолжительность «эмбриогенного окна» может быть более широкой: оно начинается с фазы G1 микроспоры и продолжается до фазы G1 двухклеточного пыльцевого зерна. Точное «окно» компетентности микроспоры зависит от вида и генотипа донорного растения.

Динамизм микроспоры на стадии отбора определяет ее способность переключаться на спорофитную программу развития. Большинство спорофитно-специфических генных продуктов элиминируют к началу мейоза, а гаметоно-специфические гены транскрибируются только после первого пыльцевого митоза, что свидетельствует о нестабильном статусе микроспоры на этой стадии (Seguí-Simarro, 2010). После первого пыльцевого митоза гаметофитная программа становится необратимой – происходит формирование пыльцевого зерна (Scott et al., 1991). У некоторых видов растений *in situ* обнаружена фракция аномальных пыльцевых зерен, характеризующихся мелким размером и слабой окрашиваемостью ацетокармином. Такие пыльцевые зерна (P-pollen) могут подвергаться дополнительным делениям *in vivo*, и их последующее гаметофитное развитие тормозится. Этот феномен обозначен как пыльцевой диморфизм, он был изучен у табака, ячменя, пшеницы, ржи (Belogradova et al., 2009). Аномальные пыльцевые зерна, сформированные *in situ*, компетентны к эмбриогенезу *in vitro*, а их частота зависит от генотипа и условий выращивания растений (Heberle-Bors, Reinert, 1981).

Способность к переключению программы развития определяется особенностью структурной организации сильно вакуолизированной микроспоры, прежде всего ее хорошо выраженной полярностью. Четко выраженная полярность проявляется не только во внутреннем, но и во внешнем строении: определенном положении вакуоли (со стороны наружного полюса, обращенного к тапетуму) и ядра (со стороны внутреннего полюса, супротивно поре прорастания). Полярность отражается также в закономерном распределении цитоплазмы, ее органелл и вклю-

чений и обусловлена целым комплексом факторов, в первую очередь положением микроспоры по отношению к тканям стенки пыльника и созданием ими градиента питательных веществ (Babbar et al., 2004; Круглова и др., 2005, 2017).

По ряду признаков (наличие крупного ядра, хорошо развитой центральной вакуоли и апикально-базальной организации клетки) сильно вакуолизированная микроспора сходна с яйцеклеткой, дающей начало зиготическому зародышу при половом размножении, а также клеткам зародышевого мешка, нуцеллуса и интегументов, формирующим зародыш при апомиксисе. Это дает основание предполагать, что структура всех инициальных клеток нового индивида является универсальной при различных способах репродукции в естественных условиях и в культуре *in vitro* (Batygina, 2011).

Инициальная клетка андрогенеза *in vitro* должна рассматриваться как спорогенная клетка в критической стадии развития. Главным критерием критической стадии развития спорогенной клетки является ее чувствительность к действию экстремальных факторов, определяющая переход к морфогенезу. При этом инициальная клетка должна обладать всеми характеристиками меристематической клетки (Zorinians et al., 2005; Круглова и др., 2017). Способность сильно вакуолизированной микроспоры переключаться с гаметофитного на спорофитный путь развития позволяет рассматривать ее и как стволовую клетку. Эмбриогенная (морфогенная – термин предложен Кругловой и др. (2005)) микроспора имеет и такие свойства стволовой клетки, как тотипотентность и плюрипотентность, т.е. способность формировать различные типы тканей и органов, а также новый организм на основе различных путей морфогенеза *in vitro* (Batygina, 2011).

### Индукция спорофитного развития при воздействии стрессами

Термин стресс (от англ. *stress* – напряжение) был предложен канадским ученым-физиологом Гансом Селье в 1936 г. для описания реакции организма на любое сильное неблагоприятное воздействие. По мнению F. Vonet с соавт. (1998), микроспоровый эмбриогенез является важным адаптационным механизмом растений, который обнаруживается только в определенных условиях как следствие стрессовых воздействий.

Переключение микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития индуцируется различными стрессами, применяемыми *in vivo* и *in vitro* (Touraev et al., 1996b; Zorinians et al., 2005; Germana, 2011). Независимо от применяемого стресса, формирование эмбриогенных микроспор сопровождается следующими общими событиями: 1) увеличение объема микроспор; 2) прохождение через репликацию ДНК с задержкой клеточного цикла; 3) аутофагия цитоплазмы; 4) преобразование цитоскелета, приводящего к перемещению ядра из периферического в центральное положение; 5) формирование новой клеточной стенки; 6) компактизация хроматина; 7) изменения экспрессии генов (Aionesei et al., 2005).

Изменения в экспрессии генов могут быть сведены в три принципиальные группы: клеточная отзывчивость на стресс; супрессия гаметофитной программы и экспрессия

спорофитного развития (Pauls et al., 2006). Большое число генов, белков и метаболитов идентифицированы как прямые или косвенные триггеры в каждой из этих стадий. Морфологические, физиологические и молекулярные изменения в микроспорах, развивающихся по спорофитному пути, характерны для всех эукариотических клеток во время стрессового воздействия. Это дает основание предполагать наличие общих реакций в отзывчивости растений на стрессы (Zorinants et al., 2005).

Первый структурный сигнал индукции спорофитного развития микроспор – дедифференциация цитоплазмы. Этот процесс включает снижение числа органелл, жировых телец, крахмальных зерен и рибосом. Ядро перемещается от периферии к центру микроспоры. Одновременно вакуоль фрагментируется цитоплазматическими лучами. Отмечается менее плотная цитоплазма, отсутствие накопления крахмальных зерен, характерное для созревающих генеративных клеток. В результате формируется так называемая звездчатая структура, состоящая из цитоплазматических тяжей, соединяющих перинуклеарную и субкортикальную область цитоплазмы. Подобная морфология была отмечена на ранних стадиях культивирования микроспор тритикале (Dubas et al., 2010), риса (Raina, Irfan, 1998), пшеницы (Touraev et al., 1996b; Indrianto et al., 2001; Cistué, Kasha, 2005), табака (Touraev et al., 1996a) и других видов растений и рассматривается как начальная ступень эмбрионного развития. Таким образом, сильно вакуолизованная и поляризованная микроспора трансформируется в деполяризованную и дедифференцированную клетку. Переход на альтернативный путь развития становится необратимым (Touraev et al., 1996a, b; Segui-Simarro, 2010; Germana, 2011).

Наиболее ранним структурным маркером, предсказывающим изменение симметрии делящейся микроспоры, служит появление препрофазной ленты микротрубочек (РРВ). РРВ – кортикальное кольцо микротрубочек, которое образуется в медиальной области микроспоры через несколько часов после применения стрессового воздействия. При нормальном развитии пыльцы РРВ не формируется. Так как РРВ диктует плоскость будущего деления и участвует в стабилизации клеточной стенки, предполагается, что реорганизация микротрубочек – это ключевое событие в изменении программы развития микроспоры (Zhao et al., 1996; Cistué, Kasha, 2005; Dubas et al., 2010). Культивирование пыльников *Brassica napus* на питательной среде, содержащей колхицин, привело к увеличению числа равных делений в микроспорах, что, по мнению авторов (Zhao et al., 1996), подтверждает роль цитоскелета в их спорофитном развитии. Симметричное деление микроспоры является маркером ее эмбрионного развития (Smykal, 2000; Круглова и др., 2005; Soriano et al., 2013). Блокирование синтеза крахмала как маркера созревания пыльцы и элиминация резервов крахмала – ключевое событие в этом процессе, которое служит надежным маркером спорофитного развития микроспоры (Clement et al., 2005).

Таким образом, стрессы не только необратимо блокируют гаметофитную программу развития микроспор, но и переключают их развитие на спорофитный путь. Открытие того, что стресс служит генеральным сигналом

спорофитного развития микроспор, позволило разработать универсальную модель индукции микроспорового эмбриогенеза (Touraev et al., 1996a), включающую три основных этапа:

- необратимое блокирование гаметофитной программы развития при применении стрессовых воздействий. Это необходимо, но не единственное условие для последующего развития эмбриоидов;
- формирование популяции эмбрионных микроспор за счет изменений на молекулярном уровне;
- реализация спорофитной программы развития на питательной среде, содержащей углеводы (сахарозу).

### Пути развития эмбриоидов

В результате различных стрессовых воздействий значительная доля микроспор погибает. Незначительная их часть следует по гаметофитному пути развития с формированием коротких или длинных пыльцевых трубок (Touraev et al., 1996a). Эмбрионные клетки (микроспоры и двухклеточные пыльцевые зерна) подвергаются делениям по различным сценариям (Aionesei et al., 2005; Soriano et al., 2013).

**Деления вегетативной клетки двухклеточного пыльцевого зерна.** Роль вегетативной клетки установлена в формировании эмбриоидов табака, пшеницы, риса, кукурузы, см. обзоры (Aionesei et al., 2005; Clement et al., 2005; Germana, 2011).

**Симметричное деление микроспоры.** Такой путь приводит к образованию двух идентичных клеток в отличие от нормального асимметричного деления, предшествующего образованию пыльцевого зерна. Согласно (Clement et al., 2005), главным сигналом симметричного деления является стресс, и такому сценарию следуют «звездчатые» микроспоры. В этом случае микроспора ведет себя как зигота, и различные стадии развития эмбриоида сходны с таковыми у зиготического зародыша. Спорофитные структуры, сформированные за счет равного деления микроспоры, обнаружены у *Brassica napus* (Telmer et al., 1993), пшеницы (Indrianto et al., 2001; Круглова и др., 2005; Cistué, Kasha, 2005), табака (Eady et al., 1995).

**Деление как вегетативной, так и генеративной клеткой.** Эмбрионид, как правило, развивается за счет делений вегетативной клетки. Редкий случай участия генеративной клетки в формировании эмбриоидов был описан для белены черной *Hyoscyamus niger*. Вегетативная клетка либо не делится совсем, либо делится несколько раз с возникновением суспэнзора (Raghavan, 1976).

Доминирование одного пути развития эмбриоида над другим может происходить даже у одного вида в зависимости от типа и продолжительности стресса, стадии развития пыльника и других факторов (Wędzony et al., 2009; Germana, 2011).

Разные стадии формирования эмбриоидов, их сходства и различия с половыми зародышами приведены в публикациях (Круглова и др., 2005; Clement et al., 2005; Segui-Simarro, 2010; Soriano et al., 2013). Критическая стадия в развитии эмбриоидов – разрыв экзины. Именно в этот период обозначаются различия между генотипами, обусловленные количественной выраженностью дегенерации эмбриоидов (de Buyser, Henry, 1986).

### Применяемые стрессовые воздействия

Для изменения спорофитной и гаметофитной детерминации возможны стрессовые воздействия на донорные растения *in vivo*, при этом время воздействия может быть различным: кратковременным (на один этап развития растения) или длительным. В значительной степени это зависит от фактора воздействия, а также от вида растения. Применяется и локальное воздействие *in vitro* на пыльник или соцветие, на изолированный спорофитный комплекс. Независимо от способа воздействия, этим снимается детерминация нормального хода микроспорогенеза и развития пыльцевого зерна (Круглова и др., 2005; Aionesei et al., 2005). В обзоре (Shariatpanahi et al., 2006a) стрессы поделены на три категории: широко используемые, ничтожные и новые. К широко применяемым стрессам относят температурный шок, углеводное голодание и воздействие колхицином.

### Холодовой шок

Наибольшее распространение в опытах по производству гаплоидов у различных видов получила обработка донорных растений пониженными положительными температурами (ППТ) (2–4 °C) в течение 2–7 дней, а иногда и 3–4 недель (Игнатова, 2011; Tian et al., 2015; и др.). Фактически воздействие ППТ стало рутинной процедурой гаплопродукции во многих лабораториях мира. Воздействие пониженными положительными температурами применялось для создания гаплоидов ячменя (Oleszczuk et al., 2006), пшеницы (Игнатова, 2011), риса (Tian et al., 2015), тритикале (Wędzony, 2003), рапса (Gu et al., 2004), клементина (Chiancone, Germana, 2016). При пониженных температурах выдерживаются побеги, соцветия и изолированные пыльники, введенные в культуру (Aionesei et al., 2005; Zorinians et al., 2005; Germana, 2011). Частота формирования эмбриоидов существенно повышается. Холодовой стресс часто применяют в комбинации с осмотическим стрессом или голоданием (углеводным или азотным) (Touraev et al., 1996b, 1999).

Однако влияние ППТ на культивируемые пыльники или микроспоры не всегда однозначно. В опытах с двумя широко возделываемыми в Греции сортами пшеницы Acheloos и Vergina и их гибридами было показано, что холодовые предобработки не являются необходимыми для гаплопродукции в культуре пыльников, основную роль играют генотип донорного растения и температура культивирования пыльников (Хуниас et al., 2001).

Изучение эффекта холодового воздействия на отзывчивость культивируемых пыльников тритикале показало, что спорофитное развитие микроспор происходит и в пыльниках свежесобранных колосьев, причем у некоторых генотипов с большей частотой по сравнению с пыльниками, подвергающимися воздействию этого стресса (Дьячук и др., 2010). Инициация спорофитного развития микроспор без стрессовых воздействий была достигнута в культуре пыльников ячменя и пшеницы (Ohnoutková et al., 2000; Shariatpanahi et al., 2006b). Эти эксперименты свидетельствуют о том, что изоляция соцветий и пыльников от донорного растения, а также условия культивирования *in vitro* сами по себе могут выступать в качестве стрессов, которые без применения любых других стрессов могут

перепрограммировать дальнейшее развитие микроспор в условиях *in vitro* (Shariatpanahi et al., 2006b).

У злаков микроспоры физически прикреплены к тапетуму посредством орбикул (Круглова и др., 2005). Тапетальные клетки, окружающие микроспоры, играют важную регуляторную роль в развитии пыльцы. При воздействии ППТ микроспоры отстают от тапетума и свободно выпадают в полость гнезда пыльника, в связи с чем блокируется поступление питательных веществ и наступает голодание микроспор. Стрессом в такой ситуации являются не ППТ, а голодание микроспор, которое репрограммирует их развитие (Sunderland, Hu, 1982). Гаметофитное развитие микроспор в условиях голодания блокируется необратимо (Touraev et al., 1996a).

По мнению Sv. Zorinians с соавт. (2005), ППТ действуют не как стресс, а как «антистресс». Предобработка холодом влияет как закалывающий фактор и индуцирует целый комплекс цитологических и физиологических изменений, которые активируют систему клеточной защиты от других стрессов (Žig et al., 2008). В культуре пыльников тритикале после воздействия ППТ были обнаружены различные белки, причастные к компетенции микроспор, отзывчивости на стресс и индукцию микроспорового эмбриогенеза. Увеличилось количество белков, типичных для защиты от окислительного стресса, шаперонов и др. Функциональная классификация обнаруженных белков показала, что большую их часть составляют белки метаболизма (47%), стрессовые (28%) и запасные (9%) белки (Krzewska et al., 2017).

Выявлено повышенное содержание эндогенных аминокислот в пыльниках табака (Krogaard, Andersen, 1983) и риса (Xie et al., 1997), что связано с увеличением биосинтеза ферментов в микроспорах и изменением генетической программы их развития *in vitro*.

### Высокотемпературный стресс *in vitro*

Эффективным триггером для переключения микроспор на спорофитный путь развития является тепловой шок. Повышенные температуры культивирования пыльников пшеницы (до 32–34 °C в течение четырех дней) приводят к возрастанию продуктивности микроспорового эмбриогенеза (Touraev et al., 1996b). Кратковременные воздействия высокотемпературным стрессом – наиболее эффективный прием индукции микроспорового эмбриогенеза у видов рода *Brassica* L. (Custers et al., 1994; Шмыкова и др., 2015). Положительная роль применения повышенных температур установлена и в сочетании с другими стрессовыми факторами, например голоданием (Touraev et al., 1996a).

Тепловой шок вызывает различный спектр изменений в клетке, в частности индукцию синтеза белков теплового шока (HSPs), особенно HSP70, которые блокируют программу пыльцевой дифференциации. Чем больше температурные различия между условиями выращивания донорных растений *in vivo* и условиями культивирования *in vitro*, тем «строже» сигнал HSPs. При температурах ниже 25 °C HSPs не образуются – температуры слишком низкие для проявления отзывчивости на стресс. Таким образом, синтез HSPs может служить молекулярным маркером реакции микроспор на стресс и их способности инициировать андрогенез *in vitro* (Smykal, Pechan, 2000).

HSPs действуют как молекулярные шапероны. Активация синтеза HSPs защищает микроспоры от апоптоза, вызываемого высокими температурами. Блокируя апоптоз, HSPs могут способствовать выживанию клеток с «перепрограммированным» геномом и переключению микроспор на спорофитный путь развития. Синтез HSPs препятствует синтезу белков, необходимых для дальнейшей дифференциации микроспор в пыльцу (Zorinians et al., 2005). Сравнение паттернов фосфорилированных белков в эмбрионных и неэмбрионных микроспорах *Brassica napus* L. показало более высокий уровень фосфорилирования HSP70 в эмбрионных микроспорах. Изменения в синтезе, транслокации и фосфорилировании этого белка связаны с переключением микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития (Cordewener et al., 1994).

### Углеводное голодание

Углеводное голодание представляет собой эффективный прием индуцирования микроспорового эмбриогенеза. Примечательно, что этот вид стресса может быть применен не только для изолированных микроспор, но и для изолированных пыльников, соцветий или целого растения (Heberle-Bors, 1989). Углеводный статус растения служит одним из наиболее значимых факторов, определяющих развитие микроспор и формирование фертильной пыльцы *in vivo* (Corbesier et al., 1998). Голодание вызывает различные клеточные преобразования *in vitro*: задержку роста клетки, быстрое потребление клеточных углеводов, деградацию липидов и жиров, накопление свободных аминокислот, снижение гликолитической активности ферментов (Zorinians et al., 2005). Морфологические и физиологические изменения микроспоры при углеводном голодании типичны для аутофагных клеток *in vivo* – наблюдается дедифференциация пластид, деградация ламеллярной структуры, исчезновение крахмала, появление большой вакуоли (Garrido et al., 1995). Дополнительный стресс (высокие и низкие температуры), а также продолжительность голодания блокируют гаметофитное развитие и способствуют эмбрионному развитию микроспор (Tougaev et al., 1996a).

Положительный эффект при замене сахарозы на мальтозу в культуре пыльников пшеницы связан с замедленным гидролизом мальтозы, что вызывает стресс голодания и индукцию микроспорового эмбриогенеза (Indrianto et al., 1999; Redha, Talaat, 2008). Вид применяемого стресса голодания повлиял на число и соотношение альбиносных и зеленых растений ячменя, их фертильность. Наибольшее число зеленых растений было получено при применении маннитола (0.3 М) при температуре 32 °С в течение 24 ч (Oleszczuk et al., 2006).

При углеводном голодании наблюдаются количественные и качественные изменения в активности протеинкиназ *in vitro*. Вероятно, протеинкиназы вовлекаются в трансдукцию сигнала, вызванного эффектом голодания, и влияют на экспрессию генов и регуляцию клеточного цикла (Garrido et al., 1995). Голодание вызывает экспрессию генов HSPs *in vitro*, что подтверждает роль молекулярных шаперонов в клеточном перепрограммировании (Wang et al., 1999; Varnier et al., 2009).

Важную роль в адаптации к стрессам играет абсцизовая кислота (АБК). В культивируемых пыльниках ячменя, подвергнутых голоданию и осмотическому стрессу, содержание АБК увеличилось в два раза и коррелировало с жизнеспособностью микроспор. Накопление АБК может рассматриваться как сигнальный фактор переключения развития микроспор на альтернативный путь развития (Wang et al., 2000). Предполагается, что защитная функция АБК возникла в результате стабилизации клеточных мембран и инициации защиты к окислительному стрессу (Prasad et al., 1994; Wang et al., 2000; Žur et al., 2008).

### Колхицин

Колхицин как агент, индуцирующий спорофитное развитие микроспор, успешно применялся в культуре пыльников и изолированных микроспор тритордеум (Barceló et al., 1994), пшеницы (Redha, Talaat, 2008), кукурузы (Saisington et al., 1996), тритикале (Arzany, Darvey, 2001), рапса (Mohammadi et al., 2012). Использование колхицина в составе индукционной питательной среды для культивирования пыльников пшеницы в концентрации 0.02 и 0.04 % в течение нескольких первых часов культивирования вызвало изменения симметрии деления за счет супрессии формирования микротрубочек, что привело к увеличению частоты симметрично делящихся микроспор (Barnabás et al., 1991). В культуре пыльников кукурузы наибольший успех в индукции эмбрионного развития микроспор достигнут в случае комбинированного применения пониженных положительных температур (на донорный материал) и колхицина в сочетании с ТИВА в качестве регулятора роста в составе питательной среды (Obert, Barnabás, 2004). Эффект воздействия колхицина на формирование эмбриоидов и зеленых растений зависит от генотипа (Redha, Talaat, 2008).

Колхицин связывает  $\alpha$ - и  $\beta$ -гетеродимеры тубулина, их дальнейшее присоединение к микротрубочкам ингибируется, что вызывает деполимеризацию и перемещение ядра от периферии к центру микроспоры. Реорганизация цитоскелета приводит к потере асимметрии микроспоры и блокированию гаметофитного развития (Zhao et al., 1996; Babbar et al., 2004; Aionesei et al., 2005; Clement et al., 2005). Показана связь микротрубочек с циклин-зависимыми киназами (*cdc2*), которые участвуют в смене фаз клеточного цикла (Weingartner et al., 2001). Уровень накопления белка *cdc2* связан с пролиферативной активностью клеток (John et al., 1990). Предполагается, что ингибирование формирования веретена деления колхицином может влиять на биосинтез белка *cdc2* в микроспорах и их переключение на спорофитный путь развития (Zorinians et al., 2005).

### n-Бутанол

Бутиловый спирт (n-бутанол) – представитель одноатомных спиртов. Применение n-бутанола в составе питательной среды в концентрации 0.1–0.2 % в течение 5 ч у двух сортов мягкой пшеницы Pavon и Saramba привело к увеличению выхода эмбриоидов. В сравнимых экспериментах число зеленых растений на 100 пыльников увеличилось со 121 до 300 у сорта Pavon и с 46 до 90 у сорта Saramba. Выход удвоенных гаплоидов был увеличен в два раза в сравнении с контролем (Soriano et al., 2008).

Позднее положительный эффект *n*-бутанола в составе питательных сред в сходных концентрациях был подтвержден в культуре пыльников мягкой пшеницы (Broughton, 2011), кукурузы (Földesiné et al., 2011; Fábíán et al., 2015) и ячменя (Castillo et al., 2014). В культуре пыльников кукурузы совместная обработка *n*-бутанолом и пониженными температурами увеличила частоту отзывчивых пыльников у слабо отзывчивых генотипов. При комбинировании этих обработок выход эмбриоидов составил 20.9 % по сравнению с 0.5 % в контроле (Fábíán et al., 2015).

Применение *n*-бутанола в комбинации с маннитолом привело к увеличению эмбриоидов и зеленых растений в культуре пыльников слабо отзывчивых сортов ячменя. У сортов Astoria и Majestic число полученных эмбриоидов увеличилось в два раза, а число зеленых растений – в три раза (Castillo et al., 2014). Однако позитивный эффект *n*-бутанола в культуре пыльников слабо отзывчивых сортов ячменя был ниже, чем у слабо отзывчивых сортов пшеницы, у которой выход зеленых растений был увеличен в 14–27 раз (Broughton, 2011). У обоих видов эффект *n*-бутанола был выше у низко отзывчивых сортов. Показан аддитивный эффект маннитола и *n*-бутанола на микроспоровый эмбриогенез ячменя (Castillo et al., 2014).

Положительный эффект *n*-бутанола приписывают его способности разрушать кортикальные микротрубочки. Микротрубочки поддерживают поляризованный статус цитоплазмы, поэтому их разрушение нарушает поляриность микроспор и приводит к их симметричному делению. Изменения в симметрии первого деления могут влиять на экспрессию генов и модифицировать путь развития дочерних клеток. Важным структурным изменением клетки, вызываемым *n*-бутанолом, является формирование аномальной клеточной стенки (Fábíán et al., 2015).

## Заключение

Для внедрения ДН-технологий в селекционный процесс требуются воспроизводимые и недорогие технологии производства гаплоидных растений. Несмотря на то, что достигнуты значительные успехи в получении гаплоидов на основе микроспорового эмбриогенеза *in vitro* у многих видов (ячмень, рапс, пшеница и др.), другие виды и даже различные генотипы одного вида остаются «трудноотзывчивыми». Выявление новых стрессов и способов их воздействий, повышающих потенциал микроспорового эмбриогенеза, позволит создать эффективные генотип-независимые протоколы генерирования ДН-линий для их использования в селекции экономически ценных видов.

## Список литературы / References

Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Дугина Т.В. Цитология спорофитно развивающихся микроспор в культуре пыльников тритикале без холодового воздействия. С.-х. биология. 2010;5:61-65. [Dyatchouk T.I., Khomyakova O.V., Dugina T.V. Cytology of sporophytic microspore development in triticale anther culture without cold pretreatment. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2010;5:61-65. (in Russian)]  
Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011.

[Ignatova S.A. Cell Technologies in Plant Industry, Genetics, and Breeding of Cultivated Plants: Tasks, Opportunities, and Development of *in vitro* Systems. Odessa: Astroprint Publ., 2011. (in Russian)]  
Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. Отв. ред. И.И. Шамров. М.: Наука, 2005.  
[Shamrov I.I. (Ed.) / Kruglova N.N., Batygina T.B., Gorbunova V.Yu. Embryological Bases of Wheat Androclinesis. Moscow: Nauka Publ., 2005. (in Russian)]  
Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Морфогенная микроспора как инициальная клетка андрогенеза *in vitro*: обзор проблемы. Научный результат. Физиология. 2017;3(1):3-7. DOI 10.18413/2409-0298-2017-3-1-3-7.  
[Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Morphogenic microspore as an initial cell of androgenesis *in vitro*: Review of the problem. Nauchnyy Rezultat. Fiziologiya = Scientific Result. Physiology. 2017;3(1):3-7. DOI 10.18413/2409-0298-2017-3-1-3-7. (in Russian)]  
Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):111-120. DOI 10.18699/VJ15.014.  
[Shmykova N.A., Shumilina D.V., Suprunova T.P. Doubled haploid production in *Brassica* L. seeds. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):111-120. DOI 10.18699/VJ15.014. (in Russian)]  
Aionesei T., Touraev A., Heberle-Bors E. Pathways to Microspore Embryogenesis. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry). Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;56:11-34.  
Arzany A., Darvey N.L. The effect of colchicine on triticale anther-derived plants: microspore pretreatment and haploid plant treatment using a hydroponic recovery system. Euphytica. 2001;122:235-241.  
Babbar S.B., Kumari N., Mishra J.K. *In vitro* Androgenesis: Events Preceding its Cytological Manifestation. In: Shrivastava P.S., Narula A., Shrivastava Sh. (Eds.). Plant Biotechnology and Molecular Markers. New Dehli, India: Anamya Publishers, 2004;1-17.  
Barceló P., Cabrera A., Hagel C., Lörz H. Production of doubled haploid plants from tritordeum anther culture. Theor. Appl. Genet. 1994;87:741-745.  
Barnabás B., Pfahler P.L., Kovács G. Direct effect of colchicine on microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 1991;81:675-678.  
Batygina T.B. Stem cells and morphogenetic developmental programs in plants. Stem Cell. Res. J. 2011;3(1-2):45-120.  
Belogradova K., Lewicka I., Heberle-Bors E., Touraev A. An Overview on Tobacco Doubled Haploids. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer Science + Business Media, 2009;75-85.  
Bonet F.J., Azhaid L., Olmedilla A. Pollen embryogenesis: atavism or totipotency? Protoplasma. 1998;202:115-121.  
Broughton S. The application of *n*-butanol improves embryo and green plant production in anther culture of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Crop Pasture Sci. 2011;62:813-822.  
Castillo A.M., Nielsen N.H., Jensen A., Vallés M.P. Effect of *n*-butanol on barley microspore embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2014;117:411-418.  
Chiancone B., Germana M.A. Microspore Embryogenesis through Anther Culture in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. In: Germana M.A., Lambardi M. (Eds.). In Vitro Embryogenesis in Higher Plants (Methods in Molecular Biology). Springer Science + Business Media New York, 2016;1359:475-487.  
Cistué L., Kasha K.J. Gametic Embryogenesis in Triticum: a Study of Some Critical Factors in Haploid (Microspore) Embryogenesis. In: Mujib A., Samaj J. (Eds.). Somatic Embryogenesis. Published online: 6 October 2005. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 2005;321-342. DOI 10.1007/7089-031.

- Clement C., Sangwan R.S., Sangwan-Norell B. Microspore Embryo Induction and Development in Higher Plants: Cytological and Ultrastructural Aspects. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry). Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;51-72.
- Corbiesier L., Lejeune P., Bernier G. The role of carbohydrate in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between wild type and starch-less mutant. *Planta*. 1998;206:131-137.
- Cordewener J., Busink R., Traas J.A., Custers J.B.M., van Campagne M.M. Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. is accompanied by specific changes in protein synthesis. *Planta*. 1994;195:50-56.
- Custers J.B.M., Cordewener J.H.G., Nolen Y., Dons H.J.M., van Campagne M.M. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* 1994;13:267-271.
- de Buyser J., Henry Y. Wheat Production of Haploids, Performance of Doubled Haploids and Yield Trials. In: Bajaj Y.P.S. (Ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 2. Crops I. New York; Heidelberg: Springer Verlag, 1986;73-78.
- Devaux P., Pickering R. Haploids in the improvement of Poaceae. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry). Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;56:215-242.
- Dubas E., Wedzony M., Petrovska B., Salaj J., Zur I. Cell structural reorganization during induction of androgenesis in isolated microspore cultures of Triticale (*×Triticosecale* Wittm.). *Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica*. 2010;52:73-86.
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotech. J.* 2010;8:377-424.
- Eady C., Lindsey K., Twell D. The significance of microspore division and division symmetry of vegetative cell-specific transcription and generative cell differentiation. *Plant Cell*. 1995;7:65-74.
- Fábrián A., Földesiné Füredi P.K., Ambrus H., Jäger K., Szabó L., Barnabás B. Effect of *n*-butanol and cold pretreatment on the cytoskeleton and ultrastructure of maize microspores when cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015;123:257-271.
- Földesiné Füredi P.K., Ambrus H., Barnabás B. The effect of *n*-butanol and 2-aminoethanol on the *in vitro* androgenesis of maize. *Acta Biol. Szeged*. 2011;55:77-78.
- Garrido D., Vicente O., Heberle-Borse E., Rodriguez-Garcia M. Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma*. 1995;186:220-230.
- Germana M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;104:283-300.
- Gu H.H., Hagberg P., Zhou W.J. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Reg.* 2004;42:137-143.
- Guha S.S., Maheshwari S.C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*. 1964;204:497-498.
- Heberle-Bors E. Isolated pollen in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. *Sex Plant Reprod.* 1989;2:1-10.
- Heberle-Bors E., Reinert J. Environmental control and evidence for predetermination of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. *Protoplasma*. 1981;109:249-255.
- Indrianto A., Barinova I., Touraev A., Heberle-Bors E. Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in embryo. *Planta*. 2001;212:163-174.
- Indrianto A., Heberle-Bors E., Touraev A. Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. *Plant Sci.* 1999;143:17-23.
- John P.C., Sek F.J., Carmichael J.P., McCurdy D.W. *p34cdc2* homologue level, cell division, phytohormone responsiveness and cell differentiation in wheat leaves. *J. Cell Sci.* 1990;97:627-630.
- Krogaard H., Andersen A.S. Free amino acids of *Nicotiana glauca* anthers during development *in vivo*. *Plant Physiol.* 1983;57:527-531.
- Krzewska M., Gołębiewska-Pikania G., Dubas E., Gawin M., Żur I. Identification of proteins related to microspore embryogenesis responsiveness in anther culture of winter triticale (*×Triticosecale* Wittm.). *Euphytica*. 2017;213:192. DOI 10.1007/s10681-017-1978-1.
- Maluszynski M.K., Kasha K.J., Szarejko I. Published Doubled Haploid Production in Plant Species. In: Maluszynski M.K., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual*. Dordrecht: Springer, 2003;309-335.
- Mohammadi P.P., Moieni A., Ebrahimi A., Javidfar F. Doubled haploid plants following treatment on microspore derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2012;108:251-256. DOI 10.1007/s 11240-011-0036-2.
- Obert B., Barnabás B. Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2004;77:283-285.
- Ohnoutková L., Novotný J., Müllerová E., Vágera J., Kučera L. Is a cold pretreatment really needed for induction of *in vitro* androgenesis in barley and wheat? In: Bohanec B. (Ed.). *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells. Final Meeting*. Bled, Slovenia, 1–5 July 2000. Luxembourg, 2000;33-37.
- Oleszczuk S., Sowa S., Zimmy J. Androgenetic response to preculture stress in microspore cultures of barley. *Protoplasma*. 2006;228:95-100.
- Pauk J., Jancsó M., Simon-Kiss I. Rice doubled haploids and breeding. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer Science + Business Media, 2009;189-197.
- Pauls K.P., Chan J., Woronuk G., Schulze D., Brazolot J. When microspores decide to become embryos – cellular and molecular changes. *Can. J. Bot.* 2006;84:668-678.
- Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A., Steward R.C. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*. 1994;6:65-74.
- Raghavan V. Role of the generative cell in androgenesis in henbane. *Science*. 1976;191:388-389.
- Raina S.K., Irfan S.T. High frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspore of indica rice. *Plant Cell Rep.* 1998;17:957-962.
- Redha A., Talaat A. Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2008;92:141-146. DOI 10.1007/s11240-007-9315-3.
- Reynold T.L. Pollen embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 1997;33:1-10.
- Saisington S., Schmid J.E., Stamp P., Büter B. Colchicine-mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1996;92:1017-1023.
- Scott R., Dagless E., Hodge R., Wyatt P., Soutlemy I., Draper J. Patterns of gene expression in developing anthers of *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 1991;17:195-207.
- Segui-Simarro J.M. Androgenesis revisited. *Bot. Rev.* 2010;76:377-404. DOI 10.1007/s12229-010-9056-6.
- Shariatpanahi M.E., Bal U., Heberle-Bors E., Touraev A. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol. Plant.* 2006a;127:519-534.
- Shariatpanahi M.E., Belogradova K., Hessamvaziri L., Heberle-Bors E., Touraev A. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Rep.* 2006b;25:1294-1299. DOI 10.1007/s00299-006-0205-7.
- Smykal P. Pollen embryogenesis: the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development, current status and future prospects. *Biol. Plant.* 2000;43:481-489.
- Smykal P., Pechan P.M. Stress as assessed by the appearance of smHSPs transcripts, is required but not sufficient to initiate androgenesis. *Physiol. Plant.* 2000;110:135-143.
- Soriano M., Cistue L., Castillo A.M. Enhanced induction of microspore embryogenesis after *n*-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Rep.* 2008;27:805-811.

- Soriano M., Li H., Boutilier K. Microspore embryogenesis establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod.* 2013; 26:181-196. DOI 10.1007/s00497-013-0226-7.
- Sunderland N., Hu Z.H. Shed pollen culture in *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.* 1982;136:1086-1095.
- Telmer C.A., Newcomb W., Simmonds D.H. Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division *in vivo* and *in vitro*. *Protoplasma.* 1993;172:154-165.
- Tian Q.Q., Lu C.M., Li X., Fang X.W. Low temperature treatments of rice (*Oryza sativa* L.) anthers changes polysaccharide and protein composition of the anther walls and increases pollen fertility and callus induction. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015;120:89-98. DOI 10.1007/s11240-014-0582-5.
- Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O., Heberle-Bors E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures. *Sex Plant Rep.* 1996b; 9:209-215.
- Touraev A., Pfosser M., Vicente O., Heberle-Bors E. Stress a major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta.* 1996a;200:144-152.
- Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.* 1999;2(8):297-302.
- Varnier A.L., Jacquard C., Clement C. Programmed Cell Death and Microspore Embryogenesis. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). *Advances in Haploid Production in Higher Plants.* Springer Science + Business Media, 2009;147-153.
- Wang M., Hoeekstra S., Bergen S., Lamers G.E.M., Oppedijk B.J., de Preister W., Schilperoort R.A. Apoptosis in developing anthers and role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol. Biol.* 1999;39:489-501.
- Wang M., Van Bergen S., Van Duijn B. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiol.* 2000;124:523-530.
- Wędzony M. Protocol for Anther Culture in Hexaploid Triticale (*×Triticosecale* Wittm.). In: Maluszynski M.K., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual.* Dordrecht: Springer, 2003;123-128.
- Wędzony M., Forster B.P., Żur I., Golemiec E., Szechyńska-Hebda M., Dubas E., Gołębiewska G. Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). *Advances in Haploid Production in Higher Plants.* Springer Science + Business Media, 2009;1-33.
- Weingartner M., Binarova P., Drykova D., Schweighofer A., David A., Heberle-Bors E., Dooman J. Dynamic recruitment of cdc2 to specific microtubule structures during mitosis. *Plant Cell.* 2001;13:1929-1943.
- Weyen J. Barley and Wheat Doubled Haploids in Breeding. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). *Advances in Haploid Production in Higher Plants.* Springer Science + Business Media, 2009; 179-187.
- Xie J.H., Gao M.W., Liang Z.O., Shu O.Y., Cheng X.Y. The effect of cool pretreatment on the isolated microspore culture and free amino acid change of anthers in *Japonica* rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 1997;151:79-82. DOI 10.1016/S0176-1617(97)80040-5.
- Xynias I.M., Zamani I.A., Goul-Vavidinou E. Effect of cold pretreatment and incubation temperature on bread wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Cereal Res. Commun.* 2001;29(3):331-338.
- Zhao J.-P., Simmonds D.H., Newscomb W. Induction of embryogenesis with colchicines instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Planta.* 1996;198:433-439.
- Zorinants Sv., Tashpulatov A., Heberle-Bors E., Touraev A. The Role of Stress in the Induction of Haploid Microspore Embryogenesis. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). *Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry).* Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;56:35-51.
- Żur I., Dubas E., Golemiec E., Szechyńska-Hebda M., Janowiak F., Wędzony M. Stress-induced changes important for effective androgenic induction in isolated microspore culture of triticale (*×Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2008;94:319-328. DOI 10.1007/s11240-008-9360-6.

#### ORCID ID

T.I. Djatchouk [orcid.org/0000-0001-7420-0521](https://orcid.org/0000-0001-7420-0521)  
O.V. Khomyakova [orcid.org/0000-0002-5218-6076](https://orcid.org/0000-0002-5218-6076)  
V.N. Akinina [orcid.org/0000-0003-3661-9246](https://orcid.org/0000-0003-3661-9246)  
I.A. Kibkalo [orcid.org/0000-0002-8870-121X](https://orcid.org/0000-0002-8870-121X)  
A.V. Pominov [orcid.org/0000-0003-1033-9713](https://orcid.org/0000-0003-1033-9713)

**Acknowledgements.** The authors are grateful to Prof. V.A. Krupnov, Dr. Sci. (Biol.), Honored Scientist, for valuable advice in writing the manuscript.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received February 26, 2018. Revised October 8, 2018. Accepted November 15, 2018.

## Реорганизация хроматина в процессе эритроидной дифференцировки

А.А. Хабарова<sup>1</sup>, А.С. Рыжкова<sup>1</sup>, Н.Р. Баттулин<sup>1, 2</sup> 

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 e-mail: battulin@gmail.com

Онтогенез многоклеточного организма начинается с тотипотентной зиготы, обладающей неограниченным потенциалом дифференцировки во все имеющиеся во взрослом организме типы клеток. По мере деления и созревания клетки постепенно утрачивают потенциал, и спектр доступных путей развития сужается. Проходя последовательные этапы дифференцировки, клетки приобретают специфические функциональные и морфологические особенности, характерные для данного клеточного типа. Расшифровка механизмов, регулирующих активность генов в ходе дифференцировки, является актуальной задачей. В настоящее время трехмерная организация генома в пространстве ядра считается одним из основных уровней регуляции активности генов. Развитие методов, основанных на технологии захвата конформации хромосом, значительно расширило наше представление об организации и регуляции генома в пространстве. В частности, были описаны несколько уровней упаковки геномной ДНК, включающих такие структурно-функциональные единицы, как компартменты хроматина разных типов, топологические домены и внутридоменные локальные взаимодействия регуляторных элементов. Несмотря на значительный прогресс в этой области, точные молекулярные механизмы установления и поддержания подобной организации пока не удалось расшифровать до конца. Поэтому в последнее время все большую актуальность приобретают исследования изменений трехмерной архитектуры генома, сопровождающих ту или иную дифференцировку. Среди описанных дифференцировок эритроидная занимает особое место, так как она сопровождается экстремальной реорганизацией хроматина, а конечный продукт дифференцировки – зрелые эритроциты, у млекопитающих и вовсе не содержат ядра. Кроме того, компактизация ядра эритроидных клеток сопровождается глобальным снижением транскрипционной активности. В связи с этим глобальные изменения ландшафта хроматина, сопутствующие эритроидной дифференцировке, представляются удобной моделью для изучения общих механизмов поддержания трехмерной архитектуры генома, а также для изучения их взаимосвязи с механизмами, обеспечивающими активность генов. В обзоре мы обсудим связь последовательных изменений структуры хроматина в ходе эритроидной дифференцировки с установлением 3D архитектуры генома.  
Ключевые слова: эритробласты; эритроидная дифференцировка; компактизация хроматина; 3D архитектура генома; организация хроматина.

**Для цитирования:** Хабарова А.А., Рыжкова А.С., Баттулин Н.Р. Реорганизация хроматина в процессе эритроидной дифференцировки. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):95-99. DOI 10.18699/VJ19.467

## Reorganisation of chromatin during erythroid differentiation

A.A. Khabarova<sup>1</sup>, A.S. Ryzhkova<sup>1</sup>, N.R. Battulin<sup>1, 2</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: battulin@gmail.com

A totipotent zygote has unlimited potential for differentiation into all cell types found in an adult organism. During ontogenesis proliferating and maturing cells gradually lose their differentiation potential, limiting the spectrum of possible developmental transitions to a specific cell type. Following the initiation of the developmental program cells acquire specific morphological and functional properties. Deciphering the mechanisms that coordinate shifts in gene expression revealed a critical role of three-dimensional chromatin structure in the regulation of gene activity during lineage commitment. Several levels of DNA packaging have been recently identified using chromosome conformation capture based techniques such as Hi-C. It is now clear that chromatin regions with high transcriptional activity assemble into Mb-scale compartments in the nuclear space, distinct from transcriptionally silent regions. More locally chromatin is organized into topological domains, serving as functionally insulated units with cell type – specific regulatory loop interactions. However, molecular mechanisms establishing and maintaining such 3D organization are yet to be investigated. Recent focus on studying chromatin reorganization accompanying cell cycle progression and cellular differentiation partially explained some aspects of 3D genome folding. Throughout erythropoiesis cells undergo a dramatic reorganization of the chromatin landscape leading to global nuclear condensation and transcriptional silencing, followed by nuclear extrusion at the final stage of mammalian

erythropoiesis. Drastic changes of genome architecture and function accompanying erythroid differentiation seem to be an informative model for studying the ways of how genome organization and dynamic gene activity are connected. Here we summarize current views on the role of global rearrangement of 3D chromatin structure in erythroid differentiation.

Key words: erythroid differentiation; chromatin; three-dimensional organization of genome.

**For citation:** Khabarova A.A., Ryzhkova A.S., Battulin N.R. Reorganisation of chromatin during erythroid differentiation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):95-99. DOI 10.18699/VJ19.467 (in Russian)

## Введение

Созревание эритроидных предшественников в ходе гематопоза достаточно полно охарактеризовано с точки зрения ступенчатых изменений их морфологии. Данный процесс включает значительное сокращение размера клетки, потерю митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума и значительного числа рибосом, реорганизацию микрофиламентных структур, а также накопление гемоглобина и других эритроид-специфических белков (Moras et al., 2017). Согласно существующей модели, из мультипотентной гематопозитической стволовой клетки крови (СКК) посредством нескольких делений образуется незрелая эритроидная клетка-предшественник, названная бурст-образующей единицей эритроцитов (БОЕэ), впоследствии дающая начало колониобразующей единице – КОЕэ. Дальнейшее развитие, именуемое терминальным эритропозом, включает в себя путь от проэритробласта до ретикулоцита, который клетка проходит за четыре-пять митотических делений (см. рисунок). Образующиеся из КОЕэ проэритробласты обладают крупным ядром, занимающим почти все пространство клетки, явно различимыми ядрышками, а также имеют базофильную цитоплазму.

В ходе дальнейших стадий происходит последовательное образование базофильного, полихроматофильного и, наконец, оксифильного эритробластов. При этом диаметр клетки сокращается с 25 мкм до примерно 8 мкм. Кроме этого, ядро эритробласта подвергается значительным изменениям в ходе дифференцировки. На этапе базофильного эритробласта запускается процесс конденсации хроматина, исчезает ядрышко. Далее в цитоплазме еще более мелкого полихроматофильного эритробласта начинается аккумуляция гемоглобина, а хроматин претерпевает ряд модификаций и упаковывается еще более плотно. Затем хроматин сильно компактизованного ядра становится транскрипционно неактивным, а ядро выбрасывается из клетки (Migliaccio, 2010; Nowak et al., 2017). В финале оксифильный эритробласт дает начало двум структурам: ретикулоциту, содержащему большую часть цитоплазмы, и пиреноциту, содержащему неактивное пикнотическое ядро, окруженное тонким ободком цитоплазмы. Впоследствии ретикулоцит выходит в кровяное русло, в то время как пиреноцит подвергается деградации при участии макрофагов, которые распознают специфические маркеры на его поверхности (Yoshida et al., 2005). Несмотря на то что потеря ядра зрелыми эритроцитами является особенностью именно млекопитающих, потеря транскрипционной активности и компактизация хроматина в ходе эритроидной дифференцировки наблюдаются и у других позвоночных, в частности птиц, что указывает на

эволюционную консервативность этих процессов (Dolznig et al., 1995).

Процесс эритроидной дифференцировки сопровождается глобальной перестройкой архитектуры генома и локальными изменениями паттерна активности множества генов. Поэтому данная модель представляет огромный интерес для изучения взаимосвязи двух уровней регуляции, координирующих ход дифференцировки, особенно в свете новых методик, позволяющих более детально исследовать процессы, связанные с установлением и реорганизацией геномной архитектуры.

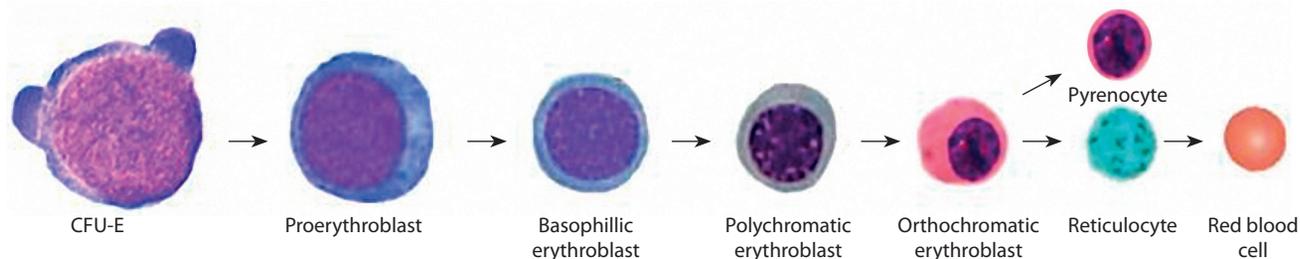
## Принципы 3D организации генома

В ядрах эукариотических клеток существует несколько иерархических уровней укладки молекулы ДНК. Первым уровнем компактизации ДНК является 10 нм фибрилла, состоящая из молекулы ДНК, намотанной на октамер гистоновых белков. На данном уровне организации хроматина его компактизация осуществляется за счет изменения электростатических взаимодействий между N-терминальными районами гистоновых белков (Allahverdi et al., 2011).

Следующий уровень организации хроматина – петлевой, сформированный нуклеосомными фибриллами и специальными белками (Mignu, 2011). Формирование петель в интерфазном ядре происходит за счет когезинового комплекса белков, представляющего собой кольцо, сквозь которое протягивается нить ДНК, образуя петлю. В основании петли находятся два сайта связывания с белком CTCF, причем эти сайты имеют конвергентную ориентацию. Нить хроматина протягивается через когезиновое кольцо до тех пор, пока не встретится обратно ориентированный сайт белка CTCF (Fudenberg et al., 2016). Модель петлевой экструзии объясняет, каким образом взаимодействуют между собой удаленные участки ДНК и как структурирован хроматин в интерфазном ядре. Схожая модель петлевой организации описана и для метафазных хромосом, однако в ней участвуют белки конденсина I и II (Gibcus et al., 2018), которые формируют петли и массивы петель.

## Компактизация

Архитектурные белки, участвующие в организации хроматина, позволяют поддерживать структуру ДНК, но вряд ли принимают активное участие в компактизации ядра, поскольку удаление таких белков приводит к нарушению структуры, но не влияет значительно на компактизацию. Вероятнее всего, на уплотнение хроматина комплексное влияние оказывают как отдельные белки, так и ионные взаимодействия. Хромосома представляет собой поли-



Schematic presentation of terminal erythropoiesis.

электролитный комплекс, поэтому уплотнение хромосом должно зависеть от того, насколько хорошо отрицательные заряды ДНК нейтрализуются, чтобы обеспечить конденсацию.

Большая часть отрицательных зарядов ДНК нейтрализуется связыванием гистонов, однако около 40 % взаимодействуют с другими положительно заряженными молекулами (Korolev et al., 2012). Наиболее распространенные внутриклеточные катионы –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Вместе с тем увеличение концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в пять раз в ходе клеточного цикла указывает на активную роль этих ионов в компактизации хромосом при клеточном делении (Strick et al., 2001; Phengchat et al., 2016). Бивалентные ионы ( $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ) создают поле, которое распространяется не только вокруг нуклеосом и линкерных последовательностей, но и затрагивает области хвостов гистонов (Gan, Schlick, 2010). Таким образом, компактизация хроматина обеспечивается комплексом взаимодействий архитектурных белков и бивалентных ионов (Kschonsak, Haering, 2015).

### Компартментализация и доменная организация

На высшем уровне геном в интерфазном ядре подразделяется на два компартмента – А и В, варьирующих от единиц до десятков миллионов пар оснований (Мб) в размере (Lieberman-Aiden et al., 2009). Сегрегация компартментов коррелирует с различным функциональным состоянием хроматина и различным GC-составом. Анализ распределения хроматиновых меток показал, что компартмент А содержит преимущественно активные районы генома, тогда как компартмент В коррелирует с зонами гетерохроматина, обладающими противоположными характеристиками (Lieberman-Aiden et al., 2009; Imakaev et al., 2012).

Блоки генома, принадлежащие к одному компартменту, имеют больший потенциал к формированию контактов между собой, чем с локусами из другого компартмента, причем компартмент В в среднем характеризуется большей частотой контактов, т.е. упакован более плотно, чем А. Подобная сегрегация контактов, наблюдаемая и на внутри-, и на межхромосомных уровнях, означает, что эухроматин и гетерохроматин отделены друг от друга и имеют тенденцию к формированию своей единой и достаточно обособленной области внутри ядра. При анализе внутрихромосомных контактов на более высоком разрешении были обнаружены участки генома (~800 тыс. пар оснований), обогащенные контактами внутри себя и

обедненные контактами с геномным окружением. Такие инсулированные области были названы топологически ассоциированными доменами (ТАД) (Dixon et al., 2012), и именно они являются ключевым функциональным элементом геномной архитектуры, выступая как единицы регуляции, определяющие и ограничивающие регуляторный контекст для активности генов.

### Реорганизация архитектуры хроматина в ходе эритропоэза

Поиск молекулярных механизмов функционирования, формирования и поддержания описанных выше структур в ходе клеточной дифференцировки является одной из горячих тем в геномике. В частности, регуляция перевода хроматина в суперкомпактизованное состояние в ходе эритроидной дифференцировки с последовательным выключением транскрипционной активности осуществляется на нескольких уровнях. В ядерной оболочке эритроидных предшественников формируются обширные области, в которых отсутствуют компоненты ядерной ламины, порового комплекса и ядерная мембрана. Через такие разрывы значительная фракция гистоновых белков (гистоны H3 и H4) выходит в цитоплазму и деградирует. Интересно, что остающийся в ядре H2A.Z вовлечен в регуляцию динамики расположения нуклеосом (Li et al., 2012), что говорит о его возможной роли в реорганизации хроматина в ходе терминального эритропоэза. Области таких разрывов динамичны, и их образование тесно ассоциировано с клеточным циклом: в ходе созревания ядро эритробласта проходит через несколько последовательных фаз открытого и закрытого состояния (Zhao et al., 2016). Частичный выход гистонов в цитоплазму через разрывы в ядерной оболочке и, как следствие, изменение общего заряда ДНК приводят к тому, что роль ионных взаимодействий и компенсации зарядов в упаковке хроматина значительно повышается.

Также стоит упомянуть о том, что глобальный перевод хроматина в неактивное состояние в ходе эритропоэза не связан с активностью известных архитектурных белков вроде HP1. Оказалось, критическое значение в этом процессе имеет обширное деацетилирование гистонов (Pорова et al., 2009). При этом в процессе дифференцировки распределение метки ацетилирования смещается из центральных регионов к периферии ядра, а инактивация гистоновых деацетилаз препятствует процессу конденсации хроматина, образованию сократительного актинового кольца и ядерной экструзии (Ji et al., 2010). Исходя из недавних сведений о том, что на установление

хроматиновых компартментов в большей степени влияет взаимодействие локусов внутри компартмента В, чем контакты А–А/А–В, логично предположить, что масштабное удаление метки активного хроматина приведет к значительной перестройке картины геномных взаимодействий, изменяя распределение А/В компартментов.

Другим регулятором компактизации хроматина в ходе эритроидной дифференцировки является метилтрансфераза Setd8. У млекопитающих этот фермент осуществляет монометилирование гистона H4 по Lys 20. Его активность необходима для прохождения клеточного цикла, конденсации хроматина и стабильности генома (Oda et al., 2009). Точный механизм, в соответствии с которым Setd8 модифицирует архитектуру хроматина в эритроцитах, пока не ясен. Монометилирование гистона H4 по Lys 20 потенциально может способствовать уплотнению хроматина различными способами, в том числе взаимодействуя с комплексом конденсина II, активно вовлеченным в образование крупных петель и компактизацию хроматина (Liu et al., 2010).

Считается, что картина пространственной организации типичного интерфазного ядра формируется при взаимодействии двух глобальных процессов: фазовая сепарация пытается привести хроматин в равновесное состояние, при котором весь гетерохроматин собран в едином объеме и имеет минимальную площадь соприкосновения с эухроматином, а механизм протягивания петель ДНК препятствует этому, постоянно локально перемешивая хроматин протягиванием петель сквозь кольцо когезинового комплекса (Nuebler et al., 2018). В нашей лаборатории получены данные о том, что при полной остановке транскрипции в эритроцитах курицы ядро действительно переходит в равновесное состояние: данные, полученные при помощи Hi-C и электронной микроскопии, говорят о максимально выраженной сегрегации компартментов активного и неактивного хроматина. При этом полученные карты хроматиновых взаимодействий свидетельствуют о полном отсутствии ТАДов и петель (Fishman et al., 2019). Исчезновение регуляторных петлевых взаимодействий не может быть объяснено остановкой транскрипционной активности и, соответственно, продвижения комплекса ассоциированных с транскрипцией белков, поскольку в ядрах сперматозоидов, также транскрипционно неактивных, доменная организация сохранялась. Возможно, подобная картина объясняется перемещением белков когезинового комплекса и CTCF, ответственных за данный тип взаимодействий, с ДНК в интерхроматиновое пространство, так как в ядрах активно делящихся эритробластов белок равномерно распределен по всему объему клеточного ядра, а в ядрах зрелых эритроцитов курицы CTCF диссоциирует с ДНК и находится большей своей частью на периферии ядра (Kantidze et al., 2007). Таким образом, отсутствие активного процесса протягивания петель, вероятно, позволяет установиться равновесному состоянию со строго разделенными зонами хроматина разного типа в ядрах терминально дифференцированных эритроидных клеток.

Другой неожиданной особенностью геномной организации эритроцитов курицы стало заметное увеличение частоты дальних контактов (разделенных ~20 Мб дис-

танцией), не характерное для других исследованных ранее типов клеток. Считается, что вероятность взаимодействия геномных локусов имеет тенденцию к равномерному снижению с увеличением линейного расстояния в геноме. В соответствии с известными на сегодняшний день данными, исключение составляют только плотно конденсированные метафазные хромосомы, для которых недавно также было показано локальное повышение вероятности дальних взаимодействий (Gibcus et al., 2018). Для объяснения таких контактов была предложена модель, в которой функционирующий в интерфазе когезин заменяется комплексами конденсина I и II. При участии этих белков формируется компактная структура, состоящая из двух типов вложенных петель: мелких петель, в основании которых лежит конденсин I, и объединяющих их крупных петель, сформированных конденсином II. Такой массив петель (nested loops) предположительно формирует локальное повышение плотности контактов между дальними локусами. Детали механизма, отвечающего за этот процесс в ядре зрелых эритроидных клеток, еще предстоит расшифровать. Для изучения данного феномена требуется исследовать вклад различных элементов, определяющих геномную архитектуру, таких как инсуляторный белок CTCF, кольцевые комплексы когезина и конденсина, в организацию хроматина эритроидных клеток.

## Заключение

Понимание механизмов, лежащих в основе формирования глобального ландшафта хроматина, позволяет иначе взглянуть на регуляцию активности и стабильности генома. Нам известно о нескольких взаимодействующих между собой уровнях упаковки генома, от намотки ДНК на нукleosомы до образования хромосомных территорий. Некоторые из них, например мегабазные топологические домены, считаются стабильной и эволюционно консервативной функциональной единицей, характерной для генома высших эукариот. Предполагается, что процессы и факторы, формирующие и поддерживающие организацию доменов, достаточно консервативны. Они неизменны для всех клеточных типов и на разных этапах их дифференцирования, поскольку поддержание границ топологических доменов играет определяющую роль в дифференциальной активности генома.

Полученные нами данные о масштабной перестройке хроматиновых взаимодействий в ядре эритроцитов курицы, как на уровне доменов, так и на более дальних дистанциях, требуют дальнейшего изучения этих механизмов. Более удобной моделью, в том числе и за счет большей доступности геномных данных, является мышь. Анализ динамической картины хроматиновых взаимодействий на разных стадиях терминального эритропоэза, выполненный на клетках мыши, а также поиск архитектурных элементов, определяющих формирование данной картины, остаются крайне актуальной задачей.

## Список литературы / References

Allahverdi A., Yang R., Korolev N., Fan Y., Davey C.A., Liu C., Nordenskiöld L. The effects of histone H4 tail acetylations on cation-induced chromatin folding and self-association. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(5):1680-1691. DOI 10.1093/nar/gkq900.

- Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. 2012;485:376-380. DOI 10.1038/nature11082.
- Dolznig H., Bartunek P., Nasmyth K., Müllner E.W., Beug H. Terminal differentiation of normal chicken erythroid progenitors: shortening of G1 correlates with loss of D-cyclin/cdk4 expression and altered cell size control. *Cell Growth Differ.* 1995;6(11):1341-1352.
- Fishman V., Battulin N., Nuriddinov M., Maslova A., Zlotina A., Strunov A., Chervyakova D., Korablev A., Serov O., Krasilova A. 3D organization of chicken genome demonstrates evolutionary conservation of topologically associated domains and highlights unique architecture of erythrocytes' chromatin. *Nucleic Acids. Res.* 2019; 47(2):648-665. Publ. online Nov. 2018. DOI 10.1093/nar/gky1103.
- Fudenberg G., Imakaev M., Lu C., Goloborodko A., Abdennur N., Mirny L.A. Formation of chromosomal domains by loop extrusion. *Cell Rep.* 2016;15(9):2038-2049. DOI 10.1016/j.celrep.2016.04.085.
- Gan H.H., Schlick T. Chromatin ionic atmosphere analyzed by a mesoscale electrostatic approach. *Biophys. J.* 2010;99:2587-2596. DOI 10.1016/j.bpj.2010.08.023.
- Gibcus J.H., Samejima K., Goloborodko A., Samejima I., Naumova N., Nuebler J., Kanemaki M., Xie L., Paulson J.R., Earnshaw W.C., Mirny L.A., Dekker J. A pathway for mitotic chromosome formation. *Science*. 2018;359:eaa06135. DOI 10.1126/science.aao6135.
- Imakaev M., Fudenberg G., McCord R.P., Naumova N., Goloborodko A., Lajoie B.R., Dekker J., Mirny L.A. Iterative correction of Hi-C data reveals hallmarks of chromosome organization. *Nat. Methods*. 2012;9(10):999-1003. DOI 10.1038/nmeth.2148.
- Ji P., Yeh V., Ramirez T., Murata-Hori M., Lodish H.F. Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica*. 2010;95(12):2013-2021. DOI 10.3324/haematol.2010.029827.
- Kantidze O.L., Iarovaia O.V., Philonenko E.S., Yakutenko I.I., Razin S.V. Unusual compartmentalization of CTCF and other transcription factors in the course of terminal erythroid differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2007;1773(6):924-933. DOI 10.1016/j.bbamcr.2007.03.015.
- Korolev N., Allahverdi A., Lyubartsev A.P., Nordenskiöld L. The polyelectrolyte properties of chromatin. *Soft Matter*. 2012;36:1-12. DOI 10.1039/C2SM25662B.
- Kschonsak M., Haering C.H. Shaping mitotic chromosomes: From classical concepts to molecular mechanisms. *Bioessays*. 2015;37: 755-766. DOI 10.1002/bies.201500020.
- Li Z., Gadue P., Chen K., Jiao Y., Tuteja J., Schug J., Li W., Kaestner K.H. Foxa2 and H2A.Z mediate nucleosome depletion during embryonic stem cell differentiation. *Cell*. 2012;151(7):1608-1616. DOI 10.1016/j.cell.2012.11.018.
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragozcy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009;326(5950):289-293. DOI 10.1126/science.1181369.
- Liu W., Tanasa B., Tyurina O.V., Zhou T.Y., Gassmann R., Liu W.T., Ohgi K.A., Benner C., Garcia-Bassets I., Aggarwal A.K., Desai A., Dorrestein P.C., Glass C.K., Rosenfeld M.G. PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature*. 2010;466(7305):508-512. DOI 10.1038/nature09272.
- Migliaccio A.R. Erythroblast enucleation. *Haematologica*. 2010;95(12): 1985-1988. DOI 10.3324/haematol.2010.033225.
- Mirny L. The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell. *Chromosome Res.* 2011;19(1):37-51. DOI 10.1007/s10577-010-9177-0.
- Moras M., Lefevre S.D., Ostuni M.A. From erythroblasts to mature red blood cells: Organelle clearance in mammals. *Front. Physiol.* 2017; 8:1076. DOI 10.3389/fphys.2017.01076.
- Nowak R., Papoin J., Gokhin D.S., Casu C., Rivella S., Lipton J.M., Blanc L., Fowler V.M. Tropomodulin1 controls erythroblast enucleation via regulation of F-actin in the nucleosome. *Blood*. 2017; 130(9):1144-1155. DOI 10.1182/blood-2017-05-787051.
- Nuebler J., Fudenberg G., Imakaev M., Abdennur N., Mirny L.A. Chromatin organization by an interplay of loop extrusion and compartmental segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;115(29):E6697-E6706. DOI 10.1073/pnas.1717730115.
- Oda H., Okamoto I., Murphy N., Chu J., Price S.M., Shen M.M., Torres-Padilla M.E., Heard E., Reinberg D. Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol. Cell Biol.* 2009; 29(8):2278-2295. DOI 10.1128/MCB.01768-08.
- Phengchat R., Takata H., Morii K., Inada N., Murakoshi H., Uchiyama H., Fukui K. Calcium ions function as a booster of chromosome condensation. *Sci. Rep.* 2016;6:38281. DOI 10.1038/srep38281.
- Popova E.Y., Krauss S.W., Short S.A., Lee G., Villalobos J., Etzell J., Koury M.J., Ney P.A., Chasis J.A., Grigoryev S.A. Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architecture proteins but depends on histone deacetylation. *Chromosome Res.* 2009;17(1):47-64. DOI 10.1007/s10577-008-9005-y.
- Strick R., Strissel P.L., Gavrilov K., Levi-Setti R. Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J. Cell Biol.* 2001;155(6): 899-910. DOI 10.1083/jcb.200105026.
- Yoshida H., Kawane K., Koike M., Mori Y., Uchiyama M., Nagata S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*. 2005;437:754-758. DOI 10.1038/nature03964.
- Zhao B., Mei Y., Schipma M.J., Roth E.W., Bleher R., Rappoport J.Z., Wickrema A., Yang J., Ji P. Nuclear condensation during mouse erythropoiesis requires caspase-3-mediated nuclear opening. *Cell*. 2016;36(5):498-510. DOI 10.1016/j.devcel.2016.02.001.

**Acknowledgements.** This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 18-04-00668.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received October 15, 2018. Revised November 29, 2018. Accepted December 21, 2018.

## Системный подход к моделированию развития листостебельных грибных инфекций пшеницы

С.В. Николаев<sup>1</sup>✉, У.С. Зубаирова<sup>1</sup>, Е.С. Сколотнева<sup>1</sup>, Е.А. Орлова<sup>1</sup>, Д.А. Афонников<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: nikolaev@bionet.nsc.ru

В настоящее время в России и в мире интенсивно ведутся работы по исследованию механизмов патогенеза заболеваний растений и их распространения в посевах. Прежде всего это связано со значительным влиянием патогенов на урожай. На территории Западной Сибири в посевах яровой и озимой пшеницы практически ежегодно регистрируются бурая ржавчина и мучнистая роса, а в отдельные годы степень поражения достигает эпифитотийного уровня. Методы мониторинга состояния посевов развиваются с целью прогнозирования их динамики и планирования агротехнологических мероприятий для управления состоянием растений в посевах, в том числе при развитии грибной инфекции. Существенной составной частью систем планирования и управления состоянием посевов являются модели развития листостебельной грибной инфекции (например, бурой ржавчины) в посевах пшеницы. Математические модели позволяют проводить вычислительные эксперименты для получения прогнозов относительно динамики рисков инфекций при разных сценариях глобальных погодных изменений. Такое назначение моделей предполагает их иерархическую структуру, характерную для многоуровневых систем моделирования. В настоящем обзоре представлены модели развития листостебельных грибных инфекций на примере ржавчинных заболеваний в посевах зерновых культур и сформулированы методические подходы системного моделирования, которые можно применять при использовании и/или адаптации существующих моделей и их блоков и разработке на их основе собственных моделей. В статье также предлагается структура иерархической системы моделей развития листостебельной инфекции, дается обзор составляющих систему блоков, обсуждаются вопросы параметрической адаптации подмоделей. Представлены разработанные к настоящему времени модели роста и развития растений, учитывающие различную степень детализации описания процессов морфогенеза. Такие модели лежат и в основе описания взаимодействия патоген-хозяин, представленных в виде модулей. Для каждого из модулей можно использовать уже разработанные и описанные модели базовых процессов для отдельных растений или посевов с учетом имеющихся экспериментальных данных.

Ключевые слова: листостебельные грибные инфекции; пшеница; бурая ржавчина; механистические модели роста растений; параметрическая идентификация моделей.

**Для цитирования:** Николаев С.В., Зубаирова У.С., Сколотнева Е.С., Орлова Е.А., Афонников Д.А. Системный подход к моделированию развития листостебельных грибных инфекций пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):100-109. DOI 10.18699/VJ19.468

## A system approach to the modeling of fungal infections of the wheat leaf

S.V. Nikolaev<sup>1</sup>✉, U.S. Zubairova<sup>1</sup>, E.S. Skolotneva<sup>1</sup>, E.A. Orlova<sup>1</sup>, D.A. Afonnikov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: nikolaev@bionet.nsc.ru

Currently, studies on the mechanisms of the pathogenesis of plant diseases and their distribution in crops are intensively conducted in Russia and the world. First of all, this interest is associated with a significant effect of pathogens on the harvest. In Western Siberia, brown rust and powdery mildew are almost annually recorded in the crops of spring and winter wheat, reaching in some years up to the epiphytotic level. In this regard, methods for monitoring the condition of crops in order to predict their dynamics and plan agrotechnological events to control the state of plants in crops, including the development of fungal infection are developing. Models of fungal infections development on the wheat leaf (for example, brown rust) are used to monitor, predict and control the state of crops in order to optimize the growing process. Mathematical models allow computational experiments to make predictions about the risk dynamics of infections in different scenarios of global weather changes. Such designation of models assumes their hierarchical structure characteristic of multilevel modeling systems. This review presents models for the development of foliar fungal infections in crops, and formulates the

methodological aspects of system modeling that can be used for adapting existing models and their units, and developing new models based on them. The article presents the structure of the hierarchical system for modeling the development of leafy infection, provides an overview of the units constituting the system, and discusses the issues of parametric adaptation of submodels. We demonstrated that, to date, plant growth and development models have been developed with varying degrees of detail. Currently, to develop a system for modeling the development of an infection in a crop, it is necessary to determine a large body of available experimental data and, by taking into account this data, we can put together a model as a system consisting of model modules, for which the models of basic processes have already been developed and described.

Key words: fungal infections of leaves; wheat; brown rust; mechanistic models of plant growth; parametric identification of models.

**For citation:** Nikolaev S.V., Zubairova U.S., Skolotneva E.S., Orlova E.A., Afonnikov D.A. A system approach to the modeling of fungal infections of the wheat leaf. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):100-109. DOI 10.18699/VJ19.468 (in Russian)

## Введение

К основным сдерживающим факторам повышения урожайности зерновых относятся ржавчинные болезни, септориоз листьев и колоса, мучнистая роса. Ежегодно только от этих болезней Россия теряет 30 % зерна (Санин, 2010). В условиях Западной Сибири в посевах яровой и озимой пшеницы бурая ржавчина и мучнистая роса отмечаются практически ежегодно. Начиная с 2007 г. развитие стеблевой ржавчины в регионе стало регулярным, доходя в отдельные годы до уровня эпифитотии (Сколотнева и др., 2018).

Изучение механизмов патогенеза заболеваний растений и их распространения в посевах, влияния патогенов на урожай – одно из важных направлений биологии растений. Наряду с экспериментальными методами для решения этой задачи используется широкий класс методов системной биологии, в том числе и вычислительные эксперименты, которые позволяют рассматривать взаимодействие патоген–растение как комплексный процесс, зависящий от большого количества факторов: устойчивости растений, скорости проникновения возбудителя в ткани растения, колонизации (латентной фазы патогенеза) и успешного спороношения с повторным заражением вегетирующих растений, погодных условий (температуры, влажности) и др. При этом влияние заболевания на урожай обусловлено проявлением всех этих факторов в определенные моменты развития растений. Среди грибных патогенов пшеницы возбудители ржавчинных заболеваний – удобный объект для разработки моделей развития инфекций, патогенез которых включает эктофитную и эндофитную стадии, на каждой из которых развитие патогена в разной степени зависит от абиогенных и биогенных факторов.

Цель обзора состоит в том, чтобы представить модели развития ржавчинных заболеваний в посевах зерновых культур на примере возбудителя бурой ржавчины и сформулировать методические подходы системного моделирования, которые можно применять при использовании и/или адаптации существующих моделей и их блоков и разработке на их основе собственных моделей.

## Роль моделирования взаимодействий патоген–растение

**Особенности патогенеза возбудителей ржавчинных заболеваний злаков.** Жизненный цикл возбудителей ржавчинных заболеваний злаков состоит из нескольких стадий и связан с двумя разными видами хозяев, один из

которых – растение пшеницы (Kolmer, 2013). Пагубное влияние на урожай проявляется на стадии уредоспор – продуктов бесполого размножения гриба, которые воспроизводятся несколько раз в течение сезона, инфицируя соседние растения в посевах. Уредоспоры осаждаются ветром или дождем по обе стороны листа пшеницы. Для прорастания спор требуется 100 % влажность, однако они могут сохранять жизнеспособность в полевых условиях в отсутствие влаги на протяжении 1–3 дней после инокуляции (Bolton et al., 2008). В зависимости от вида ржавчины температурный оптимум для развития эктофитной стадии варьирует в пределах 18–23 °С. Прорастание спор ростковыми трубками происходит в течение 4–8 ч, после чего патоген проникает в ткань листа через устьица, проходя важную морфологическую стадию аппрессория. Сразу после проникновения в лист гриб формирует инфекционные гифы, которые быстро растут в разных направлениях, обильно заполняя межклетники. В клетки мезофила внедряются специализированные отростки – гаустории, разрушая клеточные стенки, но сохраняя при этом интактной плазматическую мембрану, через которую устанавливается трофический контакт с питающей клеткой хозяина. Через 7–10 дней развития эндофитной стадии в ткани листа формируются субэпидермальные пустулы (урединии), которые вновь продуцируют уредоспоры. Морфологические структуры эктофитной и эндофитной стадий развития ржавчинных грибов представляют собой мишени для воздействия продуктов генов устойчивости растения-хозяина. Поэтому при разработке моделей развития инфекции их роль должна непременно учитываться.

**Роль и назначение моделей развития ржавчины.** В настоящее время для управления состоянием растений в посевах с целью прогнозирования их динамики и планирования агротехнологических мероприятий развиваются методы мониторинга. Мониторинг и прогнозирование развития заболеваний в посевах необходимы для оптимизации химической защиты и минимизации нагрузки на экосистемы в результате ее применения – агротехнологические мероприятия против вредоносных организмов и инфекционных агентов должны проводиться локально как во времени, так и пространстве, поскольку инфекция на начальных стадиях развивается в посевах пятнами, окруженными большими площадями здорового посева, а ее дальнейшее распространение по всему посеву обусловлено рассеиванием инфицирующих агентов вокруг первоначальных очагов болезни (Agrow et al., 1961).

Для осуществления такого планирования агротехнологических мероприятий разрабатываются и применяются модели нормальных и патологических процессов в растениях и посевах, которые имеют огромный потенциал для удовлетворения потребности в новой стратегии управления процессом выращивания с привлечением информационных технологий (Krause, Massie, 1975; De Wolf, Isard, 2007).

**Эмпирические и механистические модели.** Модели развития инфекции бурой ржавчины, как и модели большинства других систем, можно разделить на два типа: механистические и эмпирические (El Jarroudi et al., 2014).

Механистические модели описывают в математической форме наши знания и гипотезы о физиологических процессах организма и их взаимосвязях, обеспечивающих рост и развитие растений (Landsberg, Sands, 2010). При моделировании взаимодействия растений и патогенов механистические модели позволяют, с одной стороны, лучше понять процессы роста и развития организмов и механизмы, определяющие прохождение стадий инфекции. С другой стороны, в результате анализа таких моделей можно выявить критические стадии развития инфекции, спланировать управляющие воздействия для снижения ее распространения, сформулировать задачи по поиску возможных препаратов, которые могут повлиять на эти критические стадии.

При эмпирическом моделировании применяют статистические модели развития инфекции, описывающие кумулятивный процесс в зависимости от параметров среды – модели типа «воздействие–отклик». Параметры этих моделей, как правило, адаптируются на полевых данных (Junk et al., 2016). Основная область их применения – прогноз развития инфекции в определенных регионально-климатических условиях для конкретного сорта растения.

В настоящей статье представлен обзор работ, в которых использован системный подход к изучению развития инфекции растений на основе механистических моделей.

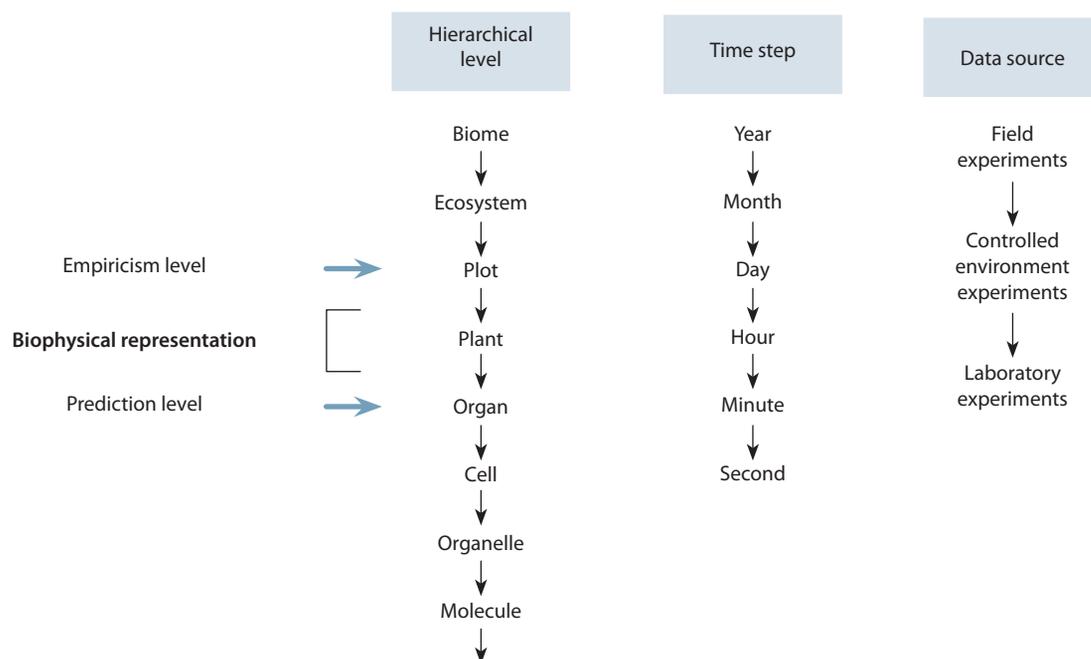
## Структура моделей развития инфекции в посевах

### Уровни иерархии в организации и описании систем

Объективно существующая иерархия природных объектов/систем и процессов в пространственных и временных масштабах (Verdier, 2006) обуславливает наличие иерархических связей и в математическом описании биологических и экологических систем. В таблице приведен вариант выделения иерархических уровней систем и процессов при рассмотрении развития грибной инфекции в посевах, а на рис. 1 показано соотношение уровней и масштабов времен для процессов, рассматриваемых при моделировании растительного покрова.

The hierarchy of objects and processes considered in the simulation of fungal infection

Hierarchy level	Object	Processes
1	Plot	Energy and mass exchange in the plant canopy, forming the microclimate in the plot under different weather conditions. Growth of plant biomass, yield formation. Transfer of spores, the dynamics of the spread of infection throughout the plot. The effect of fungal infection on crop growth and yield
2	Plant	The formation of microclimate in the layer adjacent the leaf surface under the specified conditions of the microclimate in the plot. Temperature stabilization in plant tissues. Plant growth and development under the influence of microclimate in the plot. Effect of fungal infection on plant growth and performance
3a	Plant organs	The emergence, growth, and death of plant organs. Synthesis and redistribution of growth-supporting components and respiration with regard to environmental conditions
3b	Fungi on a leaf blade	Course of the ectophytic infection stage (spore attachment, spore germination, contact with stomata, and appressorium formation) and the efficiency of asexual sporulation. The contribution of the microclimate in the layer near the leaf surface and plant genotype
4	Leaf tissues with fungal hyphae growing therein	Dispersal of hyphae in the mesophyll, haustorium formation. Changes in the state of the host cell feeding fungal hyphae
5	Molecular mechanisms of plant interaction with fungal infection	Recognition of molecular patterns of pathogens (elicitors) using kinase receptors. Activation of the plant immune system. Launch of signaling pathways responding to pathogen invasion: Hypersensitive response through the formation of reactive oxygen species. Alternative products of R genes and resistance-associated QTLs



**Fig. 1.** The levels of organization in the system of vegetation and time scales when modeling processes at each level (adapted from (Donatelli et al., 2017)).

### Моделирование развития инфекции в посевах

Экспериментальное и теоретическое изучение распространения инфекции в посевах представлено в работах (Cowger et al., 2005; Mundt et al., 2011), в которых инфекцию рассматривают как явление, не подразделяя его на составные процессы. Переменными состояниями в таких моделях являются степень поражения (например, относительное число пораженных растений) и площадь, занимаемая посевами с определенной степенью поражения в зависимости от времени (Madden, 2006).

В рамках механистического подхода на верхнем уровне иерархии можно рассматривать систему растения в посевах + патогенные грибы. Примером модели роста биомассы посева и формирования урожайности может быть модель STICS, которая разрабатывалась в Национальном институте сельскохозяйственных исследований Франции (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA) (Brisson et al., 2003) для моделирования роста посева с учетом баланса воды и азота в почве, находящихся под воздействием суточной динамики климатических параметров. Вычислительная модель состоит из взаимодействующих модулей, рассчитывающих: 1) прохождение фенофаз растениями в посевах, 2) рост надземной части растений, 3) формирование урожая, 4) агротехнические мероприятия, 5) формирование микроклимата в посевах, 6) рост корневой системы, 7) баланс воды и азота в почве за счет процессов поглощения растворов корнями и транспирацией в атмосферу, а также продукции доступного азота в процессах разложения органики, 8) формирование профиля температуры и влажности в посевах и почве в результате процессов энерго- и массообмена в системе атмосфера-растения-почва. Моделирование процессов формирования микроклимата в посевах основано на представлении и моделях радиационного, конвективного и кондуктивного переноса энергии (Gates, 1980; Campbell, Norman, 1998).

Модель STICS используется для прогноза динамики посевов и прохождения фенофаз, учета баланса влаги и компонентов минерального питания в посевах, планирования агротехнических мероприятий и прогноза их эффекта (Jing et al., 2017; Lammoglia et al., 2017a, b; Tribouillois et al., 2018).

Второй объект моделирования в системе растения в посевах + патогенные грибы – грибы, их распространение в посевах и развитие инфекции (генерация нового потомства спор). Моделирование распространения спор грибных инфекций в посевах основано на экспериментальном и теоретическом изучении транспорта твердых дисперсных систем в атмосфере и посевах на разных пространственных масштабах – от десятков и сотен километров до метров и сантиметров (Chamecki, 2012; Chamecki et al., 2012; Bailey et al., 2014; Miller et al., 2017). Скорость развития инфекции от момента инокуляции спор – важный параметр модели, сам он также является функцией от влажности и температуры среды (Duthie, 1997; Magarey et al., 2005). Обширный обзор по моделям формирования и потерь урожая в посевах содержится в (Savary et al., 2015, 2018).

### Согласование уровней в иерархической модели развития грибной инфекции

Разрабатывать и анализировать сложные модели «технологичнее» с учетом их иерархической структуры. Например, вертикальный профиль плотности потока фотосинтетически активной радиации (ФАР) в посевах зависит от вертикального распределения плотности листьев (индекс листовой поверхности, ИЛП) в посевах. ИЛП (leaf area index, LAI) представляет собой безразмерную величину, равную отношению площади листьев, спроецированных на поверхность почвы к площади этой поверхности (Watson, 1947). ФАР входит в качестве основной независимой

переменной в модели фотосинтетической активности, определяющей в итоге продуктивность растения. В свою очередь, вертикальное распределение плотности листьев и его динамику в посеве можно рассчитать, исходя из плотности растений в посеве и модели роста растения с учетом его трехмерной архитектуры (Gates, 1980; Campbell, Norman, 1998; Fournier, Andrieu, 1998; Chelle, Andrieu, 1999; Zhu et al., 2012).

В качестве другого примера рассмотрим моделирование развития ржавчинных грибов на растении с использованием «гибридной» модели STICS-MILA (Caubel et al., 2017). Как сообщалось выше, модель STICS (Brisson et al., 2003) позволяет рассчитывать микроклиматические условия в посеве. С другой стороны, модель MILA (Caubel et al., 2012) описывает стадии развития патогенных грибов на листовой пластинке растения в зависимости от микроклиматических условий. Для такого описания авторами предложены эмпирические «общие функции ответа», которые могут быть адаптированы к широкому спектру патогенных грибов (Caubel et al., 2012). Таким образом, в модели STICS-MILA блоки, соответствующие модели MILA, служат для расчета динамики развития грибов на листовой пластинке (см. таблицу, уровень 3б) в микроклиматических условиях, сформированных посевом (см. таблицу, уровень 1) и рассчитываемых блоками модели STICS.

### Моделирование развития инфекции на растении

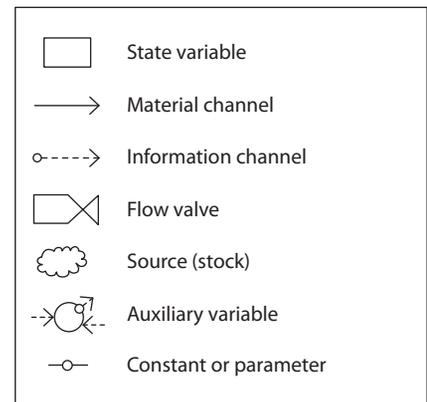
Как правило, всякая механистическая модель развития грибной инфекции на растении (см. таблицу, уровни 2–4) состоит из двух блоков: 1) модель роста и развития растения в посеве в зависимости от абиотических факторов и 2) модель развития организма-патогена на растениях в посеве. Модель развития патогена может включать зависимость его роста как от абиогенных факторов среды, так и от таких факторов, как генотип растения, его устойчивость к патогену, в том числе зависимость от стадии развития и физиологического состояния растения, поражения растения другими патогенами.

Два указанных блока модели имеют каждый свою развитую сеть взаимосвязей между внутренними переменными состояниями. Взаимодействия же между блоками, как правило, описываются посредством небольшого числа параметров. Такое разделение графа взаимосвязей между переменными состояниями общей модели развития инфекции в посеве на два подграфа с относительно малым числом связей между ними и обеспечивает преимущество разбиения общей модели на два блока. В данном случае модели развития растения и грибной фитопатологии связаны через переменные состояния, в число которых входит параметр «площадь зеленой части листовых пластинок». Этот параметр в модели развития растения определяет скорость фотосинтеза, а в модели развития патогена связан со скоростью развития поражения в результате роста и развития гриба. Взаимосвязь грибной инфекции и эффективности фотосинтеза является предметом экспериментальных и теоретических исследований (Robert et al., 2005; Bancal et al., 2007).

### Моделирование роста растения

Рост растения моделируется исходя из соображений баланса энергии и массы: масса фотосинтезируемых углеводов расходуется на рост и поддержание физиологических процессов. Последние включают обеспечение энергией, поддержание градиентов веществ на всех структурных уровнях и процессы синтеза, в том числе и собственно накопление биомассы растения (Торнли, 1982; Simulation..., 1989; Zhu et al., 2011), и реализуются за счет дыхания. Все процессы зависят как от генотипа, фазы развития и физиологического состояния растения, так и от факторов окружающей среды (Торнли, 1982; Simulation..., 1989; Campbell, Norman, 1998; Zhu et al., 2011; Yin, Struik, 2016).

Энергии и материальные субстанции, локализованные в разных или в одних и тех же пространственных структурах, выступают переменными состояниями системы при моделировании. Переменные состояния могут рассматриваться как характеристики определенных компартментов. Процессы превращения энергии и материальных субстанций, рассматриваемые в модели, описываются как потоки между компартментами. Характеристики компартментов и потоки



**Fig. 2.** Symbols for the elements of Forrester diagrams and their interpretation.

между ними подчиняются законам сохранения вещества и энергии. Помимо законов сохранения, динамика физических (в том числе и биологических) систем определяется скоростью процессов, которая описывается некоторой функцией – переменной скорости.

Для графического представления и моделирования сложных систем в самых разных областях часто применяются диаграммы Форрестера (Forrester, 1968; Wallach et al., 2014). Компартменты в них отображаются прямоугольниками, а потоки энергии/вещества – в виде сплошных стрелок, соединяющих соответствующие компартменты (рис. 2). Переменные скорости – вентили на стрелках потоков, а зависимость скоростей от переменных состояния и, возможно, от некоторых внешних параметров указана штриховыми стрелками, идущими к вентилям (это «информационные потоки» в описании системы, которые представляют наши знания о законах ее регуляции). Такие потоки вещества, энергии и информации являются при моделировании многих систем. На рис. 2 приведена интерпретация значков диаграмм Форрестера (Leffelaar, Ferrari, 1989), используемых далее в статье.

Балансовые уравнения могут служить основой для моделирования темпов прохождения фазы развития и сопряженного накопления биомассы. При моделировании роста пшеницы в рамках модели развития фитопатогенной инфекции наряду с балансовыми «физиологическими» моделями часто реализуют непо-

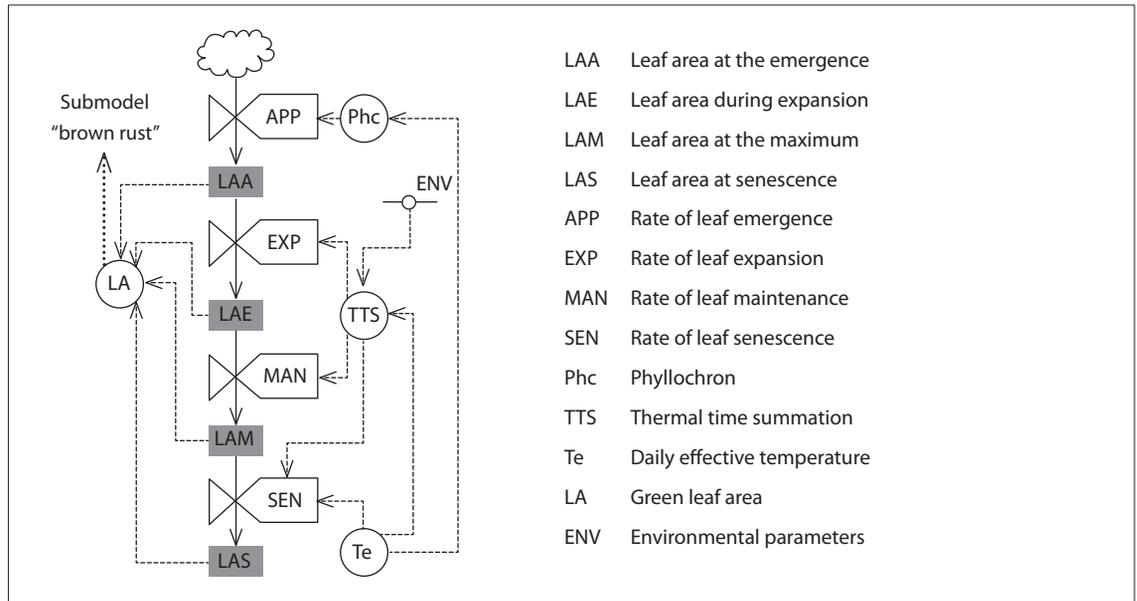


Fig. 3. Reduced scheme of wheat growth and development model (adapted from (Rossi et al., 1997)).

средственный расчет времен прохождения фенофаз в зависимости от абиогенных факторов среды. Описание фенофаз пшеницы хорошо разработано в агрономии и, в частности, может быть показано десятичными индексами (Zadoks et al., 1974). При этом рассматриваются разные стадии развития растений и процессы перехода между ними, что, по сути, соответствует описанию процесса развития в рамках механистической модели. В качестве примера на рис. 3 показана редуцированная схема взаимосвязи процессов, лежащих в основе роста и развития растения пшеницы, и влияния на них погодных условий и степени поражения листовой поверхности грибом.

В модели, представленной на рис. 3, переменные состояния связаны материальными потоками, которые описывают появление листовой пластинки (см. рис. 3, переменная LAA, ее переход в фазу роста (LAE), затем в фазу стабильного размера (LAM) и в фазу старения (LAS). Как видно, в данной модели развития растения базовые процессы, до которых проводится декомпозиция модели, являются сами по себе достаточно сложными биологическими процессами. Это приводит к тому, что на нижнем уровне иерархии в этой механистической модели используются эмпирические зависимости – скорости прохождения фаз описываются эмпирическими функциями от условий среды, календарного времени и «собственного» времени фазы. Например, скорость наступления события, состоящего в появлении очередного листа, определяется темпом прохождения филлохрона (вспомогательная переменная  $Phc_L$  показывает количество температурно-дней, требуемых растению для того, чтобы в результате ростовых процессов появился очередной лист (L)):

$$Phc_L = \sum_{z=1}^{n_L} Te_z \cdot Pht_z,$$

где  $z$  – номер дня развития растения ( $z = 1$  при появлении побега,  $z = n_L$  для листа с порядковым номером  $L$ ),  $Pht_{dz}$  – фотопериодический фактор и  $Te$  – дневная эф-

фективная температура. Два последних параметра вычисляются как

$$Pht_{dz} = (DL_{dz} - DL_0) / (24 - DL_0),$$

$$Te_{dz} = (Tmax_{dz} - Tmin_{dz}) / 2 - T_0,$$

где  $DL_{dz}$  – продолжительность светового дня  $z$ ,  $Tmax_{dz}$  и  $Tmin_{dz}$  – максимальная и минимальная дневные температуры, а параметры  $DL_0$  и  $T_0$  определяются для пшеницы, выращиваемой в конкретном регионе. Выражения для скоростей процессов «EXP», «MAN», «SEN» (см. рис. 3) – также эмпирические функции (подробности см. в работе (Rossi et al., 1997)). Все переменные состояния вносят вклад в дополнительную переменную LA – «площадь зеленой части листовых пластинок», которая входит в модель развития фитопатогена. Примеры моделей роста с базовыми процессами, более близкими к физиологическим процессам энерго- и массообмена в растении, можно найти в (Simulation..., 1989; Maclean et al., 2010).

В модели V. Rossi (Rossi et al., 1997) и других похожих моделях переменных состояния и параметры связаны системой алгебраических и дифференциальных (или разностных) уравнений. При этом, поскольку рассматривается «структурная» модель растения, например отдельные листья, появляющиеся в определенные моменты времени, значения этих параметров динамически изменяются в зависимости от времени. В процессе расчета модели в определенные моменты времени (при наступлении определенных условий) приращение очередной переменной состояния становится ненулевым (выше приведен пример со вспомогательной переменной «филлохрон»). Заметим, что альтернативным формализмом для реализации модели роста растения и формирования его архитектуры может быть формализм дифференциальных L-систем, назначение которого состоит в моделировании динамических систем с изменяющейся структурой (Robert et al., 2008; Зубаирова и др., 2012; Boudon et al., 2012).

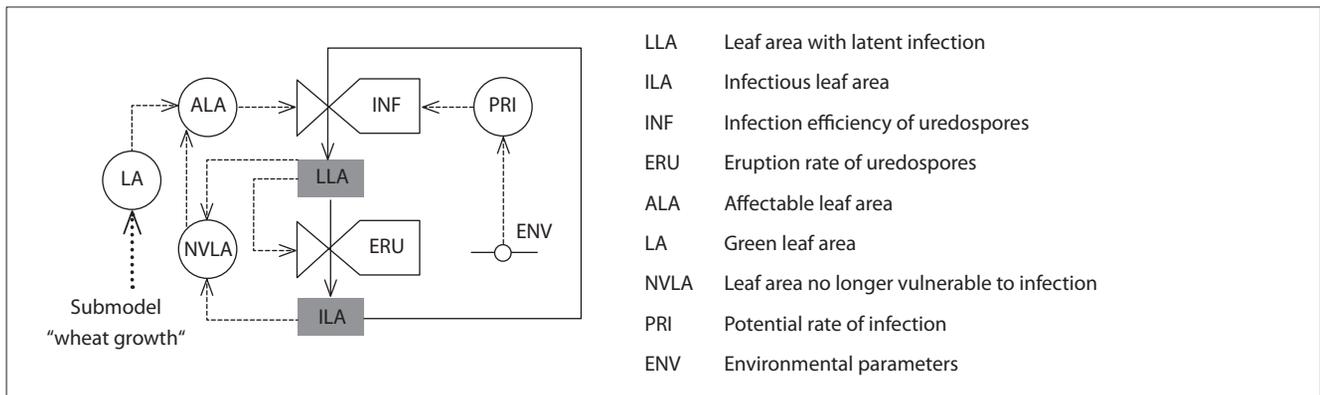


Fig. 4. Reduced scheme of brown rust growth and development model (adapted from (Rossi et al., 1997)).

### Моделирование развития инфекции ржавчины на пшенице

Всякое моделирование есть результат абстрагирования от несущественных деталей явления, рассматриваемого с точки зрения назначения модели. Именно назначение модели определяет множество переменных состояния модели, множество моделируемых процессов и стадий и набор параметров. В опубликованных моделях развития грибной инфекции в посевах число рассматриваемых стадий развития патогена и/или инфекции варьирует от 1 до 8 с медианным значением 3.5 (De Wolf, Isard, 2007). Среди них моделируются распространение спор патогена (McCartney et al., 2006; Pan et al., 2010), попадание их на поверхность листа и прикрепление, прорастание споры и проникновение через устьица в субэпидермальное пространство листа, развитие гриба до формирования нового поколения спор (Lew, 2011; Balmant et al., 2015; Sugai-Guérios et al., 2016). В других моделях некоторые биологические стадии «сворачиваются» и рассматриваются процессы инфицирования, латентного периода и появления пустул (раскрытых мешочков с новыми спорами) (Audsley et al., 2005). Масштабы моделируемых процессов могут варьировать в широких пределах. Так, в некоторых моделях процессы формирования микроклимата и воздушных потоков в посевах и над ними, важные для описания роста, развития и распространения патогенных организмов, имеют пространственную детализацию в один метр при размере моделируемого посева до нескольких километров (McCartney et al., 2006; Pan et al., 2010). В случае же описания развития патогенеза на растении пространственное поведение прорастающей споровой трубки на поверхности листа моделируется с точностью до нескольких микрон (Setten et al., 2015).

На рис. 4 приведена редуцированная схема модели развития инфекции из работы (Rossi et al., 1997). Такой параметр, как скорость инфицирования, управляет потоком спор, попадающих на листовую пластинку и обуславливающих инфекцию. Он является функцией площади листовой поверхности ALA, доступной для заражения, и переменной PRI, потенциальной скорости инфицирования, которая рассчитывается на основе нескольких параметров, в том числе зависящих от состояния окружающей среды (Rossi et al., 1997). В результате развития патогенеза,

согласно этой модели, площадь листовой пластинки с латентной инфекцией увеличивается, что по мере созревания спор со скоростью ERU дает вклад в увеличение доли листовой поверхности ILA, на которой активно проявляется инфекция. Величина ILA представляет собой, по сути, площадь поверхности листа, покрытой пустулами, и поэтому пропорциональна потоку спор, обеспечивающему вклад в инфицирование новой листовой поверхности. Рассмотрение таких циклов инфекции было впоследствии принято как методический прием моделирования развития листостебельных инфекций (De Wolf, Isard, 2007).

### Экспериментальные и теоретические задачи, связанные с параметрической идентификацией моделей

Параметрическая идентификация моделей развития инфекции бурой ржавчины в посевах пшеницы состоит в подборе параметров моделей для их использования в конкретном регионе. Как сказано выше, все элементарные модели в конечном счете представлены эмпирическими функциями. Но поскольку элементарные модели описывают процессы разного уровня функциональной иерархии, их адаптация методически различна. Например, прохождение фенофаз – процесс, управляемый функциональной системой высокого уровня. Для параметрической идентификации модели этого процесса требуются спланированные многофакторные эксперименты либо статистические модели для конкретного региона. С другой стороны, модель прорастания споры описывает процесс, на который влияет меньшее число внешних факторов, и подбор параметров этой модели можно осуществить в результате лабораторного эксперимента.

Среди экспериментальных методов оценки физиологического состояния растений в посевах или в лабораторных условиях и степени поражения растений фитопатогенной инфекцией в последние годы на первое место выдвигаются такие оптические методы, как мультиспектральная и гиперспектральная съемка. Оба метода дают спектральную развертку в каждом элементе (пикселе) изображения и различаются по числу регистрируемых полос спектра отражения каждого элемента объекта. Эти (мульти-/гипер-) спектральные данные совместно с результатами физиологических и/или биохимических измерений обра-

батываются методами распознавания образов и машинного обучения для создания правил интерпретации спектральных данных (Bannari et al., 1995; Bravo et al., 2003; Mahlein et al., 2013). Примером может служить шкала NDVI (Cabrera-Bosquet et al., 2011) – вегетативный индекс, который позволяет при дистанционном зондировании оценивать параметры, характеризующие продукционный процесс в растительном покрове.

## Заключение

К настоящему времени разработаны модели роста и развития растений с разной степенью детализации. Для них проведена адаптация (параметрическая идентификация) с целью их применения в качестве расчетных подсистем в системах поддержки принятия решений о состоянии посевов, развития в них листостебельной инфекции и необходимости тех или иных агротехнических мероприятий.

При разработке системы моделирования развития инфекции в посеве следует определить множество имеющихся экспериментальных данных и инструментальных средств для их получения и скомпоновать модель как систему, состоящую из модулей-моделей, в качестве которых можно использовать уже разработанные и описанные модели базовых процессов. Для реализации модели целесообразно применить пакет, соответствующий цели моделирования и иерархическому уровню разрабатываемой модели, например специализированные программы STICS (Constantin et al., 2012), OpenAlea Modelling Framework (Pradal et al., 2008) и другие для моделирования растений, посевов и агросистем либо средства моделирования более общего назначения (например, Mathematica, Modelica, Matlab и др.).

Кроме того, следует иметь в виду, что появление новых экспериментальных методов и измеряемых параметров совместно с развитием информационных и вычислительных технологий моделирования может потребовать разработки моделей, описывающих процессы, для которых ранее не было возможности получать экспериментальные данные, применять все более совершенные методы идентификации параметров, в результате всего этого имеющих высокую прогностическую способность.

## Список литературы / References

Зубаирова У.С., Пененко А.В., Николаев С.В. Моделирование роста и развития растительных тканей в формализме L-систем. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(4/1): 816-824.  
[Zubairova U.S., Penenko A.V., Nikolaev S.V. Modeling of plant tissue growth and development with L-systems. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(4/1):816-824. (in Russian)]

Санин С.С. Контроль болезней сельскохозяйственных растений – важнейший фактор интенсификации растениеводства. Вестник защиты растений. 2010;1:3-14.  
[Sanin S.S. Crop pathogen control is an important factor of plant cultivation. Vestnik Zashchity Rasteniy = Herald of Plant Protection. 2010;1:3-14 (in Russian)]

Сколотнева Е.С., Леонова И.Н., Букачич Е.Ю., Салина Е.А. Методические подходы к идентификации эффективных генов, определяющих устойчивость пшеницы к комплексу грибных заболеваний. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7): 862-869. DOI 10.18699/VJ17.307.

[Skolotneva E.S., Leonova I.N., Bukatich E.Yu., Salina E.A. Methodical approaches to identification of effective wheat genes providing broad-spectrum resistance against fungal diseases. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):862-869. DOI 10.18699/VJ17.307. (in Russian)]

Торнли Д.Г.М. Математические модели в физиологии растений. Киев: Наук. думка, 1982.  
[Thornley J.H.M. Mathematical Models in Plant Physiology. London: Academic Press, 1976. (Russ. ed.: Tornli D.G.M. Mathematical Models in Plant Physiology. Kiev: Naukova Dumka Publ., 1982. (in Russian)]

Arrow K.J., Hurwicz L., Uzawa H. Constraint qualifications in maximization problems. Naval Res. Log. Quarterly. 1961;8(2):175-191. DOI 10.1002/nav.3800080206.

Audley E., Milne A., Paveley N. A foliar disease model for use in wheat disease management decision support systems. Ann. Appl. Biol. 2005;147(2):161-172. DOI 10.1111/j.1744-7348.2005.00023.x.

Bailey B.N., Stoll R., Pardyjak E.R., Mahaffee W.F. Effect of vegetative canopy architecture on vertical transport of massless particles. Atmos. Environ. 2014;95:480-489. DOI 10.1016/j.atmosenv.2014.06.058.

Balmant W., Sugai-Guérios M.H., Coradin J.H., Krieger N., Furigo Junior A., Mitchell D.A. A model for growth of a single fungal hypha based on well-mixed tanks in series: simulation of nutrient and vesicle transport in aerial reproductive hyphae. PloS One. 2015;10(3): e0120307. DOI 10.1371/journal.pone.0120307.

Bancal M.O., Robert C., Ney B. Modelling wheat growth and yield losses from late epidemics of foliar diseases using loss of green leaf area per layer and pre-anthesis reserves. Ann. Bot. 2007;100(4):777-789. DOI 10.1093/aob/mcm163.

Bannari A., Morin D., Bonn F., Huete A.R. A review of vegetation indices. Remote Sens. Rev. 1995;13(1-2):95-120. DOI 10.1080/02757259509532298.

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 10.1111/J.1364-3703.2008.00487.X.

Boudon F., Pradal P., Cokelaer T., Prusinkiewicz P., Godin C. L-py: an L-system simulation framework for modeling plant architecture development based on a dynamic language. Front. Plant Sci. 2012; 3(76). DOI 10.3389/fpls.2012.00076.

Bravo C., Moshou D., West J., McCartney A., Ramon H. Early disease detection in wheat fields using spectral reflectance. Biosyst. Eng. 2003;84(2):137-145. DOI 10.1016/S1537-5110(02)00269-6.

Brisson N., Gary C., Justes E., Roche R., Mary B., Ripoche D., Zimmer D., Sierra J., Bertuzzi P., Burger P., Bussièrre F. An overview of the crop model STICS. Eur. J. Agron. 2003;18(3-4):309-332. DOI 10.1016/S1161-0301(02)00110-7.

Cabrera-Bosquet L., Molero G., Stellacci A., Bort J., Nogues S., Araus J. NDVI as a potential tool for predicting biomass, plant nitrogen content and growth in wheat genotypes subjected to different water and nitrogen conditions. Cereal Res. Commun. 2011;39(1):147-159. DOI 10.1556/CRC.39.2011.1.15.

Campbell G.S., Norman J.M. An Introduction to Environmental Biophysics. New York: Springer-Verlag, 1998.

Caubel J., Launay M., Lannou C., Brisson N. Generic response functions to simulate climate-based processes in models for the development of airborne fungal crop pathogens. Ecol. Model. 2012; 242:92-104. DOI 10.1016/j.ecolmodel.2012.05.012.

Caubel J., Launay M., Ripoche D., Gouache D., Buis S., Huard F., Huber L., Brun F., Bancal M.O. Climate change effects on leaf rust of wheat: Implementing a coupled crop-disease model in a French regional application. Eur. J. Agron. 2017;90:53-66. DOI 10.1016/j.eja.2017.07.004.

Chamecki M. An analytical model for dispersion of biological particles emitted from area sources: Inclusion of dispersion in the crosswind

- direction. *Agric. For. Meteorol.* 2012;157:30-38. DOI 10.1016/j.agrformet.2012.01.010.
- Chamecki M., Dufault N.S., Isard S.A. Atmospheric dispersion of wheat rust spores: a new theoretical framework to interpret field data and estimate downwind dispersion. *J. Appl. Meteor. Climatol.* 2012; 51(3):672-685. DOI 10.1175/JAMC-D-11-0172.1.
- Chelle M., Andrieu B. Radiative models for architectural modeling. *Agronomie.* 1999;19(3-4):225-240. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00885926/document>.
- Constantin J., Beaudoin N., Launay M., Duval J., Mary B. Long-term nitrogen dynamics in various catch crop scenarios: test and simulations with STICS model in a temperate climate. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2012;147:36-46. DOI 10.1016/j.agee.2011.06.006.
- Cowger C., Wallace L.D., Mundt C.C. Velocity of spread of wheat stripe rust epidemics. *Phytopathology.* 2005;95(9):972-982. DOI 10.1094/PHYTO-95-0972.
- De Wolf E.D., Isard S.A. Disease cycle approach to plant disease prediction. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2007;45(1):203-220. DOI 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143329.
- Donatelli M., Magarey R.D., Bregaglio S., Willocquet L., Whish J.P., Savary S. Modelling the impacts of pests and diseases on agricultural systems. *Agric. Syst.* 2017;155:213-224. DOI 10.1016/j.agry.2017.01.019.
- Duthie J.A. Models of the response of foliar parasites to the combined effects of temperature and duration of wetness. *Phytopathology.* 1997;87(11):1088-1095. DOI 10.1094/PHYTO.1997.87.11.1088.
- El Jarroudi M., Kouadio L., Giraud F., Delfosse P., Tychon B. Brown rust disease control in winter wheat: II. Exploring the optimization of fungicide sprays through a decision support system. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014;21(7):4809-4818. DOI 10.1007/s11356-014-2557-9.
- Forrester J.W. *Principles of Systems.* Cambridge, Massachusetts, USA: Wright-Allen Press Inc., 1968.
- Fournier C., Andrieu B. A 3D architectural and process-based model of maize development. *Ann. Bot.* 1998;81(2):233-250. DOI 10.1006/anbo.1997.0549.
- Gates D.M. *Biophysical Ecology.* New York: Springer-Verlag, 1980.
- Jing Q., Jégo G., Bélanger G., Chantigny M.H., Rochette P. Simulation of water and nitrogen balances in a perennial forage system using the STICS model. *Field Crops Res.* 2017;201:10-18. DOI 10.1016/j.fcr.2016.10.017.
- Junk J., Kouadio L., Delfosse P., El Jarroudi M. Effects of regional climate change on brown rust disease in winter wheat. *Clim. Change.* 2016;135(3-4):439-451. DOI 10.1007/s10584-015-1587-8.
- Kolmer J. Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. *Plant Dis.* 2013;4(1):70-84. DOI 10.3390/f4010070.
- Krause R.A., Massie L.B. Predictive systems: modern approaches to disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1975;13(1):31-47. DOI 10.1146/annurev.py.13.090175.000335.
- Lammoglia S.K., Makowski D., Moeyes J., Justes E., Barriuso E., Mamy L. Sensitivity analysis of the STICS-MACRO model to identify cropping practices reducing pesticides losses. *Sci. Total Environ.* 2017a;580:117-129. DOI 10.1016/j.scitotenv.2016.10.010.
- Lammoglia S.K., Moeyes J., Barriuso E., Larsbo M., Marin-Benito J.M., Justes E., Alletto L., Ubertosi M., Nicolardot B., Munier-Jolain N., Mamy L. Sequential use of the STICS crop model and of the MACRO pesticide fate model to simulate pesticides leaching in cropping systems. *Environ. Sci. Pollution Res.* 2017b;24(8):6895-6909. DOI 10.1007/s11356-016-6842-7.
- Landsberg J., Sands P. *Physiological Ecology of Forest Production. V. 4: Principles, Processes and Models.* Cambridge, Massachusetts, USA: Academic Press, 2010.
- Leffelaar P.A., Ferrari T.J. Some elements of dynamic simulation. *Simulation and Systems Management in Crop Protection.* Wageningen: Pudoc, 1989;19-45.
- Lew R.R. How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011;9(7):509. DOI 10.1038/nrmicro2591.
- MacLean H., Dochain D., Waters G., Dixon M., Chaerle L., Van Der Straeten D. Identification of simple mass balance models for plant growth-Towards food production on manned space missions. *Proc. CAB11.* 2010;43(6):335-340. DOI 10.3182/20100707-3-BE-2012.0028.
- Madden L.V. Botanical epidemiology: some key advances and its continuing role in disease management. *Eur. J. Plant Pathol.* 2006;115: 3-23. DOI 10.1007/s10658-005-1229-5.
- Magarey R.D., Sutton T.B., Thayer C.L. A simple generic infection model for foliar fungal plant pathogens. *Phytopathology.* 2005; 95(1):92-100. DOI 10.1094/PHYTO-95-0092.
- Mahlein A.K., Rumpf T., Welke P., Dehne H.W., Plumer L., Steiner U., Oerke E.C. Development of spectral indices for detecting and identifying plant diseases. *Remote Sens. Environ.* 2013;128:21-30. DOI 10.1016/j.rse.2012.09.019.
- McCartney H.A., Fitt B.D.L., West J.S. Dispersal of foliar plant pathogens: mechanisms, gradients and spatial patterns. *The Epidemiology of Plant Diseases.* Amsterdam: Springer, 2006;159-192. [https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/1-4020-4581-6\\_6.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/1-4020-4581-6_6.pdf).
- Miller N.E., Stoll R., Mahaffee W.F., Pardyjak E.R. Mean and turbulent flow statistics in a trellised agricultural canopy. *Boundary-Layer Meteorol.* 2017;165(1):113-143. DOI 10.1007/s10546-017-0265-y.
- Mundt C.C., Sackett K.E., Wallace L.D. Landscape heterogeneity and disease spread: experimental approaches with a plant pathogen. *Ecol. Appl.* 2011;21(2):321-328. DOI 10.1890/10-1004.1.
- Pan Z., Li X., Yang X.B., Andrade D., Xue L., McKinney N. Prediction of plant diseases through modelling and monitoring airborne pathogen dispersal. *Plant Sciences Reviews.* 2010. CAB1, 191. 2010. DOI 10.1079/PAVSNNR20105018.
- Pradal C., Dufour-Kowalski S., Boudon F., Fournier C., Godin C. OpenAlea: a visual programming and component-based software platform for plant modelling. *Funct. Plant Biol.* 2008;35(10):751-760. DOI 10.1071/FP08084.
- Robert C., Bancal M.O., Ney B., Lannou C. Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status. *New Phytol.* 2005;165(1):227-241. DOI 10.1111/j.1469-8137.2004.01237.x.
- Robert C., Fournier C., Andrieu B., Ney B. Coupling a 3D virtual wheat (*Triticum aestivum*) plant model with a *Septoria tritici* epidemic model (Septo3D): a new approach to investigate plant-pathogen interactions linked to canopy architecture. *Funct. Plant Biol.* 2008;35(10):997-1013. DOI 10.1071/FP08066.
- Rossi V., Racca P., Giosue S., Pancaldi D., Alberti I. A simulation model for the development of brown rust epidemics in winter wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 1997;103(5):453-465. DOI 10.1023/A:1008677407661.
- Savary S., Nelson A.D., Djurle A., Esker P.D., Sparks A., Amorim L., Filho A.B., Caffi T., Castilla N., Garrett K., McRoberts N., Rossi V., Yuen J., Willocquet L. Concepts, approaches, and avenues for modelling crop health and crop losses. *Eur. J. Agron.* 2018. DOI 10.1016/j.eja.2018.04.003.
- Savary S., Stetkiewicz S., Brun F., Willocquet L. Modelling and mapping potential epidemics of wheat diseases – examples on leaf rust and *Septoria tritici* blotch using EPIWHEAT. *Eur. J. Plant Pathol.* 2015;142(4):771-790. DOI 10.1007/s10658-015-0650-7.
- Setten L.M., Lendoiro N., Favret E.A. Wheat leaf rust fungus: RIMAPS analysis to detect germ-tube orientation pattern. *Microsc. Microanal.* 2015;21(S3):227-228. DOI 10.1017/S1431927615001932.
- Simulation of Ecophysiological Processes of Growth in Several Annual Crops. Ed. by F.W.T. Penning de Vries, D.M. Jansen, H.F.M. ten Berge, A. Bakema. V. 29. Wageningen: Pudoc, 1989.
- Sugai-Guérios M.H., Balmant W., Krieger N., Junior A.F., Mitchell D.A. Colonization of solid particles by *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation involves two types of penetrative hyphae: A model-based study on how these hyphae grow. *Biochem. Eng. J.* 2016;114:173-182. DOI 10.1016/j.bej.2016.07.005.

- Tribouillois H., Constantin J., Justes E. Analysis and modeling of cover crop emergence: Accuracy of a static model and the dynamic STICS soil-crop model. *Eur. J. Agron.* 2018;93:73-81. DOI 10.1016/j.eja.2017.12.004.
- Verdier N. Hierarchy: A short history of a word in western thought. Ed. D. Pumain. *Hierarchy in Natural and Social Sciences*. Dordrecht: Springer, 2006;13-37.
- Wallach D., Makowski D., Jones J.W., Brun F. *Working with Dynamic Crop Models: Methods, Tools and Examples for Agriculture and Environment*. London: Academic Press, 2014.
- Watson D.J. Comparative physiological studies on the growth of field crops: I. Variation in net assimilation rate and leaf area between species and varieties and within and between years. *Ann. Bot.* 1947;11:41-76.
- Yin X., Struik P.C. Crop systems biology: where are we and where to go? *Crop Systems Biology: Narrowing the Gaps between Crop Modelling and Genetics*. Springer Int. Publ., 2016. DOI 10.1007/978-3-319-20562-5\_10.
- Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. A Decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Res.* 1974;14(6):415-421. DOI 10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x.
- Zhu X., Song Q., Ort D.R. Elements of a dynamic systems model of canopy photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012;15(3):237-244. DOI 10.1016/j.pbi.2012.01.010.
- Zhu X., Zhang G., Tholen D., Wang Y., Xin C., Song Q. the next generation models for crops and agro-ecosystems. *Sci. China Inf. Sci.* 2011;54(3):589-597. DOI 10.1007/s11432-011-4197-8.

---

#### ORCID ID

U.S. Zubairova [orcid.org/0000-0002-0730-9145](https://orcid.org/0000-0002-0730-9145)  
D.A. Afonnikov [orcid.org/0000-0001-9738-1409](https://orcid.org/0000-0001-9738-1409)

**Acknowledgements.** This work was supported by the Russian Science Foundation, project 17-29-08028 "Modeling of the damage of wheat plantings by leaf rust by computation methods summarizing multifactorial field information from mobile devices".

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received October 15, 2018. Revised November 26, 2018. Accepted November 26, 2018.

## Статистическая и графическая (GGE biplot) оценка адаптивной способности и стабильности селекционных линий ячменя озимого

В.Н. Гудзенко

Мироновский институт пшеницы имени В.Н. Ремесло Национальной академии аграрных наук Украины, Киевская область, с. Центральное, Украина  
✉ e-mail: barleys@mail.ru

В связи с глобальными климатическими изменениями последних лет остро стоит вопрос повышения адаптивного потенциала сельскохозяйственных культур. Необходимо создание сортов озимых зерновых как с экологической адаптивностью, так и способностью формировать стабильный уровень урожайности в разные по гидротермическим условиям года. С целью выведения сортов ячменя озимого с сочетанием урожайности и стабильности в Мироновском институте пшеницы имени В.Н. Ремесло Национальной академии аграрных наук Украины в 2012/2013–2014/2015 гг. испытывали 14 перспективных селекционных линий ячменя озимого, используя четыре различных срока сева. С помощью дисперсионного анализа выявлены достоверные вклады в вариацию урожайности: условий среды – 64.59 %, взаимодействия генотип–среда – 16.84 % и генотипа – 15.57 %. Сроки сева существенно влияли на увеличение варьирования урожайности линий. Разница между средними значениями урожайности по срокам сева в пределах года составляла: 2012/2013 г. – 1.05 т/га, 2013/2014 г. – 0.90 т/га, 2014/2015 г. – 1.25 т/га. Для характеристики взаимодействия генотип–среда и ранжирования линий по урожайности применяли несколько наиболее распространенных статистических параметров адаптивности, стабильности, пластичности и GGE biplot. Использование различных сроков сева на завершающем этапе селекционного процесса ячменя озимого – простой, но эффективный подход, позволяющий более детально оценить адаптивность селекционных линий в меняющихся условиях вегетации. По сравнению с статистическими показателями GGE biplot имеет ряд преимуществ для характеристики взаимодействия генотип–среда. Эта графическая модель позволяет визуализировать ранжирование сред по дифференцирующей способности и репрезентативности, а также выделять генотипы как специфически адаптированные, так и с оптимальным сочетанием потенциала урожайности и стабильности в совокупности сред (мегасред). Выделены селекционная линия с оптимальным сочетанием урожайности и стабильности Pallidum 4816, а также высокопродуктивные линии Pallidum 4857 и Pallidum 4659, которые переданы на государственное сортоиспытание Украины как новые сорта ячменя озимого: МИП Ясон, МИП Оскар и МИП Гладиатор.

Ключевые слова: озимый ячмень; селекционные линии; срок сева; урожайность; взаимодействие генотип–среда; параметры адаптивности, пластичности, стабильности; GGE biplot.

**Для цитирования:** Гудзенко В.Н. Статистическая и графическая (GGE biplot) оценка адаптивной способности и стабильности селекционных линий ячменя озимого. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):110-118. DOI 10.18699/VJ19.469

## Statistical and graphical (GGE biplot) evaluation of the adaptive ability and stability of winter barley breeding lines

V.N. Gudzenko

The V.N. Remeslo Mironovka Institute of Wheat of NAAS of Ukraine, Kiev region, Tcentralnoe village, Ukraine  
✉ e-mail: barleys@mail.ru

Due to current global climate changes, the issue of improving adaptive capacity of crops is of high importance. It is important to create winter crop varieties with both ecological adaptability and yield stability in years with different hydrothermal conditions. In order to develop winter barley varieties with a combination of yield and stability, 14 promising breeding lines have been evaluated in the conditions of the V.M. Remeslo Myronovka Institute of Wheat of NAAS of Ukraine in 2012/2013–2014/2015 using four different sowing dates. The ANOVA revealed a reliable part in yield variation: 64.59 % for environment, 16.84 % for genotype–environment interaction, and 15.57 % for genotype. The sowing dates significantly increased the yield variation of the breeding lines. The differences between the average yields of the lines depending on sowing date within the year were 1.05 t/ha in 2012/2013, 0.90 t/ha in 2013/2014, and 1.25 t/ha in 2014/2015. For genotype–environment interaction interpretation and ranking lines by yield a number of the most known statistical parameters of adaptability, stability, and plasticity and GGE biplot were applied. The use of different sowing dates at the final stage of the winter barley breeding process is a simple but effective approach that allows a more detailed assessment of the adaptive potential of breeding lines in various growing conditions. As compared to statistical parameters, GGE biplot has some advantages for interpretation of genotype–environment interaction. This

graphic model allows ranking environments to be visualized for their discriminating ability and representativeness, as well as both specifically adapted genotypes and the ones with the optimal combination of yield potential and stability to be identified in a set of environments (mega-environment). The breeding line Pallidum 4816 with the optimal combination of yield and stability, as well as the high-yielding breeding lines Pallidum 4857 and Pallidum 4659 were identified and submitted to the State Variety Testing of Ukraine as the new winter barley varieties MIP Yason, MIP Oskar and MIP Hladiator.

Key words: winter barley; breeding lines; sowing date; yield; genotype–environment interaction; parameters of adaptability, plasticity, stability; GGE biplot.

**For citation:** Gudzenko V.N. Statistical and graphical (GGE biplot) evaluation of the adaptive ability and stability of winter barley breeding lines. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):110–118. DOI 10.18699/VJ19.469 (in Russian)

## Введение

В связи с глобальными климатическими изменениями последних лет остро стоит вопрос повышения адаптивного потенциала сельскохозяйственных культур как в экологическом градиенте, так и способности формировать стабильный уровень урожайности в разные по гидротермическим условиям годы (Nicotra et al., 2010; Dimova et al., 2012; Gebremedhin et al., 2014; Mirosavljevic et al., 2014; Ingvordsen et al., 2015; Macholdt, Honermeier, 2016). Сорты озимых культур должны характеризоваться стабильной урожайностью для разного времени всходов, которые могут сильно варьировать в производственных условиях в зависимости от сроков сева, температурного режима почвы и воздуха, влагообеспеченности почвы, срока уборки предшественников и других факторов. Следует отметить, что в производственных условиях лесостепи Украины сроки сева ячменя озимого варьируют в пределах конец сентября–конец октября. При различных сроках появления всходов растения в зимний период и в течение весенне-летней вегетации подвергаются воздействию абиотических и биотических стрессов на разных этапах органогенеза, что может существенно влиять на их рост, развитие и в итоге – на уровень урожайности. Поздние сроки сева (вторая половина октября) в ряде лет существенно снижают урожайность ячменя в результате повреждения при перезимовке, а также неполной компенсации растениями весной недостаточного осеннего кущения. Исследование селекционных линий озимых зерновых культур с использованием различных сроков сева на уровне конкурсного сортоиспытания может позволить целенаправленно отбирать адаптивные генотипы для передачи в систему государственного сортоиспытания.

Для интерпретации результатов многосредовых или многолетних испытаний и выделения перспективных генотипов в разные годы предложен ряд известных математически-статистических методик оценки адаптивной способности, пластичности и стабильности (Wricke, 1962; Finlay, Wilkinson, 1963; Eberhart, Russel, 1966; Tai, 1971; Shukla, 1972; Кильчевский, Хотылева, 1985; Lin, Binns, 1988; Huehn, 1990). В последнее время широкое распространение для характеристики взаимодействия генотип–среда имеют подходы, позволяющие визуализировать распределение генотипов и сред испытания в пространстве главных компонент, в частности GGE biplot модель (Jalata, 2011; Ahmadi et al., 2012; Farshadfar et al., 2012; Mortazavian et al., 2014; Sarkar et al., 2014; Mohammadi et al., 2015; Solonechnyi et al., 2015; Dimitrova-Doneva et al., 2016; Гудзенко и др., 2017). Преимущества и особенности

данного подхода подробно освещены в оригинальных сообщениях (Yan et al., 2000; Yan, Tinker, 2006).

С целью выделения селекционных линий ячменя озимого, которые сочетают потенциал продуктивности и стабильность в контрастные по погодным условиям года, использовали различные сроки сева с последующей интерпретацией экспериментальных данных наиболее распространенными статистическими подходами и GGE biplot.

## Материалы и методы

Исследования проводили в Мироновском институте пшеницы имени В.Н. Ремесло Национальной академии аграрных наук Украины в 2012/2013–2014/2015 гг. Стандарт – сорт ячменя озимого Жерар и 14 перспективных селекционных линий ежегодно сеяли в четыре срока: 27 сентября, 4 октября, 11 октября и 18 октября. Таким образом, за три года получены урожайные данные испытаний линий в 12 средах.

Для ранжирования и оценки селекционных линий по сочетанию урожайности и адаптивности использовали статистические показатели: общая адаптивная способность –  $GAA_i$ , дисперсия специфической адаптивной способности –  $\sigma^2 SAA_i$ , относительная стабильность генотипа –  $Sg_i$ , селекционная ценность генотипа –  $SVG_i$  (Кильчевский, Хотылева, 1985), коэффициент регрессии –  $b_i$  и среднее квадратическое отклонение –  $S^2 d_i$  (Eberhart, Russel, 1966), экваленса –  $W_i$  (Wricke, 1962), показатель преимущества сорта –  $P_i$  (Lin, Binns, 1988), непараметрические показатели стабильности –  $S_i^{(1)}$  и  $S_i^{(2)}$  (Huehn, 1990). Для удобства сравнения линиям по каждому параметру присваивали соответствующий ранг (R). Лучшему значению параметра соответствует единица.

Согласно методике А.В. Кильчевского и Л.В. Хотылевой (1985), характеризовали дифференцирующую способность сред с помощью параметров: продуктивность среды –  $d_k$ , дисперсия взаимодействия генотип–среда –  $\sigma^2(GxE)_{ek}$ , дисперсия дифференцирующей способности среды –  $\sigma^2 DAE_k$ , коэффициент нелинейности ответа генотипов на среду –  $L_{ek}$ , относительная дифференцирующая способность среды –  $S_{ek}$ , коэффициент компенсации среды –  $K_{ek}$ . Для графического анализа применяли пакет прикладных программ GGEbiplotGUI на основе R-программирования (Frutos et al., 2014).

## Результаты

Контрастные по гидротермическому режиму погодные условия лет исследований позволили всесторонне оце-

**Table 1.** Meteorological conditions during the winter barley growth season, 2012/13–2014/15

Month	Monthly precipitation, mm				Monthly average air temperature, °C			
	2012/2013	2013/2014	2014/2015	Long-term mean	2012/2013	2013/2014	2014/2015	Long-term mean
IX	60.0	134.4	23.0	50.6	16.7	12.7	14.7	14.5
X	45.0	7.6	35.0	37.9	10.6	9.6	7.1	8.1
XI	27.0	33.5	17.0	41.2	4.6	6.7	1.7	2.1
XII	98.0	8.1	30.0	41.9	-4.6	-0.5	-2.1	-2.1
I	66.0	33.8	33.0	34.2	-3.8	-4.3	-0.8	-4.3
II	67.0	5.6	21.0	31.0	-0.1	-0.8	-1.3	-3.3
III	89.0	14.2	60.0	33.5	-1.0	6.5	4.7	1.7
IV	35.0	60.7	34.0	42.6	10.5	10.1	9.3	9.2
V	61.0	158.3	55.0	52.8	19.0	17.3	16.3	15.4
VI	57.0	47.5	101.0	84.4	21.4	18.0	19.4	18.5

**Table 2.** Grain yield (metric t/ha) in winter barley breeding lines depending on sowing date in 2012/13

Code	Reference, breeding lines	Sowing date				Mean
		13-1*	13-2*	13-3*	13-4*	
G1	Zherar	4.46	4.32	3.93	3.68	4.10
G2	Pallidum 4857	5.40	5.33	4.75	4.47	4.99
G3	Pallidum 4816	5.21	5.18	4.68	4.41	4.87
G4	Parallelum 4418	4.91	4.72	4.12	3.97	4.43
G5	Pallidum 4483	5.30	5.16	4.45	4.06	4.74
G6	Pallidum 4836	5.41	4.98	4.43	4.02	4.71
G7	Pallidum 4659	5.22	5.19	4.78	4.56	4.94
G8	Pallidum 4031	5.44	4.88	4.37	4.22	4.73
G9	Pallidum 4810	5.49	4.97	4.47	4.09	4.76
G10	Pallidum 4792	4.89	4.75	4.12	4.01	4.44
G11	Pallidum 4860	5.24	5.05	4.48	4.22	4.75
G12	Pallidum 4879	4.97	4.85	4.09	4.01	4.48
G13	Pallidum 4723	5.35	5.17	4.41	4.02	4.74
G14	Pallidum 4654	5.32	5.07	4.35	4.03	4.69
G15	Pallidum 4606	5.12	5.09	4.16	4.12	4.62
Mean		5.18	4.98	4.37	4.13	4.67
LSD <sub>05</sub>		0.32	0.38	0.28	0.36	0.33

Here and below: \* year and sowing date.

нить селекционные линии (табл. 1). Следует отметить, что мягкие зимы 2012/2013–2014/2015 гг. не оказали существенного влияния на результаты испытаний (дифференциации по зимостойкости), а больший вклад в варьирование урожайности имели условия осенней и весенне-летней вегетации.

В 2012/2013 гг. отмечены позднее возобновление весенней вегетации и повышенные температуры воздуха в апреле–июне, что привело к сокращению периода ве-

гетации, практически отсутствию весеннего продуктивного кушения и последующего подгорания зерна. Максимальную среднюю урожайность по опыту линии сформировали в первом сроке сева – 5.18 т/га, несколько ниже во втором – 4.98 т/га (табл. 2). В третьем и четвертом сроках сева урожайность была существенно ниже – 4.37 т/га и 4.13 т/га соответственно. Это связано с тем, что менее развитые растения двух последних сроков сева были более подвержены действию неблагоприятных условий.

Общими особенностями двух последующих лет (2013/2014 и 2014/2015 гг.) были высокий уровень распространения возбудителей болезней (мучнистая роса (*Blumeria (Erysiphe) graminis* (DC.) Golovin ex Speer f. sp. *hordei* Em. Marchal), сетчатая (*Pyrenophora teres* Drechs.), темно-бурая (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.) и полосатая (*Pyrenophora graminea* Ito & Kurib.) пятнистости, а также карликовая ржавчина (*Puccinia hordei* Otth.)).

Существенное превышение количества осадков над многолетней нормой в мае 2014 г. спровоцировало сильное полегание растений, особенно в первых двух сроках сева. Следует отметить, что интенсивному развитию растений в этих сроки сева способствовали и обильные осадки в сентябре 2013 г. Поэтому максимальное значение урожайности было в третьем сроке сева – 4.83 т/га, минимальное в первом – 3.93 т/га (табл. 3).

В целом по сравнению с двумя предыдущими годами условия 2014/2015 г. были наиболее благоприятными для роста и развития ячменя озимого. В то же время у неустойчивых линий в этом году отмечали полегание, особенно в первом сроке сева. Максимальную урожайность отметили во втором сроке сева – 6.33 т/га, наименьшую в последнем – 5.08 т/га (табл. 4).

Обобщая трехлетние результаты исследований, следует отметить, что изменчивость условий вегетации растений в разные годы значительно влияла на урожайность селекционных линий. Сроки сева влияли на увеличение вариабельности урожайности. Разница между средним значением урожайности в опыте по срокам сева в пределах года составляла: 2012/2013 г. – 1.05 т/га, 2013/2014 г. – 0.90 т/га, 2014/2015 г. – 1.25 т/га. При этом максимальный уровень урожайности линий по срокам сева варьировал по годам.

**Table 3.** Grain yield (metric t/ha) in winter barley breeding lines depending on sowing date in 2013/14

Code	Reference, breeding lines	Sowing date				Mean
		14-1	14-2	14-3	14-4	
G1	Zherar	4.15	4.41	5.01	4.45	4.51
G2	Pallidum 4857	5.23	5.46	6.09	5.85	5.66
G3	Pallidum 4816	5.21	5.29	5.79	5.22	5.38
G4	Parallelum 4418	3.81	4.06	5.98	5.44	4.82
G5	Pallidum 4483	3.75	4.02	5.69	5.77	4.81
G6	Pallidum 4836	3.70	4.53	5.46	4.82	4.63
G7	Pallidum 4659	4.50	4.53	4.85	4.84	4.68
G8	Pallidum 4031	4.35	4.63	4.79	4.69	4.62
G9	Pallidum 4810	3.88	4.06	4.32	4.60	4.22
G10	Pallidum 4792	3.55	3.97	4.32	4.62	4.12
G11	Pallidum 4860	3.87	4.13	4.19	4.20	4.10
G12	Pallidum 4879	3.19	3.32	4.34	4.63	3.87
G13	Pallidum 4723	3.44	3.72	3.96	4.04	3.79
G14	Pallidum 4654	3.25	3.76	3.97	3.82	3.70
G15	Pallidum 4606	3.11	3.42	3.67	3.62	3.46
Mean		3.93	4.22	4.83	4.71	4.42
LSD <sub>05</sub>		0.34	0.34	0.31	0.27	0.32

**Table 4.** Grain yield (metric t/ha) in winter barley breeding lines depending on sowing date in 2014/15

Code	Reference, breeding lines	Sowing date				Mean
		15-1	15-2	15-3	15-4	
G1	Zherar	6.12	6.41	5.49	5.34	5.84
G2	Pallidum 4857	6.58	6.78	6.23	5.33	6.23
G3	Pallidum 4816	6.62	7.52	5.98	5.19	6.33
G4	Parallelum 4418	5.74	6.55	5.03	4.55	5.47
G5	Pallidum 4483	5.87	6.03	5.61	4.97	5.62
G6	Pallidum 4836	6.07	6.17	5.68	5.17	5.77
G7	Pallidum 4659	6.83	6.93	6.24	5.91	6.48
G8	Pallidum 4031	5.03	6.90	6.35	5.51	5.95
G9	Pallidum 4810	5.23	6.15	5.65	5.01	5.51
G10	Pallidum 4792	5.11	5.64	5.13	4.63	5.13
G11	Pallidum 4860	6.26	6.30	6.10	5.12	5.95
G12	Pallidum 4879	4.71	5.37	5.16	4.98	5.06
G13	Pallidum 4723	5.09	5.88	5.45	5.03	5.36
G14	Pallidum 4654	5.66	6.03	5.88	4.65	5.56
G15	Pallidum 4606	5.73	6.26	5.46	4.88	5.58
Mean		5.78	6.33	5.70	5.08	5.72
LSD <sub>05</sub>		0.24	0.26	0.27	0.25	0.26

**Table 5.** Analysis of variance for the yields in winter barley breeding lines

Source of variation	SS	df	MS	Percentage of variation
Genotype	63.47	14	4.53*	15.57
Environment	263.28	11	23.93*	64.59
Genotype-environment interaction	68.63	154	0.45*	16.84
Error	12.24	360	0.03	3.00
Total	407.62	539		

Notes: SS – sum of squares, df – degree of freedom, MS – mean square, \* significant at  $p < 0.01$  %.

Наиболее высокая в среднем по опыту урожайность отмечена в 2014/2015 г. во втором сроке сева – 6.33 т/га. Минимальная средняя урожайность была в 2013/2014 г. при первом сроке сева – 3.93 т/га. Абсолютная минимальная урожайность (G15 – 3.11 т/га) отмечена при первом сроке сева 2013/2014 г., максимальная (G3 – 7.52 т/га) – во втором сроке 2014/2015 г. Такая вариабельность урожайности свидетельствует об отсутствии одного универсального календарного срока сева ячменя озимого. Полученные данные подтверждают необходимость создания сортов, способных к реализации продуктивного потенциала при варьирующих сроках сева в производственных условиях.

Дисперсионный анализ показывает, что наибольший вклад в вариацию урожайности имели условия среды – 64.59 %, существенно ниже, практически равнозначно – взаимодействие генотип–среда – 16.84 % и генотип – 15.57 % (табл. 5).

## Обсуждение

Для полного анализа экспериментальных данных взаимодействия генотип–среда необходимо учитывать не только оценку генотипов, но и два других важных аспекта: мегасредовой анализ и оценку сред испытания (Yan, Tinker, 2006).

Одним из преимуществ методики А.В. Кильчевского и Л.В. Хотылёвой (1985) является возможность характеризовать среды испытаний по дифференцирующей способности и другим параметрам (табл. 6). Низкие значения дифференцирующей способности среды ( $\sigma^2 DAE_k$ ) и относительной дифференцирующей способности среды ( $S_{ek}$ ), а также сильный компенсирующий эффект ( $K_{ek} = 0.34-0.56$ ) отмечены во всех четырех сроках сева 2012/2013 г. Следует отметить, что они достаточно сильно различались между собой по продуктивности ( $d_k$ ). Высокими  $\sigma^2 DAE_k$  и  $S_{ek}$  характеризовались четыре срока сева 2013/2014 г., а также первые два срока сева 2014/2015 г. В этих средах отмечен высокий дестабилизирующий эффект ( $K_{ek} = 2.50-5.47$ ). Все сроки сева 2013/2014 г. имели низкую  $d_k$ , особенно первые два. В противоположность этому, первые два срока сева 2014/2015 г. имели наивысшую  $d_k$  в опыте. Условия двух последних сроков сева 2014/2015 г. занимали промежуточное положение между рассмотренными средами, но между собой они достаточно сильно отличались по  $d_k$ . В среде 15-3 преобладали дестабилизирующие эф-

**Table 6.** Test environment parameters for the evaluation and selection of breeding lines

Environment	$d_k$	$\sigma^2(G \times E)_{ek}$	$\sigma^2 DAE_k$	$L_{ek}$	$S_{ek}$	$K_{ek}$
13-1	0.25	0.13	0.07	1.93	4.93	0.56
13-2	0.04	0.10	0.05	1.88	4.61	0.46
13-3	-0.56	0.04	0.05	0.74	5.26	0.46
13-4	-0.81	0.05	0.04	1.29	4.80	0.34
14-1	-1.00	0.11	0.42	0.27	16.52	3.64
14-2	-0.72	0.09	0.36	0.24	14.17	3.09
14-3	-0.11	0.33	0.63	0.53	16.49	5.47
14-4	-0.23	0.23	0.42	0.54	13.77	3.63
15-1	0.84	0.18	0.41	0.45	11.04	3.51
15-2	1.39	0.09	0.29	0.32	8.51	2.50
15-3	0.76	0.08	0.17	0.50	7.21	1.46
15-4	0.15	0.09	0.12	0.76	6.69	1.00

Notes:  $d_k$ , productivity of the environment;  $\sigma^2(G \times E)_{ek}$ , variance of genotype  $\times$  environment interaction;  $\sigma^2 DAE_k$ , variance of the discriminating ability of the environment;  $L_{ek}$ , coefficient of the nonlinear response of the genotype in the environment;  $S_{ek}$ , relative discriminating ability of the environment;  $K_{ek}$ , coefficient of compensation of the environment.

факты, а в 15-4 эффекты компенсации и дестабилизации были на одном уровне. Приведенные данные указывают на различную продуктивность фонов исследований, а также на их способность дифференцировать генотипы. Условия сред 13-1, 13-2, 13-3, 13-4 можно характеризовать как нивелирующий фон; 14-1, 14-2, 14-3, 14-4, 15-1, 15-2 – анализирующий; 15-3, 15-4 – стабилизирующий.

Характеристика селекционных линий по параметрам адаптивной способности, пластичности и стабильности приведена в табл. 7 и 8. Ранги (R) отчетливо указывают на оценку линий тем или иным параметром и позволяют дифференцировать генотипы между собой. Максимальная общая адаптивная способность ( $GAA_i$ ) отмечена у линий G2 и G3. Самое низкое значение дисперсии специфической адаптивной способности ( $\sigma^2 SAA_i$ ) было у селекционной линии G10, самое высокое – у G15. Следует отметить, что линия G15 уступала остальным по показателям относительной стабильности ( $Sg_i$ ) и селекционной ценности генотипа ( $SVG_i$ ). По этим показателям преимущество имела селекционная линия G2. Оптимальной реакцией на изменение условий среды по коэффициенту регрессии ( $b_i$ ) характеризовалась линия G3. Близкой к оптимальной была реакция у линий G8, G6, G4, G13. Наименее реагировала на изменение условий среды линия G2, наиболее – G15. В соответствии с среднеквадратическим отклонением ( $S^2 d_i$ ) и эквивалентом ( $W_i$ ) стабильными были линии G10 и G9. По показателю преимущества сорта ( $P_i$ ) существенно преобладали линии G3 и G2. Лучшее значение первого непараметрического показателя стабильности ( $S_i^{(1)}$ ) имела линия G10, второго непараметрического показателя стабильности ( $S_i^{(2)}$ ) – G2. Таким образом, следует отметить существенное изменение рангов селекционных линий по разным показателям.

Для определения связей между приведенными параметрами и средней урожайностью использовали корреляционный анализ (табл. 9). Большинство показателей ( $\sigma^2 SAA_i$ ,  $b_i$ ,  $S_i^{(1)}$ ,  $S_i^{(2)}$ ,  $W_i$ ,  $Sg_i$ ) не имело существенной связи со средней урожайностью. Таким образом, отбор линий только по этим показателям может способствовать выделению стабильных генотипов, но практически без учета их уровня урожайности. В то же время в коммерческом сорте

**Table 7.** Ranking of winter barley breeding lines according to parameters of adaptive ability and stability

Code	$GAA_i$	R	$\sigma^2 SAA_i$	R	$Sg_i$	R	$SVG_i$	R
G1	-0.12	10	0.74	10	17.81	12	2.20	13
G2	0.69	1	0.48	3	12.31	1	3.52	1
G3	0.59	2	0.72	9	15.32	5	2.95	2
G4	-0.03	8	0.76	11	17.72	11	2.26	10
G5	0.12	5	0.63	7	15.70	7	2.64	7
G6	0.10	6	0.59	5	15.25	4	2.70	4
G7	0.43	3	0.78	12	16.46	9	2.68	6
G8	0.16	4	0.67	8	16.07	8	2.60	8
G9	-0.11	9	0.49	4	14.57	3	2.69	5
G10	-0.37	13	0.34	1	12.81	2	2.78	3
G11	-0.01	7	0.78	13	17.94	13	2.24	12
G12	-0.47	15	0.48	2	15.46	6	2.36	9
G13	-0.31	12	0.62	6	16.94	10	2.24	11
G14	-0.29	11	0.85	14	19.81	14	1.84	14
G15	-0.38	14	1.01	15	22.05	15	1.50	15

Notes:  $GAA_i$ , general adaptive ability;  $\sigma^2 SAA_i$ , variance of specific adaptive ability;  $Sg_i$ , relative stability of the genotype;  $SVG_i$ , selection value of the genotype; R, rank of the genotype.

**Table 8.** Ranking of winter barley breeding lines according to parametric and nonparametric measures of plasticity and stability

Code	$b_i$	R	$S^2d_i$	R	$W_i$	R	$P_i$	R	$S_i^{(1)}$	R	$S_i^{(2)}$	R
G1	1.07	4	0.15	9	1.60	9	0.49	8	0.52	12	22.18	14
G2	0.71	8	0.74	15	2.28	13	0.07	2	0.18	2	2.18	1
G3	1.00	1	0.22	13	2.29	14	0.06	1	0.26	3	5.73	3
G4	0.97	2	0.29	14	2.91	15	0.47	7	0.59	14	23.20	15
G5	0.93	4	0.18	12	1.92	11	0.39	6	0.45	10	8.91	10
G6	1.02	3	0.06	3	0.62	3	0.36	4	0.39	6	5.84	4
G7	1.15	5	0.09	4	1.09	4	0.18	3	0.33	5	6.91	6
G8	1.01	2	0.16	10	1.63	10	0.37	5	0.67	15	16.75	13
G9	0.93	5	0.05	2	0.60	2	0.61	10	0.45	11	8.45	9
G10	0.80	7	0.01	1	0.43	1	0.86	11	0.17	1	3.02	2
G11	1.16	6	0.09	5	1.10	5	0.53	9	0.44	8	7.75	7
G12	0.83	6	0.13	6	1.47	7	1.08	15	0.41	7	5.93	5
G13	0.97	3	0.13	7	1.37	6	0.91	13	0.26	4	11.73	12
G14	1.18	7	0.13	8	1.58	8	0.89	12	0.44	9	8.18	8
G15	1.27	8	0.18	11	2.25	12	1.04	14	0.53	13	10.18	11

Notes:  $b_i$ , coefficient of regression;  $S^2d_i$ , mean square deviation;  $W_i$ , ecovalence;  $P_i$ , cultivar superiority measure;  $S_i^{(1)}$  and  $S_i^{(2)}$ , nonparametric stability measures; R, rank of the genotype.

**Table 9.** Spearman's coefficient of rank correlation between mean yield and indices of adaptability, plasticity and stability

Index	Mean yield	$b_i$	$S^2d_i$	$W_i$	$P_i$	$S_i^{(1)}$	$S_i^{(2)}$	$\sigma^2SAA_i$	$Sg_i$
$b_i$	-0.17								
$S^2d_i$	0.56	-0.42							
$W_i$	0.28	0.06	0.64						
$P_i$	-0.96	0.16	-0.45	-0.21					
$S_i^{(1)}$	-0.24	0.48	-0.23	0.27	0.13				
$S_i^{(2)}$	-0.19	0.29	-0.08	0.41	0.02	0.74			
$\sigma^2SAA_i$	-0.01	0.91	-0.07	0.46	0.04	0.52	0.40		
$Sg_i$	-0.42	0.88	-0.26	0.32	0.43	0.58	0.45	0.91	
$SVG_i$	0.72	-0.75	0.47	-0.11	-0.71	-0.55	-0.43	-0.69	-0.93

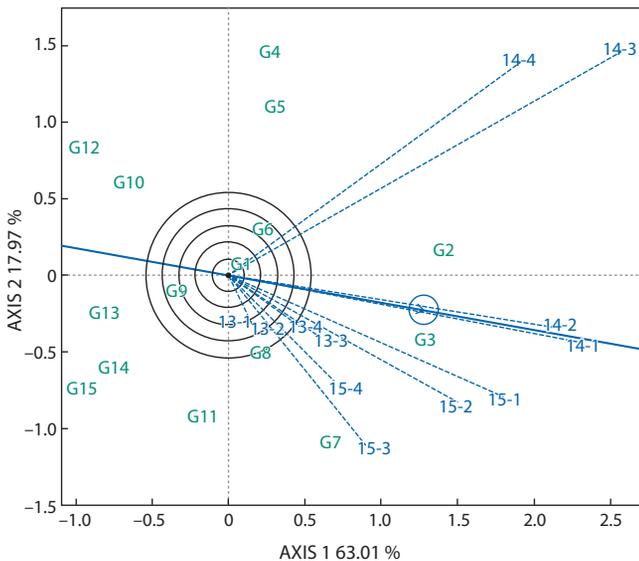
необходимо стремиться достичь оптимального баланса между урожайностью и стабильностью. Высокая отрицательная связь выявлена между средней урожайностью и показателем преимущества генотипа  $P_i$  ( $r = -0.96$ ). Это свидетельствует о том, что  $P_i$  преимущественно связан со средним уровнем урожайности, но меньше характеризует стабильность генотипов. Вышесредняя корреляция отмечена между урожайностью и  $SVG_i$  ( $r = 0.72$ ). Это может указывать на то, что  $SVG_i$  более сбалансирован по сочетанию урожайности и стабильности.

Высокую отрицательную корреляцию отметили между параметрами  $Sg_i$  и  $SVG_i$  ( $r = -0.93$ ), положительную – между  $b_i$  и  $\sigma^2SAA_i$  ( $r = 0.91$ ), а также  $Sg_i$  и  $b_i$  ( $r = 0.88$ ). Существенная отрицательная связь отмечена между  $SVG_i$  и  $b_i$  ( $r = -0.75$ ),  $P_i$  и  $SVG_i$  ( $r = -0.71$ ), а также  $SVG_i$  и  $\sigma^2SAA_i$  ( $r = -0.69$ ), положительная – между двумя непараметри-

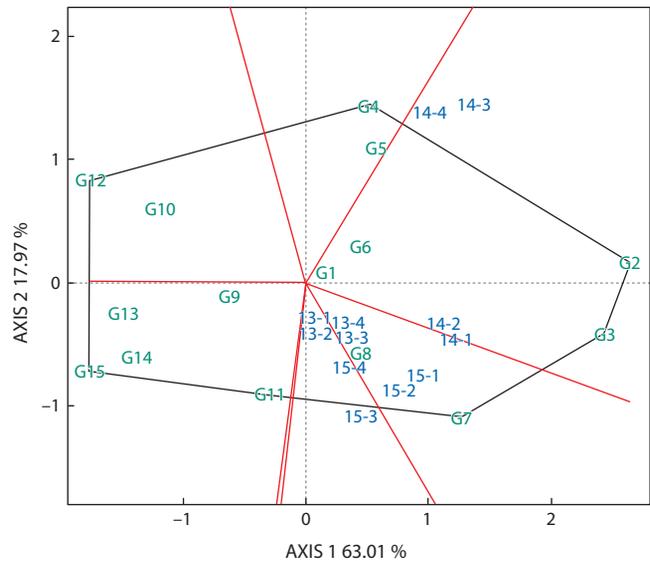
ческими показателями  $S_i^{(1)}$  и  $S_i^{(2)}$  ( $r = 0.74$ ). Выявленные закономерности связей между урожайностью и показателями стабильности следует учитывать при общей оценке адаптивности генотипов.

W. Yan с коллегами (2007) сообщают, что GGE biplot имеет преимущество по сравнению с другими статистическими моделями, поскольку позволяет характеризовать все три аспекта генотип-средовых испытаний: генотипы, среды и мегасредовой анализ. Важным инструментом GGE biplot является также то, что в одной модели объединены (а не разъединены) два главных источника вариации в мегасредовом анализе: генотип и взаимодействие генотип–среда.

В нашем случае первые две главные компоненты (Axis 1, Axis 2) GGE biplot модели объясняют 80.98 % взаимодействия генотип–среда. На рис. 1 показана срав-



**Fig. 1.** Discriminating ability against representativeness of test environments.



**Fig. 2.** The "which-won-where" view of the GGE biplot.

нительная характеристика сред по дифференцирующей способности и репрезентативности. Линия, проходящая сквозь центр GGE biplot, представляет собой среднюю ось сред. Пунктирные линии, соединяющие центр GGE biplot с годами испытаний, являются векторами сред. Более длинный вектор информирует о большей дифференцирующей способности соответствующей среды. В этом случае повышенной дифференцирующей способностью характеризуются среды 14-3, 14-4, 14-1, 14-2, 15-1, 15-2, 15-3, несколько ниже – 15-4, низкой – 13-1, 13-2, 13-3, 13-4. Угол между средней осью сред и вектором конкретной среды характеризует его репрезентативность. Меньший угол соответствует более высокой репрезентативности. Максимальная репрезентативность отмечена в средах 14-1 и 14-2. В целом следует отметить, что среды 14-1 и 14-2 сочетали высокие уровни дифференцирующей способности и репрезентативности. Чем меньше угол между векторами сред, тем более похожи эти среды между собой по уровню урожайности, и наоборот. Наиболее близкими между собой были среды 14-1, 14-2, наиболее отличались 14-4 и 13-1.

GGE biplot «кто-где-победил» позволяет визуализировать преимущество генотипов в отдельной среде или группе сред (рис. 2).

Линиями, отходящими из центра GGE biplot, двухкомпонентное пространство распределено на сектора, в которых распределены среды и генотипы. На углах полигональной фигуры расположены генотипы, которые имеют преимущество в определенных средах или группе сред (мегасреда, mega-environment). Так, линии G2 и G3 являются лучшими в совокупности сред 14-1, 14-2, 14-3, 14-4. В этом секторе разместились также генотипы G6 и G1. Преимущество в мегасреде, образованной совокупностью сред 15-1, 15-2, 13-3, 13-4, имеет линия G7. К этому сектору принадлежит также линия G8. Генотипы, попавшие в сектора без сред, уступали приведенным выше линиям по адаптивности.

На рис. 3 представлен GGE biplot, характеризующий селекционные линии по сочетанию средней урожайности и стабильности. Ось, проходящая сквозь центр GGE biplot по горизонтали, с обозначенной кругом стрелкой, является средней для сред абсциссой. Слева направо образцы ранжированы по средней урожайности. В вертикальном направлении среднюю для сред абсциссу пересекает средняя для сред ордината. Место их пересечения одновременно представляет среднее значение урожайности по опыту. Линии, расположенные правее от нее, имеют вышесреднюю по опыту урожайность, левее – урожайность ниже, чем по опыту. Удаленность образцов от оси абсцис по оси ординат в обоих направлениях характеризует вариабельность урожайности по отношению к ожидаемому ее уровню проявления в конкретных годах. Чем ближе генотипы размещены к абсциссе, тем они стабильнее, и наоборот, чем более они отдалены, тем больше их вариабельность.

Таким образом, максимальной урожайностью по убывающей характеризуются линии G2, G3, G7. Линия G3 имела большую стабильность по сравнению с G2 и G7. Это связано с тем, что урожайность линии G2 была несколько выше, чем прогнозируемая в средах 14-3 и 14-4, а линии G7 – в средах 15-1, 15-2, 15-3, 15-4. Генотипы G8, G6, G5, G1, G4 и G11 имеют урожайность, близкую к среднему значению по опыту. Линии G9, G14, G10, G13, G15 и G12 уступают по урожайности среднему ее значению по опыту. Повышенной стабильностью характеризуются стандарт Жерар (G1) и линии G10, G12, G9, G8. Наиболее вариабельными были генотипы G4 и G15.

На рис. 4 отражено ранжирование генотипов по отношению к гипотетическому «идеальному» генотипу, который условно должен располагаться в центре центральных кругов. Линия G3 – максимально близка к нему. Таким образом, линия G3 (Pallidum 4816) оптимально сочетает потенциал урожайности и адаптивности. Уступают ей по стабильности линия G2 (Pallidum 4857), по урожайности и стабильности – G7 (Pallidum 4659). Генотипы G8, G6,

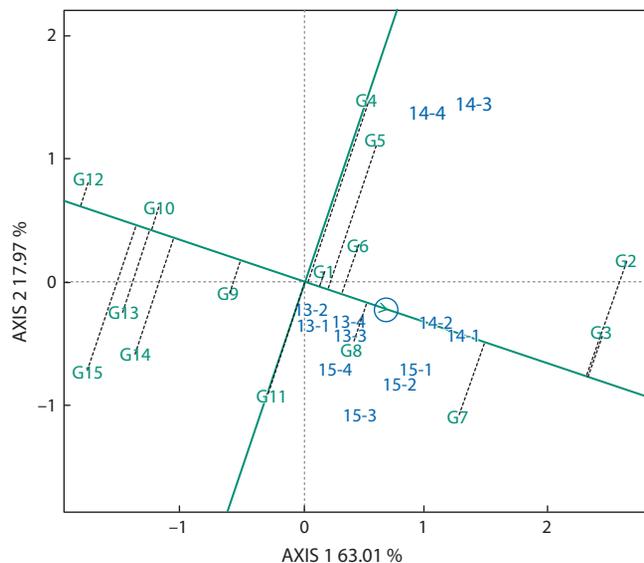


Fig. 3. The average-environment coordination view of the GGE biplot “mean against stability”.

G1, G11, G5, G4, G1 уступают названным выше линиям по урожайности. Линии G9, G14, G13, G15, G10, G12 с урожайностью ниже средней по опыту не имеют практической ценности в дальнейшей селекционной работе.

### Заключение

Использование различных сроков сева на завершающем этапе селекционного процесса ячменя озимого – простой, но практичный и эффективный способ оценки и отбора генотипов, которые сочетают потенциал урожайности и более высокую стабильность в условиях погодных флуктуаций разных лет выращивания.

Статистические показатели по-разному характеризуют исследуемые генотипы. Большинство ( $\sigma^2 SAA_i$ ,  $b_i$ ,  $S_i^{(1)}$ ,  $S_i^{(2)}$ ,  $W_i$ ,  $Sg_i$ ) оценивают преимущественно стабильность, без учета уровня продуктивности. Показатель  $P_i$  имеет близкую к отрицательной функциональную связь со средней урожайностью. Относительно сбалансированным по стабильности и продуктивности можно считать  $SVG_i$ . Эти закономерности необходимо учитывать при характеристике генотипов для объективной интерпретации экспериментальных данных.

По сравнению со статистическими параметрами GGE biplot обладает рядом преимуществ, позволяющих визуально анализировать различные аспекты генотип-средовых испытаний, а также выделять как специфически адаптированные генотипы, так и номера с оптимальным сочетанием потенциала урожайности и стабильности в ряде сред (мегасреде).

Совместное использование как статистических параметров, так и визуализаций GGE biplot способствует максимальной информативности при оценке взаимодействия генотипа и среды, а также выделению ценных генотипов.

В результате исследований выделены селекционная линия с оптимальным сочетанием урожайности и стабильности, Pallidum 4816, а также две высокопродуктивные линии, Pallidum 4857 и Pallidum 4659, переданные на

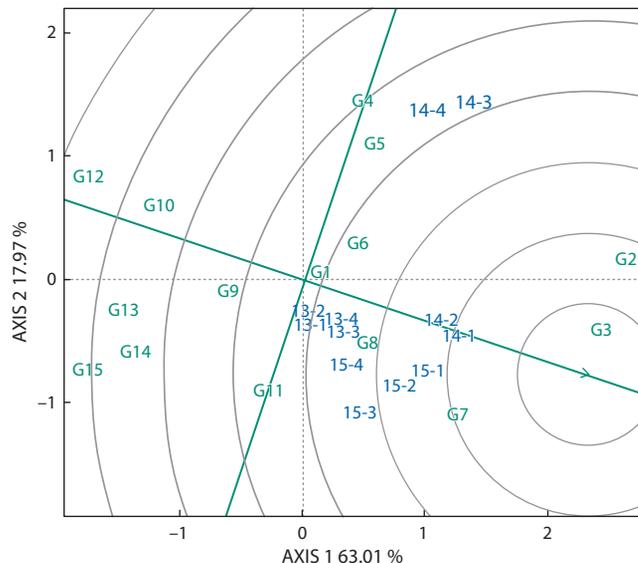


Fig. 4. Ranking winter barley breeding lines based on both mean performance and stability with reference to the “ideal” genotype.

государственное сортоиспытание Украины как сорта ячменя озимого: МИП Ясон, МИП Оскар и МИП Гладиатор соответственно.

### Список литературы / References

- Гудзенко В.М., Демидов О.А., Васильківський С.П., Коляденко С.С. Графічний аналіз адаптивності селекційних ліній ячменю ярого в Центральному Лісостепу України. Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2017;13(1):20-27. DOI 10.21498/2518-1017.1.2017.97233.
- [Gudzenko V.N., Demydov O.A., Vasylykivskiy S.P., Koliadenko S.S. Graphical analysis of adaptability of spring barley breeding lines in the Central Forest-Steppe zone of Ukraine. Plant Varieties Studying and Protection. 2017;13(1):20-27. DOI 10.21498/2518-1017.1.2017.97233. (in Ukrainian)]
- Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Метод оценки адаптивной способности и стабильности генотипов дифференцирующей способности среды. Сообщение 1. Обоснование метода. Генетика. 1985;21(9):1481-1490.
- [Kilchevskiy A.V., Khotyleva L.V. Method of evaluation of adaptive ability and stability of genotypes, the differentiating ability of environment. Report 1. Validation of the method. Genetika = Genetics (Moscow). 1985;21(9):1481-1490. (in Russian)]
- Ahmadi J., Vaezi B., Fotokian M.H. Graphical analysis of multi-environment trials for barley yield using AMMI and GGE-biplot under rain-fed conditions. J. Plant Physiol. Breed. 2012;2(1):43-54.
- Dimitrova-Doneva M., Valcheva D., Mihova G., Dyulgerova B. Genotype-environment interaction and stability analysis for grain yield of winter barley in the conditions of North-East and South Bulgaria. Agric. Sci. Technol. 2016;8(1):19-23.
- Dimova D., Krasteva L., Panayotov N., Svetleva D., Dimitrova M., Georgieva T. Evaluation of the yield and the yield stability of perspective lines of barley. Agrozanje. 2012;13(1):55-60.
- Eberhart S.A., Russel W.A. Stability parameters for comparing varieties. Crop. Sci. 1966;6:36-40. DOI 10.2135/cropsci1966.0011183X00600010011x.
- Fashadfar E., Mohammadi R., Aghae M., Vaisi Z. GGE biplot analysis of genotype × environment interaction in wheat-barley disomic addition lines. Aust. J. Crop Sci. 2012;6(6):1074-1079.
- Finlay K.W., Wilkinson G.N. The analysis adaptation in a plant breeding programme. Aust. J. Agric. Res. 1963;14:742-754. DOI 10.1071/AR9630742.

- Frutos E., Galindo M.P., Leiva V. An interactive biplot implementation in R for modeling genotype-by-environment interaction. *Stoch. Environ. Res. Risk Assess.* 2014;28:1629-1641. DOI 10.1007/s00477-013-0821-z.
- Gebremedhin W., Firew M., Tesfye B. Stability analysis of food barley genotypes in Northern Ethiopia. *Afr. Crop Sci. J.* 2014;22(2): 145-153.
- Huehn M. Nonparametric measures of phenotypic stability. Part 1: Theory. *Euphytica.* 1990;47:189-194. DOI 10.1007/BF00024241.
- Ingvordsen C.H., Backes G., Lyngkjær M.F., Peltonen-Sainio P., Jensen J.D., Jalli M., Jahoor A., Rasmussen M., Mikkelsen T.N., Stockmarr A., Jørgensen R.B. Significant decrease in yield under future climate conditions: Stability and production of 138 spring barley accessions. *Europ. J. Agron.* 2015;63:105-113.
- Jalata Z. GGE-biplot analysis of multi-environment yield trials of barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes in Southeastern Ethiopia Highlands. *Int. J. Plant Breed. Genet.* 2011;5(1):59-75.
- Lin C.S., Binns M.R. A superiority measure of cultivar performance for cultivar  $\times$  location data. *Can. J. Plant Sci.* 1988;68:193-198. DOI 10.4141/cjps88-018.
- Macholdt J., Honermeier B. Impact of climate change on cultivar choice: adaptation strategies of farmers and advisors in German cereal production. *Agronomy.* 2016;6(40). DOI 10.3390/agronomy 6030040.
- Mirosavljevic M., Przulj N., Bocanski J., Stanisavljevic D., Mitrovic B. The application of AMMI model for barley cultivars evaluation in multi-year trials. *Genetika.* 2014;46(2):445-454.
- Mohammadi M., Noorinia A.A., Khalilzadeh G.R., Hosseinpoo T. Application of GGE biplot analysis to investigate GE interaction on barley grain yield. *Curr. Opin. Agric.* 2015;4(1):25-32.
- Mortazavian S.M.M., Nikkiah 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.
- Nicotra A.B., Atkin O.K., Bonser S.P., Davidson A.M., Finnegan E.J., Mathesius U., Poot P., Purugganan M.D., Richards C.L., Valladares F., van Kleunen M. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci.* 2010;15(12):684-692. DOI 10.1016/j.tplants.2010.09.008.
- Sarkar B., Sharma R.C., Verma R.P.S., Sarkar A., Sharma I. Identifying superior feed barley genotypes using GGE biplot for diverse environments in India. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 2014;74(1): 26-33.
- Shukla G.K. Some statistical aspects of partitioning genotype-environmental components of variability. *Heredity.* 1972;29:237-245. DOI 10.1038/hdy.1972.87.
- 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.
- Tai G.C.C. Genotypic stability analysis and its application to potato regional traits. *Crop Sci.* 1971;11:184-190. DOI 10.2135/cropsci1971.0011183X001100020006x.
- Wricke G. Über eine methode zur erfassung der ökologischen streubreite in feldversuchen. *Z. Pflanzenzuchtg.* 1962;47:92-96.
- Yan W., Hunt L.A., Shen Q., Szlavnic 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., Ma B., Woods S., Cornelius P.L. GGE biplot vs. AMMI analysis of genotype-by-environment data. *Crop Sci.* 2007; 47:641-653. 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.

**ORCID ID**

V.N. Gudzenko orcid.org/0000-0002-9738-1203

**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Received March 25, 2018. Revised June 19, 2018. Accepted December 25, 2018.

DOI 10.18699/VJ19.470

## Исправление к статье «Влияние погодных-климатических условий на содержание белка и масла в семенах сои на Северном Кавказе»

А.Ю. Новикова, И.В. Сеферова, А.Ю. Некрасов, И.Н. Перчук, Т.В. Шеленга, М.Г. Самсонова, М.А. Вишнякова  
Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):708-715

На странице 714 в разделе Благодарности вместо

«Работа выполнена при поддержке субсидии в целях реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.575.21.0136 от 26.09.2017) на базе уникальной научной установки Коллекция генетических ресурсов растений ВИР»

следует читать:

«Работа выполнена при поддержке субсидии в целях реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.575.21.0136 от 26.09.2017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57517X0136) на базе уникальной научной установки Коллекция генетических ресурсов растений ВИР».

Оригинальная статья может быть найдена по DOI 10.18699/VJ18.414

DOI 10.18699/VJ19.470

## Erratum to: “Impact of weather and climate on seed protein and oil content of soybean in the North Caucasus”

L.Yu. Novikova, I.V. Seferova, A.Yu. Nekrasov, I.N. Perchuk, T.V. Shelenga, M.G. Samsonova, M.A. Vishnyakova  
Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):708-715. (in Russian)

Page 714, in Acknowledgement instead of

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

should read

This work was supported by the Federal Targeted Program “Research and development in the top-priority fields of the scientific and technological complex of Russia, 2014–2020”, agreement 14.575.21.0136 of 26.09.2017, unique project identifier RFMEFI57517X0136. Experiments were conducted at the premises of the unique research facility “VIR plant genetic resources gene bank”.

The original article can be found under DOI 10.18699/VJ18.414

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>  
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”  
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/  
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science.

Открытый доступ к полным текстам:  
на сайте ИЦиГ СО РАН – [bionet.nsc.ru/vogis/](http://bionet.nsc.ru/vogis/)  
платформе Elpub – [vavilov.elpub.ru/index.php/jour](http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour)  
платформе Научной электронной библиотеки – [elibrary.ru/title\\_about.asp?id=32440](http://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](mailto: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 19.02.2019. Выход в свет 28.02.2019. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 13.95.

Уч.-изд. л. 15.2. Тираж 150 экз. Заказ № 19. Цена свободная.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.