

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ21.016

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

Л.И. Афтanas – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
 В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия)
 Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)
 А. Бёрнер – д-р наук (Германия)
 М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
 И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)
 Г.Л. Дианов – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
 Ю.Е. Дуброва – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
 Н.Н. Дыгало – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
 И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)
 И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
 С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
 И.Е. Керкис – д-р наук (Бразилия)
 А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
 С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
 А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
 Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
 Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
 В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
 В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
 А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США)
 И.Б. Rogozin – канд. биол. наук (США)
 А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
 Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)
 К.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)
 Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)
 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)
 И.Н. Лебедев – д-р биол. наук, проф. (Россия)
 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)
 Л.Ю. Новикова – канд. техн. наук (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 SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJ21.016

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

Executive Secretary

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

Editorial council

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
 V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
 L.A. Beshpalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia
 A. Börner, Dr. Sci., Germany
 M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan
 G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
 Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
 N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
 J. Le Gouis, Dr. Sci., France
 I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany
 S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
 I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil
 E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
 L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
 E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
 A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
 A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
 S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
 B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands
 V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia
 V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
 I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States
 A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia
 A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States
 E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
 S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
 K.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
 N.P. Bondar, Cand. Sci. (Biology), Russia
 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
 I.N. Lebedev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
 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
 L.Yu. Novikova, Cand. Sci. (Engineering), Russia
 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. Turuspekova, Cand. Sci. (Biology), Kazakhstan

Генетическая инженерия

- 139 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Мутации в гене *A34R*, приводящие к увеличению иммуногенности вируса осповакцины. *С.Н. Щелкунов, Т.В. Бауэр, С.Н. Якубицкий, А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, С.А. Пьянков*
- 147 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Увеличение доли трансгенных растений в потомстве трансформантов рапса *Brassica napus* L. *Г.Н. Ралдугина, Т.Ж. Хоанг, Х.Б. Нзюк, И.В. Карпычев*
- 157 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Положительный опыт применения биобаллистического подхода к картофелю сортов Аксорт и Невский. *Н.П. Малахова, Ю.А. Скиба, Г.А. Исакова, Д.А. Найзабаева, Б.К. Тезекбаева, Г.А. Исмагулова, Э.Р. Мальцева* (на англ. языке)

Селекция растений на иммунитет и качество

- 164 **ОБЗОР**
Генетические аспекты устойчивости картофеля к фитофторозу. *Т.С. Фролова, В.А. Черенко, О.И. Синицына, А.В. Кочетов*
- 171 **ОБЗОР**
Проблемы и возможности изучения пивоваренных признаков ячменя с использованием молекулярно-генетических подходов. *Н.В. Трубацеева, Л.А. Першина*
- 178 **ОБЗОР**
Антоцианы как компоненты функционального питания. *Р.С. Юдина, Е.И. Гордеева, О.Ю. Шоева, М.А. Тихонова, Е.К. Хлесткина*

Генетика животных

- 190 **ОБЗОР**
Следы отбора и гены-кандидаты адаптации к экстремальным факторам среды в геномах турано-монгольских пород крупного рогатого скота. *Н.С. Юдин, А.А. Юрченко, Д.М. Ларкин*
- 202 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Мониторинг генетической структуры мезенской породы лошадей по микросателлитам ДНК. *Н.В. Вдовина, И.Б. Юрьева*

Физиологическая генетика

- 208 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Дифференциальная экспрессия 10 генов, ассоциированных с агрессивным поведением, в гипоталамусе двух поколений крыс, селекционируемых по реакции на человека. *Н.В. Климова, И.В. Чадаева, С.Г. Шихевич, Р.В. Кожемякина*
- 216 **ОБЗОР**
Роль кортикотропин-рилизинг гормона и его рецепторов в регуляции нейрофизиологических и поведенческих реакций на стресс. *Е.В. Сухарева*

Генетика микроорганизмов

- 224 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Галофильные бактерии соленых озер и солончаковых почв Прикаспийской низменности (Республика Дагестан) и их биотехнологический потенциал. *Э.А. Халилова, С.Ц. Котенко, Э.А. Исламмагомедова, А.А. Абакарова, Н.А. Черных, Д.А. Аливердиева*
- 234 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске. *А.В. Бардашева, Н.В. Фоменко, Т.В. Калымбетова, И.В. Бабкин, С.О. Кретьен, Е.В. Жираковская, Н.В. Тикунова, В.В. Морозова*

Genetic engineering

- 139 **ORIGINAL ARTICLE**
Mutations in the *A34R* gene increase the immunogenicity of vaccinia virus. *S.N. Shchelkunov, T.V. Bauer, S.N. Yakubitskiy, A.A. Sergeev, A.S. Kabanov, S.A. Pyankov*
- 147 **ORIGINAL ARTICLE**
An increased proportion of transgenic plants in the progeny of rapeseed (*Brassica napus* L.) transformants. *G.N. Raldugina, T.Z. Hoang, H.B. Ngoc, I.V. Karpichev*
- 157 **ORIGINAL ARTICLE**
A positive experience in applying the biolistic approach to potato varieties Aksor and Nevskiy. *N.P. Malakhova, Y.A. Skiba, G.A. Isakova, D.A. Naizabayeva, B.K. Tezekbaeva, G.A. Ismagulova, E.R. Maltseva*

Plant breeding for immunity and quality

- 164 **REVIEW**
Genetic aspects of potato resistance to phytophthorosis. *T.S. Frolova, V.A. Cherenko, O.I. Sinitsyna, A.V. Kochetov*
- 171 **REVIEW**
Problems and possibilities of studying malting quality in barley using molecular genetic approaches. *N.V. Trubacheeva, L.A. Pershina*
- 178 **REVIEW**
Anthocyanins as functional food components. *R.S. Yudina, E.I. Gordeeva, O.Yu. Shoeva, M.A. Tikhonova, E.K. Khlestkina*

Animal genetics

- 190 **REVIEW**
Signatures of selection and candidate genes for adaptation to extreme environmental factors in the genomes of Turano-Mongolian cattle breeds. *N.S. Yudin, A.A. Yurchenko, D.M. Larkin*
- 202 **ORIGINAL ARTICLE**
Monitoring for the genetic structure of Mezen breed of horses in terms of DNA microsatellites. *N.V. Vdovina, I.B. Yuryeva*

Physiological genetics

- 208 **ORIGINAL ARTICLE**
Differential expression of 10 genes in the hypothalamus of two generations of rats selected for a reaction to humans. *N.V. Klimova, I.V. Chadaeva, S.G. Shichevich, R.V. Kozhemyakina*
- 216 **REVIEW**
The role of the corticotropin-releasing hormone and its receptors in the regulation of stress response. *E.V. Sukhareva*

Microbial genetics

- 224 **ORIGINAL ARTICLE**
Halophilic bacteria of salt lakes and saline soils of the Peri-Caspian lowland (Republic of Dagestan) and their biotechnological potential. *E.A. Khalilova, S.T. Kotenko, E.A. Islammagomedova, A.A. Abakarova, N.A. Chernyh, D.A. Aliverdiyeva*
- 234 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic characterization of clinical *Klebsiella* isolates circulating in Novosibirsk. *A.V. Bardasheva, N.V. Fomenko, T.V. Kalymbetova, I.V. Babkin, S.O. Chretien, E.V. Zhirakovskaya, N.V. Tikunova, V.V. Morozova*

Мутации в гене *A34R*, приводящие к увеличению иммуногенности вируса осповакцины

С.Н. Щелкунов^{1, 2}✉, Т.В. Бауэр¹, С.Н. Якубицкий¹, А.А. Сергеев¹, А.С. Кабанов¹, С.А. Пьянков¹

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
✉ snshchel@vector.nsc.ru

Аннотация. Самым простым и надежным способом защиты от вирусных инфекций является вакцинопрофилактика. При этом наибольшей протективной эффективностью обладают живые вакцины, в основе которых используют слабовирулентные для человека вирусы, близкородственные патогенным, или аттенуированные (ослабленные за счет мутаций/делеций в вирусном геноме) варианты патогенного для человека вируса. Вакцинация против оспы с использованием живого вируса осповакцины (vaccinia virus, VACV), близкородственного вирусу натуральной оспы, сыграла важнейшую роль в успехе программы глобальной ликвидации оспы, которая осуществлялась под эгидой Всемирной организации здравоохранения. Прекращение после 1980 г. противооспенной вакцинации привело к тому, что огромная часть населения Земли в настоящее время не имеет иммунитета не только к оспе, но и любым другим зоонозным ортопоксвирусным инфекциям. Это создает возможность циркуляции зоонозных ортопоксвирусов в человеческой популяции и, как следствие, приводит к изменению экологии и круга чувствительных хозяев для разных видов ортопоксвирусов. При этом использование классической живой вакцины на основе VACV для защиты от этих инфекций в настоящее время не приемлемо, так как она может обуславливать тяжелые побочные реакции. В связи с этим все более актуальной становится разработка новых безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций человека и животных. Атенуация (ослабление вирулентности) VACV достигается в результате направленной инактивации определенных генов вируса и обычно приводит к уменьшению эффективности размножения VACV *in vivo*. Следствием этого может быть снижение иммунного ответа при введении аттенуированного вируса пациентам в стандартных дозах. Часто используемым для встройки/инактивации в геноме VACV является ген тимидинкиназы, нарушение которого приводит к аттенуации вируса. В данной работе изучено, как введение двух точечных мутаций в ген *A34R* аттенуированного штамма L1VP-GFP (TK-), увеличивающих выход внеклеточных оболочечных вирионов (EEV), влияет на свойства пато- и иммуногенности варианта VACV L1VP-GFP-A34R при интраназальном заражении лабораторных мышей. Показано, что увеличение продукции EEV рекомбинантным штаммом VACV L1VP-GFP-A34R не меняет аттенуированный фенотип, характерный для родительского штамма L1VP-GFP, но приводит к существенно большей продукции VACV-специфичных антител. Ключевые слова: вирус осповакцины; направленные мутации; аттенуация; иммуногенность.

Для цитирования: Щелкунов С.Н., Бауэр Т.В., Якубицкий С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Пьянков С.А. Мутации в гене *A34R*, приводящие к увеличению иммуногенности вируса осповакцины. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):139-146. DOI 10.18699/VJ21.017

Mutations in the *A34R* gene increase the immunogenicity of vaccinia virus

S.N. Shchelkunov^{1, 2}✉, T.V. Bauer¹, S.N. Yakubitskiy¹, A.A. Sergeev¹, A.S. Kabanov¹, S.A. Pyankov¹

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
✉ snshchel@vector.nsc.ru

Abstract. Vaccination is the most simple and reliable approach of protection to virus infections. The most effective agents are live vaccines, usually low-virulence organisms for humans and closely related pathogenic viruses or attenuated as a result of mutations/deletions in the genome of pathogenic virus. Smallpox vaccination with live vaccinia virus (VACV) closely related to smallpox virus played a key role in the success of the global smallpox eradication program carried out under the World Health Organization auspices. As a result of the WHO decision as of 1980 to stop smallpox vaccination, humankind has lost immunity not only to smallpox, but also to other zoonotic, orthopoxvirus-caused human infections. This new situation allows orthopoxviruses to circulate in the human population and, as a consequence, to alter several established concepts of the ecology and range of sensitive hosts for various orthopoxvirus species. Classic VACV-based live vaccine for vaccination against orthopoxvirus infections is out of the question, because it can cause severe side effects. Therefore, the development of new safe vaccines against orthopoxviral infections of humans and animals is an important problem. VACV attenuation by modern approaches carried out

by targeted inactivation of certain virus genes and usually leads to a decrease in the effectiveness of VACV *in vivo* propagation. As a result, it can cause a diminishing of the immune response after administration of attenuated virus to patients at standard doses. The gene for thymidine kinase is frequently used for insertion/inactivation of foreign genes and it causes virus attenuation. In this research, the effect of the introduction of two point mutations into the A34R gene of attenuated strain LVP-GFP (TK⁻), which increase the yield of extracellular enveloped virions (EEV), on the pathogenicity and immunogenicity of VACV LVP-GFP-A34R administered intranasally to laboratory mice were studied. It was shown that increase in EEV production by recombinant strain VACV LVP-GFP-A34R does not change the attenuated phenotype characteristic of the parental strain LVP-GFP, but causes a significantly larger production of VACV-specific antibodies.

Key words: vaccinia virus; target mutations; attenuation; immunogenicity.

For citation: Shchelkunov S.N., Bauer T.V., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Pyankov S.A. Mutations in the A34R gene increase the immunogenicity of vaccinia virus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):139-146. DOI 10.18699/VJ21.017 (in Russian)

Введение

Вакцинопрофилактика – самый надежный способ защиты от вирусных инфекций. При этом наиболее эффективными являются живые вакцины, в основе которых используют слабовирулентные для человека вирусы, близкородственные патогенным, или аттенуированные (ослабленные за счет мутаций/делетий в вирусном геноме) варианты патогенного для человека вируса (Щелкунов, 1998; Зверев, Юминова, 2012).

В течение долгих лет оспопрививания в XIX–XX вв. в разных частях света сформировалась практика использования разных штаммов вируса, который в прошлом веке отнесен к виду *Vaccinia virus* (VACV), входящему в состав рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. В отечественной литературе данный вирус принято называть вирусом осповакцины (Fenner et al., 1988; Shchelkunov, 2013; Sanchez-Sampedro et al., 2015). Точное происхождение этих штаммов в большинстве случаев неизвестно, они различаются между собой патогенностью при инфицировании различных видов лабораторных животных и реактогенностью при вакцинации людей (Shchelkunov et al., 2005; Kretzschmar et al., 2006; Jacobs et al., 2009; Sanchez-Sampedro et al., 2015). В процессе массовой вакцинации все штаммы VACV обуславливали в небольшом проценте случаев тяжелые побочные реакции, включая энцефалиты и энцефаломиелиты, иногда приводившие к гибели вакцинируемых. Поэтому в 1980 г. после подтверждения глобальной ликвидации оспы была принята резолюция Всемирной ассамблеи здравоохранения, настоятельно призывающая все страны прекратить вакцинацию населения против оспы¹.

С появлением возможности реконструирования генома VACV методами генетической инженерии в 80-х гг. прошлого века этот вирус стали использовать в качестве молекулярного вектора для создания поливалентных вакцин против различных инфекций, а затем и онколитических вариантов VACV (Kutinova et al., 1995; Shchelkunov et al., 2003, 2018; Jacobs et al., 2009; Thirunavukarasu et al., 2013; Sanchez-Sampedro et al., 2015; Goncharova et al., 2016; Li Y. et al., 2017; Guo et al., 2019). При этом важнейшим стал вопрос о биологической безопасности создаваемых рекомбинантных VACV.

Прекращение противооспенной вакцинации привело к тому, что огромная часть населения Земли в настоящее

время не имеет иммунитета не только к оспе, но и любым другим зоонозным ортопоксвирусным инфекциям. Это создает возможность циркуляции зоонозных ортопоксвирусов в человеческой популяции и, как следствие, приводит к изменению экологии и круга чувствительных хозяев для разных видов ортопоксвирусов (Shchelkunov, 2013). Поэтому вспышки заболеваний, обусловленных зоонозными ортопоксвирусами, такими как вирус оспы обезьян, вирус оспы коров и VACV, все чаще в последние годы регистрируют у людей на разных континентах (Albarnaz et al., 2018; Reynolds et al., 2019; Styczynski et al., 2019). При этом использование классической живой вакцины на основе VACV для защиты от этих инфекций в настоящее время не приемлемо, так как она может обуславливать тяжелые побочные реакции, особенно у людей с ослабленной иммунной системой или иммунодефицитами (в том числе у ВИЧ-инфицированных). В связи с этим все более актуальной является разработка современных безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций человека и животных (Shchelkunov, 2011).

Аттенуация VACV часто достигается в результате направленной инактивации определенных генов вируса и обычно приводит к снижению эффективности размножения VACV *in vivo*. Следствием этого может быть снижение иммунного ответа при введении аттенуированного вируса пациентам в стандартных дозах (Moss, 2011; Sanchez-Sampedro et al., 2015; Albarnaz et al., 2018). Поэтому важно осуществлять поиск вирусных генов, модификация которых может привести к повышению иммуногенности аттенуированного VACV без увеличения его вирулентности (Shchelkunov, Shchelkunova, 2020).

VACV формирует две инфекционные формы вирионов. Подавляющее большинство вирусного потомства составляют внутриклеточные зрелые вирионы (intracellular mature virion, IMV), которые накапливаются в зараженной клетке в значительном количестве и попадают в окружающую среду только после разрушения клетки. Небольшой процент синтезируемых вирусных частиц покрывается дополнительной липопротеиновой оболочкой и на раннем этапе цикла развития вируса выходит на поверхность клеток и находится в ассоциированном с клеткой состоянии (cell-associated virion, CEV). Часть CEV отделяется от поверхности клетки и переходит в свободное состояние, называемое внеклеточными оболочечными вирионами (extracellular enveloped virion, EEV) (Smith et al., 2002). Данная форма для большинства штам-

¹ World Health Assembly, 33. Global Smallpox Eradication. World Health Organization. 1980. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/155529>

мов VACV составляет менее 1 % всего потомства вируса (Payne, 1980). При этом EEV VACV эффективнее IMV проникают в клетки (Locker et al., 2000) и обеспечивают быстрое распространение вируса по организму (Payne, 1980; Blasco et al., 1993; Smith et al., 2002).

Снижение эффективности размножения *in vivo* аттенуированного варианта VACV должно приводить к пропорциональному уменьшению продукции EEV и, как следствие, снижению ранней диссеминации вируса по организму. Мы предположили, что увеличение выхода EEV-аттенуированного VACV может обуславливать более выраженный противовирусный иммунный ответ.

Одним из перспективных в этом направлении объектов исследования является ген *A34R* VACV (Blasco et al., 1993). Он кодирует белок A34, входящий в состав липопротеиновой оболочки внеклеточных вирионов (EEV) и контролирует эффективность их отделения от поверхности зараженной клетки и выхода в свободном виде в межклеточное пространство (Blasco et al., 1993; McNulty et al., 2011; Monticelli et al., 2019). У большинства изученных штаммов VACV при размножении их в культурах клеток млекопитающих на раннем этапе инфекции в виде EEV формируется менее 1 % вирусного потомства. Остальные вирионы находятся внутри клетки в виде IMV и CEV, которые выходят в окружающую среду только после лизиса зараженной клетки (Payne, 1980; Smith et al., 2002). В результате множественных пассажей штамма NYCBH VACV при внутримозговом заражении мышей получен нейротропный штамм IND-J VACV (Lee et al., 1992), который способен продуцировать EEV в количестве до 30 % всего вирусного потомства и формировать кометобразные бляшки на монослое чувствительных клеток (Payne, 1980; Blasco et al., 1993). Оказалось, что различия в аминокислотной последовательности белка A34 другого нейротропного штамма, WR VACV (образование менее 1 % EEV от инфекционного потомства вируса на культуре клеток), от аналогичного белка штамма IND-J VACV составляют лишь две точечные позиции: Asp110 → Asn и Lys151 → Glu (Blasco et al., 1993). Показано, что замена гена *A34R* в штамме WR VACV на вариант этого гена из штамма IND-J существенно увеличивает выход EEV-формы и это приводит к более эффективной диссеминации онколитических вариантов VACV, а также улучшенной противораковой активности таких вирусов *in vivo* (Kirn et al., 2008; Thirunavukarasu et al., 2013).

Целью данной работы явилось изучение влияния введения двух точечных мутаций в ген *A34R*, увеличивающих выход EEV, на свойства пато- и иммуногенности аттенуированного варианта VACV LIPV-GFP при интраназальном заражении лабораторных мышей.

Материалы и методы

Вирусы, культура клеток. В работе использовали клон 14 штамма VACV LIPV (LIPV), полученный нами ранее трехкратным пересевом через бляшку из-под агарозного покрытия методом предельного разведения (Yakubitskiy et al., 2015), а также штамм LIPV-GFP, полученный на его основе встройкой гена зеленого флуоресцентного белка в состав вирусного гена тимидинкиназы (Petrov et al., 2013). Вирусы выращивали и титровали на культу-

ре клеток почки африканской зеленой мартышки линии CV-1 из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, как описано С.Н. Щелкуновым и коллегами (2020).

Получение вируса LIPV-GFP с точечными мутациями в гене *A34R*. Рекомбинантный штамм LIPV-GFP-A34R получали методом временной доминантной селекции на основе VACV LIPV-GFP с использованием плазмиды pMGCgpt-A34R*, содержащей мутантный вариант гена *A34R* (Asp110 → Asn, Lys151 → Glu), как описано Т.В. Бауэр и сотрудниками (2020).

Оценка уровня продукции внеклеточной формы вирусов. Анализ уровня продукции EEV штаммов LIPV-GFP и LIPV-GFP-A34R проводили на 90 % монослое клеток линии CV-1, полученном на 6-луночных планшетах. Монослой клеток CV-1 заражали исследуемым вирусом со множественностью 10 БОЕ/клетка в трех повторях. Через 6 и 24 ч после заражения отбирали аликвоты надклеточной жидкости, а оставшиеся клетки подвергали трем циклам замораживания–оттаивания. Титр вируса в надклеточной жидкости и суспензии лизированных клеток определяли методом бляшек на культуре CV-1.

Животные. В исследованиях использовали инбредных разнополых мышей линии BALB/c, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями гуманного содержания и использования животных в экспериментальных исследованиях. Исследования и манипуляции на животных проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (разрешение № 06-09.2019 от 03.09.2019).

Оценка патогенности вирусов для мышей. Использовали 3–5-недельных мышей линии BALB/c массой 13–16 г. Препараты вирусов LIPV, LIPV-GFP, LIPV-GFP-A34R или физиологический раствор вводили животным интраназально (и/н), как описано С.Н. Щелкуновым и коллегами (2020). Применяли дозы заражения 10^8 или 10^7 БОЕ/30 мкл/животное. В каждой группе экспериментальных животных было по 6 особей. Мышей ежедневно взвешивали и фиксировали внешние клинические признаки заболевания (взъерошенность шерсти, адиамия, тремор) в течение 14 сут.

Выявление вирусов в слизи носа и легких. Забор носовой перегородки и легких у мышей осуществляли через 3, 7, 10 сут после введения препаратов вирусов или физиологического раствора, предварительно выполнив процедуру эвтаназии методом цервикальной дислокации. В каждой временной точке образцы брали от трех животных и анализировали их индивидуально. Готовили 10% гомогенаты методом механической дезинтеграции с последующим добавлением питательной среды ДМЕМ. После нескольких актов замораживания–оттаивания в полученных гомогенатах определяли титры вирусов методом бляшек на монослое культуры клеток CV-1.

Оценка нейровирулентности вирусов. Группам по 10 особей 2–3-дневных мышей-сосунков линии BALB/c интрацеребрально (и/ц) вводили рекомбинантные штаммы LIPV-GFP, LIPV-GFP-A34R или исходный LIPV в дозе

10 БОЕ/10 мкл/мышь. Животным контрольной группы и/ц вводили по 10 мкл физиологического раствора. За мышами наблюдали в течение 14 сут, учитывая количество погибших.

Получение сывороток крови экспериментальных животных. Через 28 сут после и/н введения препаратов VACV или физиологического раствора у мышей проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса с помощью одноразовых стерильных капилляров. Из крови мышей была получена сыворотка путем осаждения форменных элементов крови центрифугированием. Индивидуальные образцы сывороток крови мышей хранили при температуре -20°C .

Иммуноферментный анализ сывороток крови. Иммуноферментный анализ (ИФА) индивидуальных сывороток крови мышей выполняли согласно С.Н. Щелкунову и коллегам (2020). В качестве антигена использовали очищенный препарат VACV L1VP. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG по экспериментальным группам и рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95 % вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

Результаты

Сравнение уровней продукции ЕЕВ вирусами L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R

Оценку продукции ЕЕВ-формы вирионов штамма L1VP-GFP и полученного на его основе мутантного варианта L1VP-GFP-A34R, кодирующего белок A34 с аминокислотными заменами Asp110 $\rightarrow$ Asn и Lys151 $\rightarrow$ Glu, осуществляли при заражении монослоя клеток линии CV-1 со множественностью 10 БОЕ/клетка.

Результаты этих экспериментов демонстрируют, что уровни продукции IMV обоих вирусов на культуре клеток не имеют достоверных различий (рис. 1, а). В то же время вирус L1VP-GFP-A34R продуцирует ЕЕВ в значительно больших количествах по сравнению с исходным для него вариантом L1VP-GFP, особенно на раннем этапе инфекции (см. рис. 1, б). Через 6 ч после заражения VACV, мутантный по гену A34R, производит в семь раз больше внеклеточных вирионов по сравнению с родительским штаммом L1VP-GFP.

Патогенность штаммов VACV при интраназальном введении мышам

Для оценки патогенности VACV L1VP, L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R мышам линии BALB/c препараты вирусов вводили и/н в дозах 10^8 или 10^7 БОЕ/30 мкл/животное. Группе мышей отрицательного контроля и/н наносили по 30 мкл физиологического раствора. В каждой группе экспериментальных животных было по 6 особей. Мышей ежедневно взвешивали и фиксировали внешние клинические признаки заболевания в течение 14 сут. Начиная с третьих суток после инфицирования штаммом L1VP у мышей наблюдали клинические проявления заболевания: взъерошенность шерсти, адинамию, тремор. Для штаммов L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R не удалось выявить выраженных признаков заболевания за все время наблюдения.

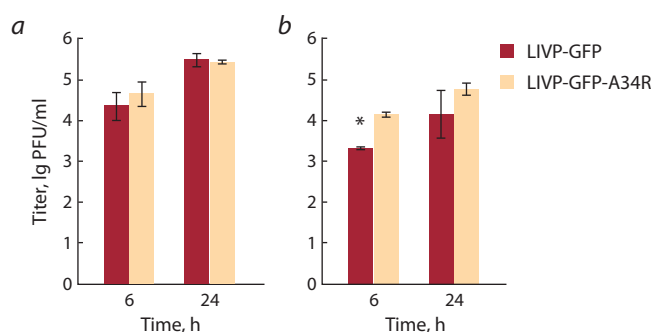


Fig. 1. Dynamic of L1VP-GFP and L1VP-GFP-A34R virus titers after cell culture CV-1 infection.

a – overall titer; b – titer of the extracellular virion form. * Differences are significant at $p < 0.05$.

Поскольку большинство штаммов VACV при инфицировании взрослых мышей даже в высоких дозах не приводят к их гибели, общепринятым методом оценки патогенности вариантов этого вируса является регистрация изменения массы тела животных после заражения (Belyakov et al., 2003; Dai et al., 2008; Sumner et al., 2016; Phelps et al., 2017). Выполненные нами эксперименты показали, что наряду с внешними признаками заболевания при и/н заражении мышей штаммом L1VP наблюдается дозозависимое снижение массы тела животных, а рекомбинантные варианты L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R не обуславливают изменений массы тела мышей, отличных от контрольных животных (рис. 2). Пик заболевания мышей приходился на 6–8-е сут после заражения VACV L1VP.

Оценка наличия вирусов в слизистой носовой перегородки и легких

Для сравнения эффективности размножения в слизистой носовой перегородки и легких после и/н заражения мышей вирусами L1VP, L1VP-GFP или L1VP-GFP-A34R на 3, 7 и 10-е сут эксперимента у трех животных для каждой дозы инфицирования (10^8 или 10^7 БОЕ) извлекали соответствующие ткани и готовили 10% гомогенаты, в которых определяли концентрацию VACV методом бляшек.

Результаты этих анализов указывают на то, что штамм VACV L1VP с гораздо большей эффективностью размножается *in vivo* по сравнению с аттенуированными вариантами VACV L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R (рис. 3). На 10-е сут после инфицирования в слизистой носовой перегородки и легких мышей выявлялся только родительский штамм L1VP.

Нейровирулентность вариантов VACV

Для изучения способности вирусов L1VP, L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R вызывать гибель новорожденных мышей при и/ц заражении (доза 10 БОЕ/10 мкл/мышь) использовали группы по 10 особей, за которыми вели наблюдение в течение 14 сут после инфицирования. К концу эксперимента 90 % мышей, зараженных VACV L1VP, погибли. Для штамма L1VP-GFP гибель мышей составила 20 %, для L1VP-GFP-A34R – 10 % (рис. 4). В контрольной группе (инъекция физиологического раствора) смертности животных не наблюдали.

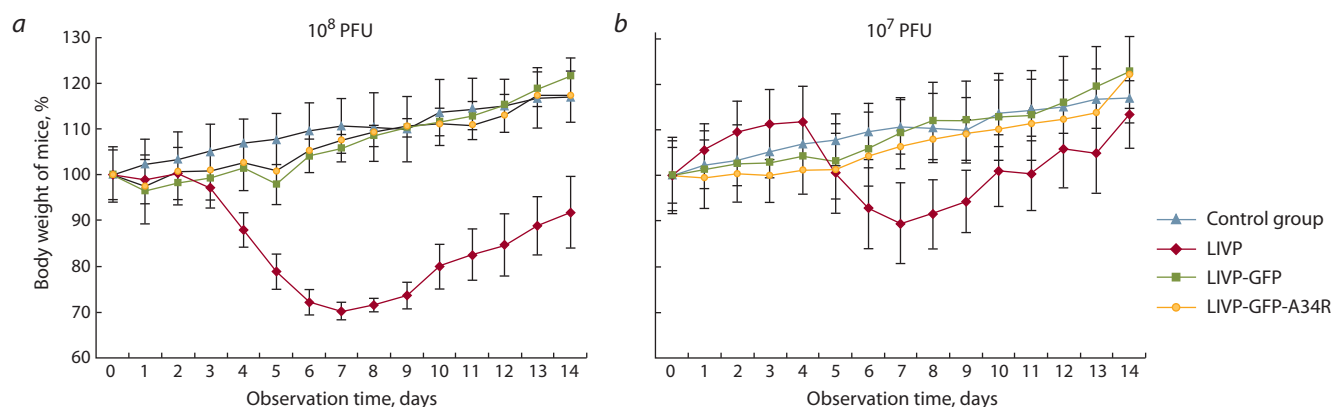


Fig. 2. Mouse body weight change after intranasal administration of LVP, LVP-GFP or LVP-GFP-A34R VACV strains at the doses (a) 10^8 PFU/mouse, (b) 10^7 PFU/mouse. The control group received normal saline.

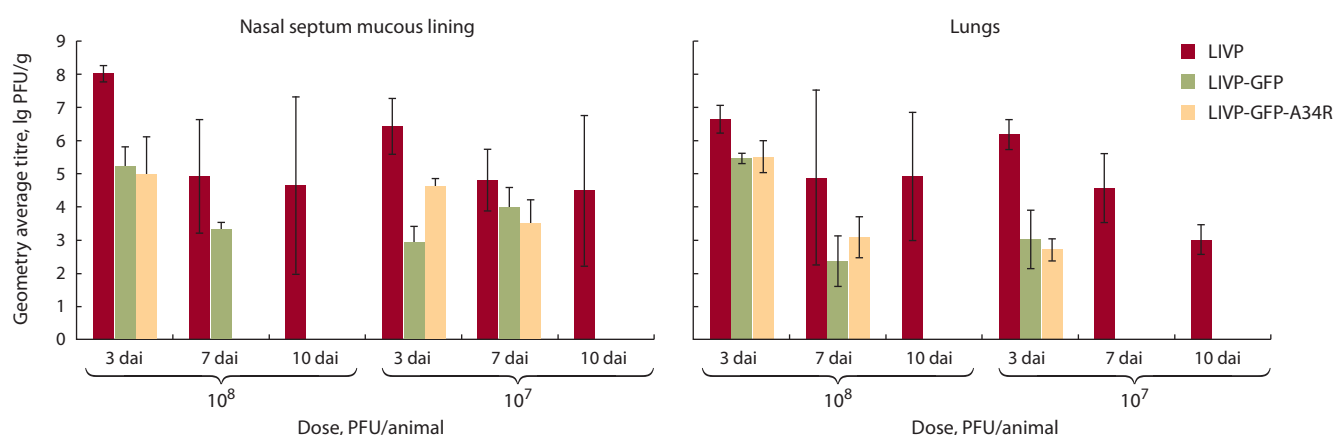


Fig. 3. VACV accumulation in the mucous lining of the nasal septum and lungs of mice intranasally inoculated with LVP, LVP-GFP, or LVP-GFP-A34R strains.

dai – day after inoculation.

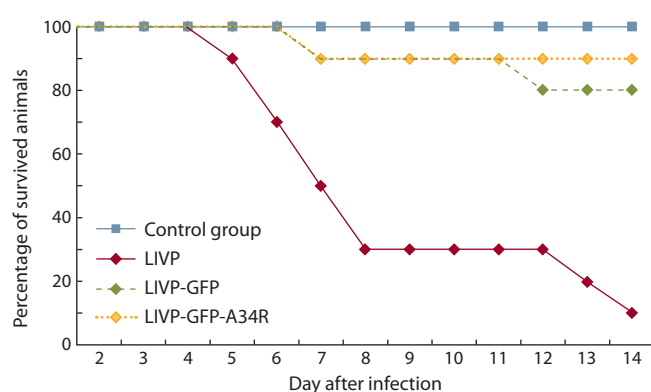


Fig. 4. Dynamics of suckling mouse death after intracerebral injection of LVP, LVP-GFP, or LVP-GFP-A34R VACV strains.

Иммуногенность штаммов VACV

Иммуногенность вариантов VACV LVP, LVP-GFP и LVP-GFP-A34R оценивали в тесте ИФА по уровню индуцируемых ими вирусспецифических антител в сыворотках крови мышей, полученных через 28 сут после и/н инфицирования разными дозами вирусов (10^7 или 10^8 БОЕ/мышь).

Аттенуированный рекомбинантный штамм LVP-GFP индуцировал достоверно меньший уровень VACV-специфических антител по сравнению с исходным штаммом LVP (рис. 5). Введение же целевых мутаций в гене *A34R* привело к значительному увеличению антительного ответа на инфекцию мышей вариантом VACV LVP-GFP-A34R.

Обсуждение

Ранее мы показали, что в результате встройки гена *Gfp* в состав вирусного гена тимидинкиназы штамма LVP (ТК⁻-фенотип) происходит значительная аттенуация созданного варианта VACV LVP-GFP и, как следствие, снижение его иммуногенности. При этом наибольшую чувствительность к VACV лабораторные мыши проявляли при и/н инокуляции (Щелкунов и др., 2020). Поэтому сравнительную оценку свойств пато- и иммуногенности изучаемых штаммов VACV в данной работе осуществляли при и/н способе введения, который наиболее близок к естественному пути передачи вируса.

Продemonстрировано, что *A34R* VACV является одним из важных генов, контролирующих выход ЕЕВ из зараженных клеток (Blasco et al., 1993; Smith et al., 2002; Breiman et al., 2013). Лабораторные штаммы WR и IHD-J

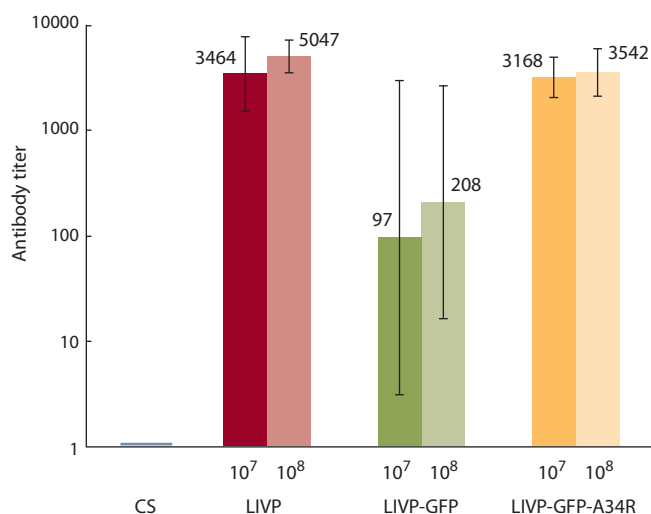


Fig. 5. Mice blood serum ELISA IgG titers to whole virion antigens after intranasal infection with L1VP, L1VP-GFP, or L1VP-GFP-A34R viruses.

Figures above bars indicate the geometric means of the reciprocal VACV-specific IgG titers in groups of six animals. The inoculated doses were 10⁷ or 10⁸ PFU/mouse. CS, control serum.

VACV, значительно различающиеся по уровню продукции EEV, по аминокислотной последовательности этого белка имеют отличия лишь в двух позициях – 110 и 151. С-концевой лектиноподобный домен вирусного гликопротеина A34, находящийся на поверхности внеклеточных вирионов, обеспечивает высокоспецифичное взаимодействие вирионов с углеводами на поверхности клеток. Замена Lys151 → Glu в составе этого домена белка A34 снижает эффективность связывания CEV VACV с поверхностью клетки и увеличивает выход EEV в окружающую среду (Blasco et al., 1993; Earley et al., 2008; McNulty et al., 2011).

Район гликопротеина A34 VACV с 80-го по 130-й аминокислотный остаток является областью взаимодействия вирусных белков A34 и B5, и данный комплекс поверхностных белков EEV играет важную роль в связывании этой формы вирионов с поверхностью клеток (Monticelli et al., 2019). Мутация Asp110 → Asn в гликопротеине A34 влияет на его связывание с белком B5 и, возможно, приводит к дополнительному увеличению выхода EEV.

Рассмотренные мутации в гене *A34R*, приводящие к увеличению продукции EEV-формы VACV, не снижают инфекционность вируса (McIntosh, Smith, 1996). Более того, известно, что EEV инфицируют клетки с большей эффективностью по сравнению с IMV и различаются по механизму адсорбции на поверхности плазматической мембраны и проникновения внутрь клетки (Locker et al., 2000).

В данной работе в качестве объекта исследования мы использовали аттенуированный рекомбинантный вирус L1VP-GFP, который показал онколитическую эффективность на разных животных моделях (Petrov et al., 2013; Goncharova et al., 2016; Shchelkunov et al., 2018). В состав гена *A34R* этого вируса ввели точечные мутации, приводящие к заменам Asp110 → Asn и Lys151 → Glu в

кодируемом им белке. При заражении клеток линии CV-1 обнаружили, что на ранних этапах инфекции мутантный вариант вируса L1VP-GFP-A34R значительно превосходит родительский штамм L1VP-GFP по продукции EEV (см. рис. 1). При этом аттенуированный фенотип вируса L1VP-GFP-A34R не отличался от L1VP-GFP (см. рис. 2).

В ранее выполненных работах показано, что при и/н заражении мышей линии BALB/c пик накопления VACV в легких приходится на 4–5-е сут (Payne, 1980; Lee et al., 1992). Для сравнения эффективности размножения вирусов L1VP, L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R *in vivo* определяли содержание вирусов в слизистой носовой перегородки (первичный очаг инфекции) и легких мышей на 3, 7 и 10-е сут эксперимента. Результаты этих исследований показали (см. рис. 3), что штамм VACV L1VP с гораздо большей эффективностью размножается *in vivo* по сравнению с аттенуированными вариантами VACV L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R. При этом введенные мутации в ген *A34R* не увеличивают накопление L1VP-GFP-A34R в легких мышей по сравнению с L1VP-GFP.

Поскольку наиболее тяжелыми побочными реакциями при вакцинации с использованием живого VACV являются энцефалит и энцефаломиелит, необходимо изучать нейровирулентность получаемых штаммов VACV. Общепринятым методом оценки нейротоксичности VACV является внутримозговое заражение мышей-сосунков (Li Z. et al., 2004). Исследования продемонстрировали (см. рис. 4), что L1VP-GFP и L1VP-GFP-A34R практически не различаются между собой по данному показателю и проявляют значительно сниженную нейровирулентность по сравнению с родительским штаммом L1VP.

Для того чтобы выяснить, как введение мутаций, увеличивающих продукцию EEV, влияет на иммуногенность VACV, аттенуированного в результате инактивации вирусного гена тимидинкиназы, сыворотки крови мышей, полученные через 28 сут после и/н инфицирования L1VP, L1VP-GFP или L1VP-GFP-A34R разными дозами (10⁷ или 10⁸ БОЕ/мышь), оценивали в тесте ИФА по уровню VACV-специфичных антител. Полученные данные (см. рис. 5) показывают, что аттенуированный рекомбинантный штамм L1VP-GFP индуцировал достоверно меньший уровень VACV-специфичных антител по сравнению с исходным штаммом L1VP, а введение целевых мутаций в гене *A34R* привело к значительному увеличению продукции VACV-специфичных IgG в ответ на инфекцию мышей L1VP-GFP-A34R.

Заключение

Таким образом, увеличение продукции EEV в результате введения двух точечных мутаций в ген *A34R* рекомбинантного штамма VACV L1VP-GFP не меняет его аттенуированный фенотип, но приводит к существенно большей продукции VACV-специфичных антител.

Следует отметить, что встрайку целевых генов в состав гена тимидинкиназы VACV часто используют при создании рекомбинантных вирусов (Mackett, 1987; Sanchez-Sampedro et al., 2015). Следовательно, полученные в данной работе результаты важно учитывать при конструировании безопасных и эффективных поливалентных живых вакцин на основе VACV.

Список литературы / References

- Бауэр Т.В., Трегубчик Т.В., Щелкунов С.Н., Максюттов Р.А., Гаврилова Е.В. Получение вируса осповакцины с повышенной продукцией внеклеточных оболочечных вирионов и направляющим синтезом GM-CSF как перспективной основы для создания противоопухолевых препаратов. *Медицинская иммунология*. 2020;22(2):371-378. DOI 10.15789/1563-0625-OVV-1594. [Bauer T.V., Tregubchik T.V., Shchelkunov S.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Obtaining vaccinia virus with increased production of extracellular enveloped virions and directing GM-CSF synthesis as a promising basis for development of antitumor drug. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2020;22(2):371-378. DOI 10.15789/1563-0625-OVV-1594. (in Russian)]
- Зверев В.В., Юминова Н.В. Вакцинопрофилактика вирусных инфекций от Э. Дженнера до настоящего времени. *Вопросы вирусологии*. 2012;S1:33-42. [Zverev V.V., Yuminova N.V. Vaccines. Prevention of viral infections from E. Jenner to date. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*. 2012;S1:33-42. (in Russian)]
- Щелкунов С.Н. Противовирусные вакцины: от Дженнера до наших дней. *Соросовский образовательный журнал*. 1998;7:43-50. [Shchelkunov S.N. Antivirus vaccines: from Jenner to date. *Sorosovskiy Obrazovatelnyy Zhurnal = Soros Education Journal*. 1998;7:43-50. (in Russian)]
- Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Якубицкий С.Н., Бауэр Т.В., Пьянков С.А. Патогенность и иммуногенность вариантов вируса осповакцины при разных способах их введения мышам. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10. DOI 10.15789/2220-7619-PAI-1375. [Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V., Pyankov S.A. Route-coupled pathogenicity and immunogenicity of vaccinia virus variant inoculated mice. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10. DOI 10.15789/2220-7619-PAI-1375. (in Russian)]
- Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. Modulating vaccinia virus immunomodulators to improve immunological memory. *Viruses*. 2018;10:e101. DOI 10.3390/v10030101.
- Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., Berzofsky J.A. Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(16):9458-9463. DOI 10.1073/10.1073/pnas.1233578100.
- Blasco R., Sisler J.R., Moss B. Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: Effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene. *J. Virol.* 1993;67(6):3319-3325.
- Breiman A., Carpentier D.C.J., Ewles H.A., Smith G.L. Transport and stability of the vaccinia virus A34 protein is affected by the A33 protein. *J. Gen. Virol.* 2013;94:720-725. DOI 10.1099/vir.0.049486-0.
- Dai K., Liu Y., Liu M., Xu J., Huang W., Huang X., Liu L., Wan Y., Hao Y., Shao Y. Pathogenicity and immunogenicity of recombinant Tiantan vaccinia virus with deleted C12L and A53R genes. *Vaccine*. 2008;26(39):5062-5071. DOI 10.1016/j.vaccine.2008.06.011.
- Earley A.E., Chan W.M., Ward B.M. The vaccinia virus B5 protein requires A34 for efficient intracellular trafficking from the endoplasmic reticulum to the site of wrapping and incorporation into progeny virions. *J. Virol.* 2008;82(5):2161-2169. DOI 10.1128/JVI.01971-07.
- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988.
- Goncharova E.P., Ruzhenkova J.S., Petrov I.S., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A. Oncolytic virus efficiency inhibited growth of tumour cells with multiple drug resistant phenotype *in vivo* and *in vitro*. *J. Transl. Med.* 2016;14(1):e241. DOI 10.1186/s12967-016-1002-x.
- Guo Z.S., Lu B., Guo Z., Giehl E., Feist M., Dai E., Liu W., Storck W.J., He Y., Liu Z., Bartlett D.L. Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. *J. Immunother. Cancer*. 2019;7(1):6. DOI 10.1186/s40425-018-0495-7.
- Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holecchek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. Vaccinia virus vaccines: Past, present and future. *Antiviral Res.* 2009;84:1-13. DOI 10.1016/j.antiviral.2009.06.006.
- Kirn D.H., Wang Y., Liang W., Contag C.H., Thorne S.H. Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion. *Cancer Res.* 2008;68(7):2071-2075. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-07-6515.
- Kretzschmar M., Wallinga J., Teunis P., Xing S., Mikolajczyk R. Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS Med.* 2006;3:e272. DOI 10.1371/journal.pmed.0030272.
- Kutinova L., Ludvikova V., Simonova V., Otavova M., Krystoforova J., Hainz P., Press M., Kunke D., Vonka V. Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine*. 1995;13(5):487-493.
- Lee M.S., Roos J.M., McGuigan L.C., Smith K.A., Cormier N., Cohen L.K., Roberts B.E., Payne L.G. Molecular attenuation of vaccinia virus: Mutant generation and animal characterization. *J. Virol.* 1992;66(5):2617-2630.
- Li Y., Zhu Y., Chen S., Li W., Yin X., Li S., Xiao P., Han J., Li X., Sun L., Jin N. Generation of an attenuated Tiantan vaccinia virus strain by deletion of multiple genes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017;7:462. DOI 10.3389/fcimb.2017.00462.
- Li Z., Rubin S.A., Taffs R.E., Merchinsky M., Ye Z., Carbone K.M. Mouse neurotoxicity test for vaccinia-based smallpox vaccines. *Vaccine*. 2004;22:1486-1493. DOI 10.1016/j.vaccine.2003.10.022.
- Locker J.K., Kuehn A., Schleich S., Rutter G., Hohenberg H., Wepf R., Griffiths G. Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for IMV but not the EEV. *Mol. Biol. Cell*. 2000;11:2497-2511. DOI 10.1091/mbc.11.7.2497.
- Mackett M. Recombinant live virus vaccines. *Immunol. Lett.* 1987;16(3-4):243-248. DOI 10.1016/0165-2478(87)90153-2.
- McIntosh A.A.G., Smith G.L. Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus. *J. Virol.* 1996;70(1):272-281.
- McNulty S., Powell K., Erneux C., Kalman D. The host phosphoinositide 5-phosphatase SHIP2 regulates dissemination of vaccinia virus. *J. Virol.* 2011;85(14):7402-7410. DOI 10.1128/JVI.02391-10.
- Monticelli S.R., Earley A.K., Tate J., Ward B.M. The ectodomain of the vaccinia virus glycoprotein A34 is required for cell binding by extracellular virions and contains a large region capable of interaction with glycoprotein B5. *J. Virol.* 2019;93(4):e01343-18. DOI 10.1128/JVI.01343-18.
- Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev.* 2011;239(1):8-26. DOI 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x.
- Payne L.G. Significance of extracellular enveloped virus in the *in vitro* and *in vivo* dissemination of vaccinia. *J. Gen. Virol.* 1980;50:89-100.
- Petrov I.S., Goncharova E.P., Pozdnyakov S.G., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A., Vlasov V.V., Kolosova I.V. Antitumor effect of the LVP-GFP recombinant vaccinia virus. *Dokl. Biol. Sci.* 2013;451(1):248-252. DOI 10.1134/S0012496613040133.
- Phelps A., Gates A.J., Eastaugh L., Hillier M., Ulaeto D.O. Comparative efficacy of intramuscular and scarification routes of administration of live smallpox vaccine in a murine challenge model. *Vaccine*. 2017;35:3889-3896. DOI 10.1016/j.vaccine.2017.05.058.
- Reynolds M.G., Doty J.B., McCollum A.M., Olson V.A., Nakazawa Y. Monkeypox re-emergence in Africa: a call to expand the concept and practice of One Health. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2019;17(2):129-139. DOI 10.1080/14787210.2019.1567330.

- Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses*. 2015;7:1726-1803. DOI 10.3390/v7041726.
- Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013;9(12):e1003756. DOI 10.1371/journal.ppat.1003756.
- Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine*. 2011;29S:D49-D53. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.05.037.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York: Springer, 2005.
- Shchelkunov S.N., Nesterov A.E., Ryazankin I.A., Ignat'ev G.M., Sandakhchiev L.S. Development of a candidate polyvalent live vaccine against human immunodeficiency, hepatitis B, and orthopoxviruses. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2003;390:180-183.
- Shchelkunov S.N., Razumov I.A., Kolosova I.V., Romashchenko A.V., Zavjalov E.L. Virotherapy of the malignant U87 human glioblastoma in the orthotopic xenotransplantation mouse SCID model. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018;478:30-33. DOI 10.1134/S1607672918010088.
- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. Genes that control vaccinia virus immunogenicity. *Acta Naturae*. 2020;12(1):33-41. DOI 10.32607/actanaturae.10935.
- Smith G.L., Vanderplasschen A., Law M. The formation of extracellular enveloped vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 2002;83:2915-2931. DOI 10.1099/vir.0.18733-0.
- Styczynski A., Burgado J., Walteros D., Usme-Ciro J., Laiton K., Farias A.P., Nakazawa Y., Chapman C., Davidson W., Mauldin M., Morgan C., Martinez-Ceron J., Patina E., Lopez Sepulveda L.L., Torres C.P., Cruz Suarez A.E., Olaya G.P., Riveros C.E., Cepeda D.Y., Lopez L.A., Espinosa D.G., Gutierrez Lozada F.A., Li Y., Satheshkumar P.S., Reynolds M., Gracia-Romero M., Petersen B. Seroprevalence and risk factors possibly associated with emerging zoonotic vaccinia virus in a farming community, Colombia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019;25(12):2169-2176. DOI 10.3201/eid2512.181114.
- Sumner R.P., Ren H., Ferguson B.J., Smith G.L. Increased attenuation but decreased immunogenicity by deletion of multiple vaccinia virus immunomodulators. *Vaccine*. 2016;34:4827-4834. DOI 10.1016/j.vaccine.2016.08.002.
- Thirunavukarasu P., Sathaiah M., Gorry M.C., O'Malley M.E., Ravindranathan R., Austin F., Thorne S.H., Guo Z.S., Bartlett D.I. A rationally designed A34R mutant oncolytic poxvirus: Improved efficacy in peritoneal carcinomatosis. *Mol. Ther.* 2013;21(5):1024-1033. DOI 10.1038/mt.2013.27.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of vaccinia virus. *Acta Naturae*. 2015;7(4):113-121.

ORCID ID

S.N. Shchelkunov orcid.org/0000-0002-6255-9745
T.V. Bauer orcid.org/0000-0002-4954-9905
S.N. Yakubitskiy orcid.org/0000-0002-0496-390X

Acknowledgements. This work was supported by the Russian Science Foundation, project 19-14-00006.

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

Received August 4, 2020. Revised October 6, 2020. Accepted October 6, 2020.

Original Russian text www.bionet.nsc.ru/vogis/

An increased proportion of transgenic plants in the progeny of rapeseed (*Brassica napus* L.) transformants

G.N. Raldugina¹✉, T.Z. Hoang^{1, 2}, H.B. Ngoc¹, I.V. Karpichev¹

¹ Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² NKLPGB, Agricultural Genetics Institute, Hanoi, Vietnam

✉ raldugina42@mail.ru

Abstract. Cotyledon and leaf explants of two spring rapeseed varieties were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* harboring a genetic construct with the *gfp* marker gene. In order to reduce the proportion of hyperhydrated shoots, which appeared during regenerant formation, we optimized sucrose content in the regeneration media. Analysis of the progeny obtained from T0 regenerants showed that in a number of lines the distribution of the *gfp* marker did not follow Mendelian segregation of a monogenic trait in self-pollinated plants, while in the progeny of the other lines of transgenic plants, the *gfp* marker was completely absent, although its presence had been confirmed in all selected T0 plants. We also found that in individual transformants *gfp* is randomly inherited throughout the central peduncle; its presence in the genome of seedlings does not depend on the location of the pod. Thus, both transformed and non-transformed cells were involved in the formation of gametes in T0 plants. In addition, marker segregation was different in plants of the T1 line obtained by nodal cuttings of a primary transformant, depending on the location of the cuttings on the stem of the original plant, indicating that the nature of T1 generation plants was also chimeric. Furthermore, we showed that propagation of plants by cutting followed by propagation by seeds formed as a result of self-pollination led to an increase in the proportion of transgenic plants in subsequent generations. The results obtained during the course of this study show that the transformants were chimeric, i.e. their tissues contained both transgenic and non-transgenic cells, and this chimeric nature was passed on to subsequent generations. We found that, in addition to nutrient media composition, other factors such as plant genotype and explant type also contribute to the rising of chimeric plants during transformation. Based on these results, we developed a simplified method, which consists of several rounds of a combination of cutting, seed production by self-pollination, and subsequent culling of wild-type plants, which significantly enriched descendent populations of the original rapeseed transformants with plants transgenic for the *gfp* marker.

Key words: transgene inheritance; transformation; chimera; vitrification; rapeseeds.

For citation: Raldugina G.N., Hoang T.Z., Ngoc H.B., Karpichev I.V. An increased proportion of transgenic plants in the progeny of rapeseed (*Brassica napus* L.) transformants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):147-156. DOI 10.18699/VJ21.018

Увеличение доли трансгенных растений в потомстве трансформантов рапса *Brassica napus* L.

Г.Н. Ралдугина¹✉, Т.Ж. Хоанг^{1, 2}, Х.Б. Нгок¹, И.В. Карпичев¹

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт сельскохозяйственной генетики, Ханой, Вьетнам

✉ raldugina42@mail.ru

Аннотация. Семядольные и листовые экспланты двух сортов ярового рапса (канолы) были трансформированы с использованием *Agrobacterium tumefaciens*, несущими генетическую конструкцию с геном-маркером *gfp*. Для уменьшения доли витрифицированных побегов-регенерантов мы оптимизировали содержание сахарозы в среде регенерации. Анализ потомства, полученного от растений поколения T0, показал, что в ряде линий распределение маркера *gfp* не подчинялось сегрегации моногенного признака по Менделю для самоопыляемых растений, в то время как в потомстве других линий маркер *gfp* полностью отсутствовал, хотя его присутствие было подтверждено у всех отобранных растений T0. Обнаружено, что у индивидуальных трансформантов *gfp* наследуется случайным образом по всему центральному цветоносу, его наличие в геноме проростков не зависело от местоположения стручка. Таким образом, в образовании гамет растений T0 участвовали оба типа клеток – трансформированные и нетрансформированные. Помимо того, сегрегация маркера различалась у растений линий T1, полученных черенкованием первичного трансформанта, в зависимости от местоположения черенка на стебле исходного растения, что указывает на химерность растений данного поколения. Далее установлено, что черенкование растений с последующим

размножением семенами, образовавшимися в результате самоопыления, приводило к увеличению доли трансгенных растений в следующих поколениях. Полученные результаты показывают, что трансформанты были химерными, т.е. их ткани содержали как трансгенные, так и нетрансгенные клетки, и эта химерность передавалась в последующие поколения. Кроме состава питательных сред, на появление химерных растений во время трансформации влияют такие факторы, как генотип растения и тип экспланта. Основываясь на этих результатах, мы разработали упрощенный метод, состоящий из нескольких раундов комбинации черенкования, получения семян методом самоопыления и последующей отбраковки растений дикого типа, который позволил значительно обогатить популяции потомков исходных трансформантов рапса растениями, трансгенными по маркеру *gfp*.

Ключевые слова: наследование трансгена; трансформация; химера; витрификация (гипергидратация); рапс (канола).

Introduction

Transfer of foreign DNA is currently a routine procedure for many plant species. However, complications occurring during shoot regeneration may impede the production of transgenic plants.

Serious issues arise when Mendelian laws are broken for some reason during plant transformation resulting in instability of the transgene integrated into the genome. This complicates both the experimental work itself and the interpretation of its outcome, and, therefore, requires further additional careful studies.

Foreign DNA inserted into the genome is usually inherited according to Mendel's laws, segregating in strictly defined ratios depending on number of integration loci. However, in some cases, these rules are violated and transgenes become inherited completely randomly (Sarmah et al., 2004; Popelka et al., 2006). Researchers facing these cases suggest that non-Mendelian inheritance may be caused by various rearrangements that occur during transgene integration (Walters et al., 1992; Tizaoui, Kchouk, 2012). Non-canonical inheritance may also, in some cases, be explained by the formation of genotypic chimeras during plant regeneration (Schmülling, Schell, 1993).

Transgenic plant chimeras have been described for many species (Costa et al., 2002; Flachowsky et al., 2008). The occurrence of chimeric plants during transformation could be explained by multiple reasons, for instance, by ineffectiveness of selective pressure together with endogenous plant tolerance to the selection agents (Rakosy-Tican et al., 2007), and by protection of untransformed cells from the action of selection factor by factor-resistant transformed cells during regeneration (Domínguez et al., 2004). Thus, most likely chimeric transformed plants originate from a group of cells rather than from a single cell of the primary explant (Zhu et al., 2007). The framework of the chimera formation is usually not discussed in the literature, while the elucidation of these mechanisms would help eliminate the possibility of chimera appearance. Using reporters, such as antibiotic or herbicide resistance genes, as well as genes expression of which may cause coloration or glowing of the transformed cells (Zvereva, Romanov, 2000) and thus help unravel the causes of chimera formation. One of the latter reporters is the *gfp* gene, isolated from the glowing jellyfish *Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962). GFP has proven to be a useful tool for monitoring the appearance of chimeric shoots during regeneration in a number of plant species (Malysenko et al., 2003; Faize et al., 2010).

The formation of chimeric plants during regeneration complicates further work with transformants, since the proportion of transgenic plants in the progeny population may be significantly reduced, both when T0 plants are propagated by cuttings well as by seeds. In order to obtain genetically homogeneous transgenic progeny of T0 generation by vegetative propagation, it is necessary to develop approaches to remove chimeras. Therefore, it is necessary to elucidate the factors that may contribute to the formation of chimeric canola plants. This may be achieved by studying the inheritance of *gfp* marker in descendants of primary regenerants obtained during transformation. In addition, we set out the goal to develop a fairly simple approach that allowed to help eliminate chimeras and enrich the populations of transformant progeny with transgene-containing plants.

Materials and methods

Plant material and explant preparation. Two spring canola *Brassica napus* L. varieties – Westar (Canadian origins) and Podmoskovny (Russian origins) were used in this study. Cotyledons of five days old seedlings germinated *in vitro* or the leaf segments from plants propagated by cuttings and then grown *in vitro* for 10–12 weeks were used as explants. Before germinating, the seeds were sterilized for 1 min with 70 % ethanol and 20 min with a 20 % solution of commercial sodium hypochlorite (Domestos, Russia), washed 5 times with sterile distilled water and then placed on solid (0.7 % agar) 1/2 Murashige and Skoog (MS) medium lacking hormones and supplemented with 0.5 % sucrose. Plates with seeds were placed in the dark and kept there for 24 hours, then transferred to a phytotron light chamber with the 12/12 h day/night cycle at illumination intensity of $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, and day/night temperatures of 20–22/17–19 °C. After 5 days, cotyledon lobes cut from seedlings were used to obtain explants. A leaf blade with the removed main vein was cut into 5 mm segments.

All the regeneration media were supplemented with 7 g/L of agar. pH of the media was adjusted to 5.8 before adding agar and autoclaving.

Agrobacterial transformation and plant regeneration. *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL0 that bears the genetic construct pA3011 with *gfp* as a marker gene and *nptII* selection marker was used for plant transformation (Fig. 1, a). The construct was kindly provided by Dr. Peter Ivanov, Department of Virology, Biological Faculty of Lomonosov Moscow State University. *Agrobacterium* cultures were grown in liquid LB medium containing 50 mg/L rifampicin (Rf) and 50 mg/L kanamycin (Km) with vigorous shaking at 25 °C for 24 hours.

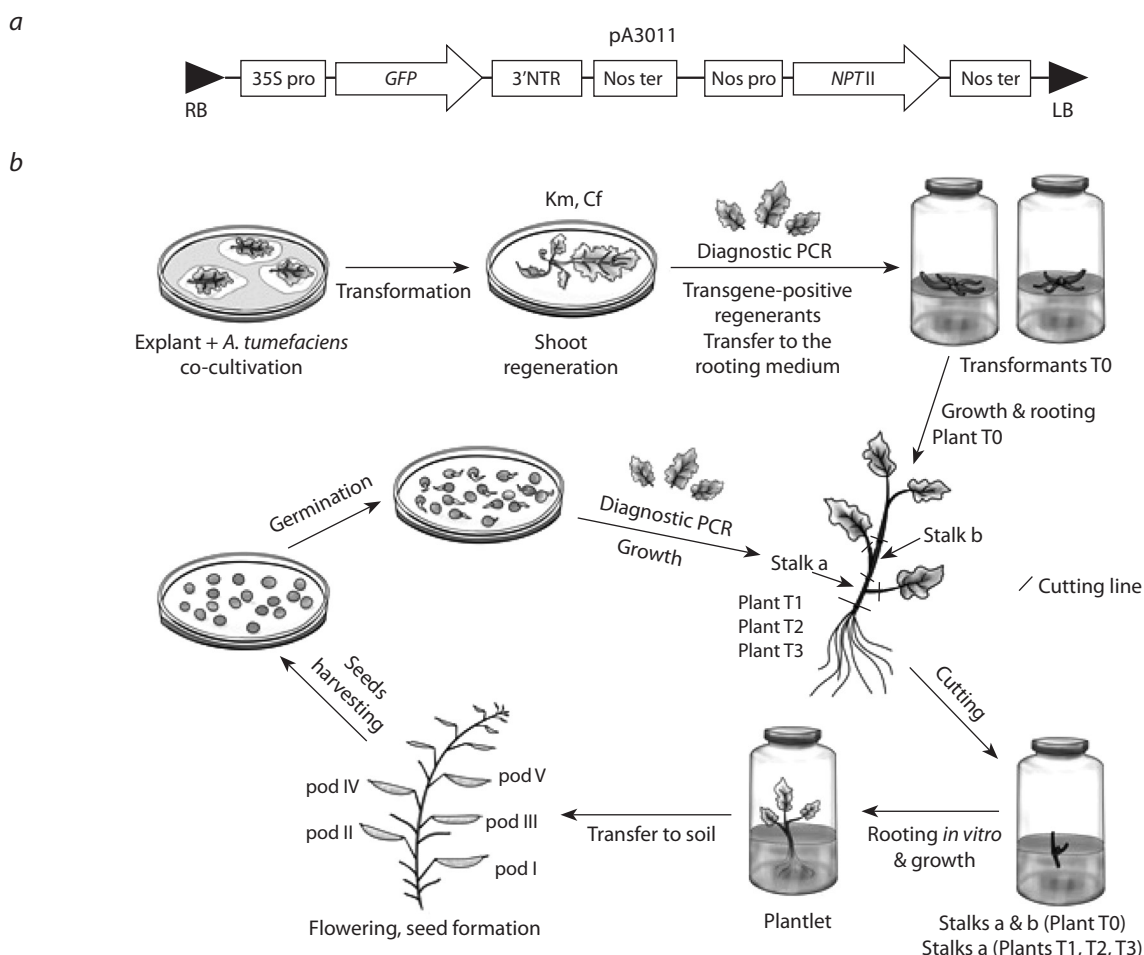


Fig. 1. Schemes of the used genetic construct (a) and the experiment on enrichment of populations of the descendants of transgenic plants with *gfp*-positive plants (b). Created with Paint Tool Sai 2.0.

a – map of T-DNA region of the pA3011 construct that was used to transform the canola cotyledon and leaf explants. 35S pro – promoter of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S; *GFP* – coding region of the GFP gene; 3'NTR – 3'-non-translated sequence from the nopaline synthase gene (NOS); Nos ter – terminator of nopaline synthase gene; Nos pro – promoter of nopaline synthase gene; *NPTII* – coding region of the neomycin phosphotransferase gene; RB – right border; LB – left border.

b – diagram describing the procedure for enrichment of *Brassica napus* L. transgenic population with plants genetically homogenous for the transgene of interest. PCR-positive T0 plants were cut and the resulting cuttings (stalks a & b) were planted *in vitro*. After rooting, grown plantlets a and b were planted in the soil to obtain seeds. Only the first (lower) cuttings (stalks a) of subsequent generation T1 plants were used for planting in the soil. The described cycle of cutting and obtaining seeds from plants grown only from the lower cuttings was repeated for generations T2 and T3 and for subsequent generations if needed. Stalk a – first (lower) cutting; Stalk b – second (upper) cutting; Diagnostic PCR – PCR on the genomic DNA template purified from a leaf of each of the individual regenerants with primers for *gfp*; Transformant T0 – transgene-positive regenerative; Plant T0 – rooted transformant T0.

To produce transgenic plants, the joint cultivation procedure of explants growing together with *A. tumefaciens* cells on the surface of agar medium was as previously reported (Malyshenko et al., 2003; Danilova et al., 2009). After 2 days of co-cultivation on the callusogenesis medium (MS medium containing 3 % sucrose, 2 mg/L α -naphthylacetic acid (NAA), 4 mg/L kinetin, 0.1 mg/L 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)) in the dark, both types of explants were transferred to the morphogenesis medium (MS medium containing 0.7 or 1 % sucrose, 8 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP), 1.0 mg/L NAA) supplemented with 800 mg/L cefotaxime (Cf), 3 mg/L abscisic acid (ABA), and 5 mg/L AgNO_3 and then placed in a light chamber (12/12 day/night cycle at illumination intensity of $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), and day/night temperatures

of 20–22/17–19 °C). At the end of two week incubation, explants were transferred to the morphogenesis medium lacking ABK, but supplemented with 500 mg/L Cf. For cotyledonous explants, Km (15 mg/L) was added to the media depending of the need of a particular experiment. After 5–6 weeks, the formed shoots were cut off from the explants with a razor blade and placed on the rooting medium (0.7 % sucrose, 1/2 macro-MS, total microsalts, CaCl_2 and iron chelate, 0.1 mg/L NAA). Cf was also added to the rooting medium at these stages at 300 mg/L.

T0 transgenic plants of both varieties in which the presence of the *gfp* marker was confirmed by PCR were cut and both lower (stalk a) and upper (stalk b) cuttings were planted *in vitro* on rooting medium (see Fig. 1, b). After root

formation the plantlets were transplanted into the soil and grown under phytotron conditions (12/12 day/night cycle at an intensity of $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ and day/night temperatures of 20–22/17–19 °C) to obtain T0 progeny. In order to analyze distribution of transgenic and non-transgenic seeds in the pods on the peduncles of transformed rapeseed self-pollinated T0 plants, seeds from each pod were collected separately and after disinfection were planted onto 1/2 MS solid agar medium containing 0.5 % sucrose. Km was not included in the media since *gfp*-containing transgenic seeds did not necessarily contain *nptII* as well, and both types of seeds, wild-type and transgenic, germinated poorly on media with Km. The obtained seedlings were screened for marker genes using diagnostic PCR. To obtain T1 plants, all seeds from pods of T0 plants were mixed together and germinated as described above. Only *gfp*⁺ seedlings had been selected for growing T1 plants. For seeds produced by plants of the subsequent generations, the same procedures were carried out. The schematic representation of the experiments is shown on Fig. 1, b.

Screening plants for presence of marker genes. Plasmid DNA was isolated from bacterial cells by alkaline lysis procedure (Green, Sambrook, 2013). Plant total DNA for PCR analysis was isolated using a procedure described by Fulton et al. (1995).

Transformants and plants of T0, T1 and T2 progenies were screened by diagnostic PCR for presence of *gfp* marker with a pair of primers eGFP_FW 5'-CCTGAAGTTCATCTGC ACCAC-3' and eGFP_RV 5'-ACTCCAGCAGGACCAT GTGAT-3', and for the *nptII* gene with a pair of primers NPT_FW 5'-GTGGAGAAGGCTATTCGGCTA-3' and NPT_RV 5'-CCACCATGATATTCGGCAAG-3', respectively, using the following amplification protocol: 94 °C – 4 min, then 30 cycles of amplification (94 °C – 60 s, 64 °C – 60 s, 72 °C – 60 s), and final extension at 72 °C for 4 min. DNA of pA3011 construct served as a positive control and genomic DNA isolated from canola wild type plants was used as a negative control. Additionally, T0 transformant shoots were tested by PCR for contamination with agrobacteria using a pair primers for virD2: virD2F – 5'-GAACCAAGACCCTTCAG CA-3' and virD2R – 5'-ATCCAGGACTATGCCGTGAC-3', with the following amplification protocol: 94 °C – 4 min, then 35 cycles of amplification (94 °C – 60 s, 55 °C – 60 s, 72 °C – 30 s), and final extension at 72 °C for 4 min. The amplified fragments were separated on a 0.8 % non-denaturing agarose ethidium bromide gel.

As an additional proof of plants being transgenic, fluorescence of the GFP protein in organs of candidate transgenic plants was examined by illumination of plant tissues with blue light (440–480 nm) using Axiophot or AxioImager microscopes (Zeiss, Germany). The examples of GFP glow in the transgenic plants are shown on Fig. 2, b.

Statistical and Mendelian segregation analyses. Five identical experiments using at least 24 explants for each experiment were analyzed with one-way ANOVA using the statistical program SPSS v. 9. To evaluate the difference between TPs and NTPs the Student's *t*-test was performed and $p \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

The transformation rate was determined as a ratio of the *gfp*⁺ transgenic shoots number *versus* total number of shoots

formed. The experimental data was processed using Microsoft Excel program. The χ^2 criterion was calculated according to Smiryaev and Kilchevsky (2007).

Results

Search for conditions optimal for shoot regeneration on rapeseed explants

When sucrose content in the medium is not optimized, the shoots formed during regeneration could become vitrified (hyperhydrated) (Qin et al., 2006). It should be noted that in our canola transformation experiments, the regenerated plants formed on the explants of two types morphologically different from one another. On the cotyledon explants, mainly well-differentiated non-vitrified shoots were formed, whereas on leaf explants, most of the appeared shoots and primordia were hyperhydrated and there were no transgenic shoots among the non-vitrified shoots. In order to minimize vitrification, we have tested the correlation of sucrose content in the media with the hyperhydration degree using leaf explants of the Westar variety. By reducing the sucrose concentration in the medium to 0.7 %, we were able to significantly decrease the degree of hyperhydration of the regenerated shoots (Table 1). We used this sucrose-optimized medium in all subsequent experiments as a morphogenesis medium for both canola varieties.

Inheritance of the marker genes integrated into the canola genome

In earlier studies on the transformation of rapeseed cotyledon explants with various genetic constructs (Gomaa et al., 2012; Raldugina et al., 2018), we have shown that in offspring populations of self-pollinated transgenic plants, the segregation of target and marker genes often did not follow Mendelian law of inheritance. In these series of experiments, wild-type, rather than transgenic plants, dominated among the progenies of self-pollinated plants. In some cases, however, the target gene was not inherited at all. We assumed that these plant lines in fact had been chimeric. This was probably due, among other reasons, to the fact that the lower part of the chimeric T0 shoot was under a stronger selective pressure than the apical part, which was farther away from the medium, and also grew later, when the antibiotic could have already become partially decomposed. Thus, non-transformed cells survived and participated in the formation of T0 plants.

We continued our studies by investigating marker gene inheritance in several subsequent generations. For this purpose, we have chosen the *gfp* gene as a marker, because observing the luminescence of GFP protein should allow us to monitor the formation of regenerating shoots at the early stages. However, we were unable to obtain reliable data with clear evidence of the chimera presence in the formed primordial structures (Hoang, Raldugina, 2012), i. e. we were not able to distinguish transgenic cells from non-transformed cells. Glowing was observed in different parts of plants, regardless of the genotype and/or of the explant type (see Fig. 2, b). Therefore, we have not used this approach in the current work to study chimeric nature of the transgenic plants and the factors that may be involved in the chimera formation. Further analyses of the transformed plants were performed using only PCR

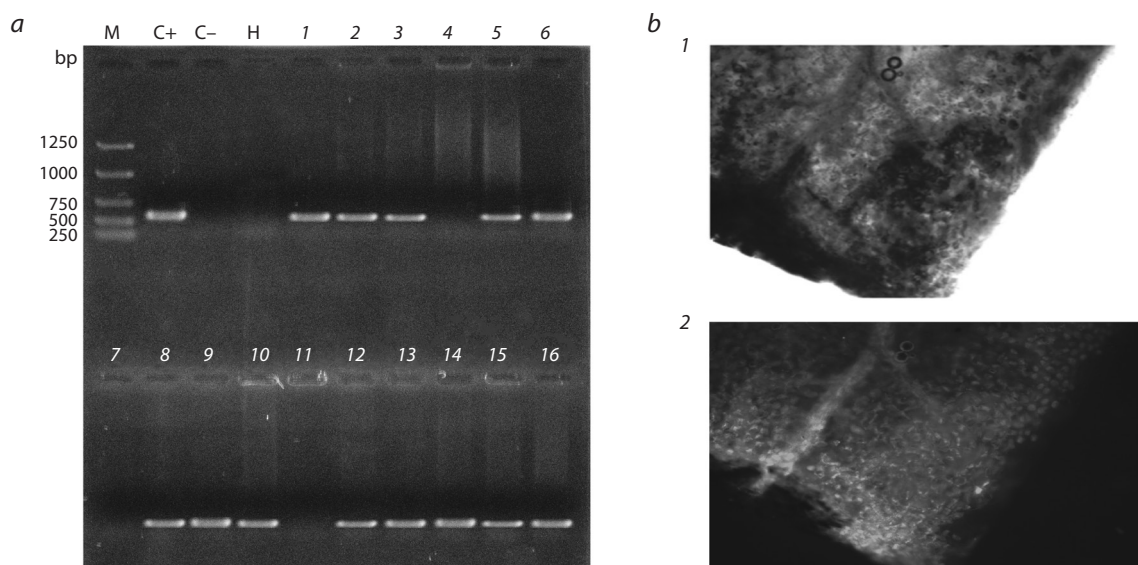


Fig. 2. Screening of candidate plants obtained by agrobacterial transformation for the presence of *gfp* marker.

a – diagnostic PCR to determine the presence of *gfp* marker in the genomes of candidate plants. Total DNA was purified from plant material and PCR in total volume of 20 μ L was carried out as described in Materials and Methods. Ten microliter sample aliquots were then run on a 1 % non-denatured agarose gel containing ethidium bromide. M – molecular weight markers; C+ – PCR using pA3011 DNA (positive control); C– – PCR using wild type canola total DNA (negative control); H – PCR using water instead of DNA template (contamination control); 1–16 – PCR using DNA prepared from candidate plants' material.

b – fluorescence of GFP protein in the cells of the leaf mesophyll of the transformed canola plant. 1 – transgenic plant leaf in transmitted light, 2 – transgenic plants leaf in ultraviolet light, mesophyll cells are seen as the glowing dots.

Table 1. Dependence of vitrification levels of Westar-originated regenerated shoots on sucrose concentration in the medium

Sucrose concentration, %	Proportion of differentiated shoots among all formations, %	Proportion among differentiated shoots, %	
		Vitrified shoots	Transgenic shoots (transformation frequency)
1.0	7.6 ± 0.3	3.7 ± 0.7	0
0.7	8.7 ± 0.3	1.4 ± 0.4	66.67 ± 19.7

Note. Data are the mean $\pm$ SD.

analyses (see Materials and Methods). The results of screening candidate plants for presence of *gfp* marker are shown in Fig. 2, *a*. The data obtained by the PCR analyses were confirmed by detecting the fluorescence of the GFP protein in the organs of candidate plants (see Fig. 2, *b* and Materials and Methods).

In addition, the original T0 transformant regenerants were tested by PCR for agrobacterial contamination as described in Materials and Methods; however, no plant was found to be contaminated (data not shown).

Inheritance of *gfp* marker in T0 regenerants

Several lines of GFP-expressing T0 plants derived from explants of both varieties were planted in the soil. All plants were fertile and after self-pollinating viable seeds were formed. The harvested seeds were germinated under aseptic conditions and were then screened for presence of the *gfp* marker gene.

To find out what types of cells, transformed or non-transgenic, were involved in the formation of generative organs of

T0 plants, we checked *gfp* marker inheritance in pods formed on the central bunch of plants of each of the 6 selected lines. Only four to five lower pods collected from the central bunches were analyzed for presence of *gfp*, since viable seeds were formed exclusively in these pods, but not in pods located higher, under phytotron conditions. We found that *gfp* was inherited randomly throughout the bunch, its presence in the genome of seedlings was not dependent on the location of the pod. This marker was found only in progeny of plants produced from cotyledon explants (Table 2). All seeds harvested from plants originated from leaf explants, were found to be non-transgenic. Thus, both types of cells participated in the formation of gametes of T0 plants.

Inheritance of the *gfp* marker in plants propagated by nodal cuttings

Due to the ability of rapeseed plants to propagate vegetatively by nodal cuttings, an approach widely used to clone individual canola plans, we investigated whether *gfp* marker inheritance

Table 2. Distribution of transgenic and non-transgenic seeds in the pods on the peduncles of transformed rapeseed T0 plants

Line	The number of transgenic and non-transgenic seeds (<i>gfp</i> ⁺ / <i>gfp</i> ⁻) and transgenic seed proportion, %				
	Pod number				
	1	2	3	4	5
PC-1	2/8	7/1	7/3	3/6	NF
	20	87.5	70	33	–
PC-2	0/7	0/10	2/5	0/8	3/3
	0	0	28.5	0	50
WC-3	8/2	6/1	4/3	NF	NF
	80	85.7	57.1	–	–
PL-4	0/9	0/8	0/8	0/10	NF
	0	0	0	0	–
WL-5	0/10	0/10	0/5	0/10	NF
	0	0	0	0	–
WL-6	0/10	0/8	0/8	NF	NF
	0	0	0	–	–

Note. Germination medium contained 0.5× MS and 0.5 % sucrose. P – Podmoskovny, W – Westar, C – cotyledon explants, L – leaf explants, dash – seeds inviable, NF – seeds not formed.

depended on a number cutting rounds (see Fig. 1, *b*). Seeds produced by T0 plants were disinfected and then germinated. Seedlings expressing GFP were planted on rooting medium. Upon the formation of two internodes, the shoots were cut, re-rooted, and the plants formed from the axillary bud of the lower internode were planted in the soil (stalks *a*, see Fig. 1, *b*). Plants formed from the apical bud were cut again and after rooting of the lower cuttings (stalks *b*), they were also planted in the soil. The seeds harvested from these plants were sown again, and the seedlings were tested for presence of *gfp* marker.

Statistical evaluation of the *gfp* segregation data using the χ^2 criterion showed that for lower cuttings obtained from three independent lines of Westar variety (W-2, W-3, W-4) *gfp* inheritance followed Mendelian rules for a monogenic trait (Table 3). However, for upper cuttings, random segregation of *gfp* marker was seen in the next generation plants. Only in W-5, where a plant formed from lower cutting unfortunately had died, Mendelian segregation was observed in progeny of plant grown from upper cutting.

In respect of Podmoskovny variety plants, the distribution of marker gene was completely random and Mendelian segregation was never observed there. However, some seeds containing *gfp* were always ripened on every plant of this variety.

Table 3. Segregation of *gfp* marker in transgenic T1 rapeseed plants, originated from cotyledon explants

Line	Cutting	Total number of T0 progeny plants	Number of transgenic plants (<i>gfp</i> ⁺) and their proportions (in brackets, %)	Number of non-transgenic plants (<i>gfp</i> ⁻)	H _f	H ₀	χ^2_{theor}
W-1	a	20	4 (20)	16	0.8 : 3.2	3 : 1	>3.84
	b	21	0	21	0 : 4	3 : 1	N/A
W-2	a	24	18 (75)	6	3 : 1	3 : 1	0
	b	42	6 (14.3)	36	0.6 : 3.4	3 : 1	>3.84
W-3	a	18	15 (83.3)	3	3.3 : 0.7 15 : 3	3 : 1 15 : 1	0.67 >3.84
	b	33	16 (48.5)	17	1.9 : 2.1	3 : 1	>3.84
W-4	a	20	16 (80)	4	3.2 : 0.8 15 : 3.75	3 : 1 15 : 1	0.27 >3.84
	b	37	14 (37.8)	23	1.5 : 2.5	3 : 1	>3.84
W-5	a			Died			
	b	31	24 (77.4)	7	3.1 : 0.9	3 : 1	0.10
W-6	a			Died			
	b	18	0	18	0 : 4	3 : 1	N/A
P-7	a	47	7 (14.9)	40	0.6 : 3.4	3 : 1	>3.84
	b			Died			
P-8	a	37	19 (51.3)	18	18	2 : 2	3 : 1
	b	40	17 (42.5)	23	23	1.7 : 2.3	3 : 1
P-9	a	39	5 (12.8)	34	34	0.5 : 3.5	3 : 1
		30	11 (36.7)	21	21	1.5 : 2.5	3 : 1

Note. The standard value of $\chi^2_{\text{theor}} = 3.84$ with $p \leq 0.05$. H₀ – theoretical segregation; H_f – actual segregation; W – Westar; P – Podmoskovny; a – lower cutting; b – upper cutting; N/A – not applicable.

Thus, the progeny plants obtained by self-pollination of the original T0 transformants, unexpectedly for us, also turned out to be most likely of chimeric nature.

Inheritance of *gfp* marker in plants of T1 and T2 generations

Integration of transgenic constructs at a single Mendelian locus, regardless of copy number, is typically observed in transformants produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. Based on the assumption that T0 transformants and T0 clones obtained from lower and upper cuttings contain *gfp* marker insertion at a single locus, then in the next T1 progeny three classes of plants according to the genotype could be expected.

In order to enrich transgenic rape populations with plants containing *gfp* marker, only plants homozygous for this marker can be taken to produce T1 progeny. It could be achieved by physical mapping of marker insertion position in plant genome followed by PCR analysis to select for homozygotes in this plant progeny. Alternatively, homozygosity of *gfp* marker may be determined by segregation analysis. A 4:0 *gfp* marker segregation in the next generation would indicate that parental plants were *gfp*⁺/*gfp*⁺ homozygotes. However, both of these approaches are labor- and time-consuming. We, on the contrary, proposed a simplified selection method for enriching populations of T0 progenies with *gfp*-positive plants regardless of the genotype. Although heterozygous transgenic plants will definitely produce non-transgenic off-springs in subsequent generations, however, in terms of transgene expression, in practice it is often not so important whether the transgene-expressing plants are heterozygous or homozygous, the fact of the expression taking place is of the most importance.

To enrich transgenic canola populations for *gfp* marker-containing plants, both hemi- and homozygous, we culled *gfp*-negative seeds in T1 and T2 progenies. Three T0 lines of transformed plants of the Westar variety and one T0 line of the Podmoskovny variety were grown from upper cuttings (we have not used lower cuttings since some of them died) (Table 4).

Seedlings tested positive for *gfp* were cut when one internodium was formed. In this case, the upper cuttings (b) of T2 and T3 transgenic plants were planted in the ground. The results of PCR analysis showed that the proportions of *gfp*-negative seeds produced by T2 and T3 plants decreased, although the numbers of transgenic seeds for every tested plant remained at similar levels.

Discussion

The influence of sucrose on the vitrification degree of regenerant shoots

The formation of over-hydrated shoots in many species depends on sucrose content in the nutrient medium (Sharma, Thorpe, 1989; Qin et al., 2006). In this study, we showed that the lowering sucrose concentration in the regeneration media to 0.7 % led to a decrease in the degree of canola shoot vitrification (see Table 1); that is in accordance with the results described by Yu et al. (2011) on regeneration of the hypocotyl segments of broccoli seedlings.

Table 4. Proportions (%) of *gfp*⁺ plants
in three subsequent generations of transformed plants

Transformed plant line		T1	T2	T3
W-3b	<i>gfp</i> ⁺ / <i>gfp</i> [−]	16/17	16/5	17/1
	Proportion of transgenic seeds, %	48.5	76.2	94.4
W-4b	<i>gfp</i> ⁺ / <i>gfp</i> [−]	14/23	17/4	16/2
	Proportion of transgenic seeds, %	37.8	80.9	88.9
W-5b	<i>gfp</i> ⁺ / <i>gfp</i> [−]	24/7	10/11	12/6
	Proportion of transgenic seeds, %	77.4	47.6	66.7
P-8b	<i>gfp</i> ⁺ / <i>gfp</i> [−]	17/23	16/5	14/2
	Proportion of transgenic seeds, %	45.5	76.2	87.5

Note. Only plants originated from upper cuttings were analyzed since all lower cutting plants had died. W – Westar, P – Podmoskovny, b – second cutting.

Inheritance of *gfp* marker in rapeseed plants of the T0 generation

Analysis of transgenic and non-transgenic seeds allocation on the flower bunches of each T0 plant of cotyledon origin showed that during bunch growth and pod formation distribution of *gfp* marker was completely random, regardless of pod location (see Table 2). This random inheritance suggests that these T0 plants were likely chimeric. It is possible that such a distribution is due to gamete formation from both transgenic and non-transformed cells. Many researchers who have studied transgene inheritance in different plant species suggest that distortion of segregation may reflect sterility of one type of gametes. Aragão et al. (1996) explained the segregation ratio of 1:1, observed in progeny of the transgenic soybean plants by the unviability of transgenic pollen. Walters et al. (1992) suggested that the lack of expected segregation in the progeny originated from crossing transgenic and non-transformed maize plants may be due to pollen unviability in the transgenic plants caused by unsuccessful transgene integration. Non-canonical segregation may also be explained by the chimeric nature of the transgenic plants, in which some gametes may be formed from untransformed cells. Hiei et al. (1994) noted that the progeny of rice transformants showed unusual segregation of *gus* marker gene since T0 plant population consisted exclusively of chimeric plants.

Meristematic formations on the explants that appeared during morphogenesis consist of hull and tunic, with the latter containing several layers, designated starting from the outer layer as L1, L2, L3, etc. (Tooke, Battey, 2003). Each layer of the meristem is responsible for the development of certain plant tissues and organs. For instance, layer L2 is responsible for pollen and seeds formation (plant floral organs) (Irish, 1991). Apparently, the transformed cells are present mainly in the outer layer of L1 (Tooke, Battey, 2003). Based on our data, we assumed that the regenerants formed on cotyledon

explants usually originate mainly from the L2 layer, with the participation of the L1 and L3 layers. On leaf explants the formation of shoots occurs exclusively from the cells of the layer L3, where the transformed cells are not found.

To confirm this, we analyzed the segregation of *gfp* marker in progeny of the original transformants. We have found significant deviations from the Mendelian segregation ratios of 3:1 (one Mendelian *gfp* integration locus) for almost all plants (see Table 3, cuttings a). Statistical evaluation of *gfp* marker segregation data in rapeseed T0 plant population propagated by cutting was performed using the χ^2 criterion considering that *gfp* marker became integrated into the canola genome at a single locus during agrobacterial transformation. It should be noted that some lines, for example, W-3a and W-4a, that produced 80 % or higher proportions of *gfp*-positive seeds might contain two or even a higher number of integration loci of this marker gene in a single or multiple chromosomes (see Table 3, bold numbers). This assumption, however, does not change the conclusion regarding the chimeric nature of the T0 plants since none of the plants showed *gfp*⁺ seeds proportion near 95 % which would have corresponded to 15:1 segregation ratio for digenic trait. Therefore, lines W-3a and W-4a were also likely chimeric as well. Thus, it appears that most of the original transformants were chimeric. The tissues of the generative organs therefore may have developed simultaneously from both transformed and non-transformed cells forming a chimeric meristem, where non-transgenic cells were probably dividing faster than transgenic cells. We hypothesized that under low selective pressure, upon shoot growth, at some point untransformed cells began to predominate in the shoots.

Subsequently, we tested this hypothesis by cutting shoots grown directly from the explant (T0 plants, see Fig. 1, b) and by growing the resulting plantlets for seed production. It was found that type of marker segregation depended on particular plantlet used to grow the adult plant that later formed seeds.

Marker segregation in plant progeny obtained by nodal cutting

Statistical evaluation of *gfp* marker segregation data (see Table 3) showed that even if in some plants originated from the lower part of the shoot (stalk a, see Fig. 1, b, lines W-2, W-3 and W-4), a 3:1 segregation was seen, however, for plants, originated from the upper part of the shoot (stalk b) this evaluation revealed that marker segregated randomly. Thus, in most of the T1 plants inheritance of *gfp* was dependent on a cutting location, confirming these plants were chimeric. Planting original shoots cut directly from the explant and positively tested for *gfp* marker without preliminary rounds of additional propagations by cuttings therefore may lead to selecting chimeric transformants and in the following generations to increasing the proportion of non-transgenic plants in progeny populations.

The approach described above allowed us to identify putative chimeras that must be somehow eliminated from population of transgenic plants. Some researchers, for example, Chen (2011), in order to get rid of chimeras among *Lesquerella fendleri* transformants recommend carrying out several rounds of successive regenerations, each time selecting shoots expressing the marker *gus* gene. Using this approach, the

author managed to reduce proportion of chimeric shoots from 80–90 to 2.2 %, without increasing concentration of the selection antibiotic, that strongly inhibited morphogenesis when supplied in high concentrations to the regeneration medium.

Similar approach involving successive sub-cultivations of leaf explants that were cut from candidate transgenic plants is recommended by Li et al. (2009) for producing marker-less tobacco transgenic plants. Using this procedure, they managed to reduce the proportion of chimeric plants in transgenic population from 60–80 to 4–8 %.

The approaches described above are applied when transformed plants need to be propagated vegetatively, for example, by cutting. In the case of propagation by seeds, for example, by self-pollination, the next generations of plants are supposed to be “cleaned” of chimera. However, to our surprise, T1 plants obtained by self-pollination of the original transformants turned out to be chimeric. The most obvious explanation for this phenomenon is the instability of the *gfp* marker in the transformant genomes. However, “genetic restoration”, a mechanism of non-Mendelian inheritance of extra-genomic information, first discovered in *Arabidopsis thaliana*, may also take place in our case (Lolle et al., 2005). Several independent mutant strains of *arabidopsis* have been shown to produce apparently normal off-springs with unusually high frequency of a few percent, which is higher than it would be expected if there were random reverse mutations. Lolle et al. (2005) suggested that this is due to the reversion of the original DNA sequences by a mechanism that includes template-driven restoration of the ancestral DNA using genetic information passed on in form of “cache RNA”. This phenomenon, called the “RNA cache hypothesis”, means that organisms may sometimes re-write their DNA to ancestral sequences based on a cache RNA template inherited from past generations (Lolle et al., 2005). The RNA-caching hypothesis, however, has been challenged by some researchers (Comai, Cartwright, 2005; Mercier et al., 2008; Miyagawa et al., 2013). Nevertheless, in support of RNA caching hypothesis, the presence of RNA copies of genome regions and even full-length chromosome RNA duplicates has recently been shown in some organisms (Byeon, Kovalchuk, 2016; Lindblad et al., 2017). It is possible that in our case this putative mechanism works only for a fraction of cells, which leads to the appearance of chimeras.

Inheritance of *gfp* marker in rapeseed transformants of T1 and T2 generations

Determination of transgenic and non-transgenic seedling numbers that germinated from seeds formed on plants of T1 and T2 generations grown from plantlets obtained from upper cutting (stalk b) of primary transformants revealed that with each subsequent generation the proportion of seeds tested negative for *gfp* marker decreased (see Table 4, Fig. 1, b), although the total number of seeds was decreased to a lower extent. Since wild type cells contribute to gamete pool formation in chimeric T1 plants, there is a higher proportion of wild type plants in T0 progeny compared to that in T1 progeny. A 3:1 segregation was observed for most of T1 plant lines; this was seen most likely since integration of *gfp* marker into the genome occurred only at a single Mendelian locus in these lines. As to the increase in *gfp*⁺ plants proportion in the progeny of

T2 plants compared to their T1 parents that was observed in our experiments, an explanation probably should be sought in non-compliance with conditions necessary for implementation of the segregation law for monogenic trait. For most sexually reproducing organisms, cases where Mendel's laws can strictly account for all patterns of inheritance are relatively rare. Often the inheritance patterns are more complex (Schacherer, 2016). It is also possible that the failure to comply with the monogenic trait segregation law in our case is due to growing plants under phytotron conditions rather than in natural environment (influence of the environment, epigenetic factors and RNA-caching?). Addressing these issues, however, was beyond the scope of current study.

Conclusions

In summary, we have found that the majority of our regenerated transgenic canola plants appear to be chimeras. Unfortunately, we were unable to clearly show what factors determine formation of chimeric transgenic plants. However, we have shown what factors may be involved in appearance of chimeric plants during transformation. These include genetic background of the plant, type of explant used for transformation, and also of the nutritional media used for transformation and regeneration procedures. We also showed that chimera, for some unknown reason(s), may be passed on to subsequent generations.

According to the reports of the other groups, when transgenic plants are being created, chimeric plants also arise. Usually, researchers cull them and leave only those shoots that show Mendelian segregation, usually of only one particular gene, a marker. In addition, inheritance of transgenes in plants propagated by nodal cutting is not usually studied. Commonly, the entire transformed regenerant shoot is planted in the soil, DNA then is isolated from leaf material and tested for transgenicity. We, however, first propagated the plants asexually by nodal cutting, planted obtained cuttings in the soil and only then studied segregation of *gfp* marker; this round of selection should be repeated at least 2–3 times. In this study, we have shown that our simplified approach allowed us to significantly increase the proportion of plants containing *gfp* marker in descendant populations of transformed canola plants.

References

- Aragão F.J.L., Barros L.M.G., Brasileiro A.C.M., Ribeiro S.G., Smith F.D., Sanford J.C., Faria J.C., Rech E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 1996;93:142-150. DOI 10.1007/BF00225739.
- Byeon B., Kovalchuk I. Non-coding RNAs match the deleted genomic regions in humans. *Sci. Rep.* 2016;6:37452. DOI 10.1038/srep37452.
- Chen G.Q. Effective reduction of chimeric tissue in transgenics for the stable genetic transformation of *Lesquerella fendleri*. *HortScience*. 2011;46:86-90. DOI 10.21273/HORTSCI.46.1.86.
- Comai L., Cartwright R.A. A toxic mutator and selection alternative to the non-Mendelian RNA cache hypothesis for *hothead* reversion. *Plant Cell*. 2005;17:2856-2858. DOI 10.1105/tpc.105.036293.
- Costa M.G.C., Otoni W.C., Moore G.A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. *Plant Cell Rep.* 2002;21:365-373. DOI 10.1007/s00299-002-0533-1.
- Danilova S.A., Kusnetsov V.V., Dolgikh Yu.I. A novel efficient method for maize genetic transformation: usage of agrobacterial monolayer. *Russ. J. Plant Physiol.* 2009;56:258-263. DOI 10.1134/S1021443709020150.
- Dominguez A., Cervera M., Pérez R.M., Romero J., Fagoaga C., Cubero J., López M.M., Juárez J.A., Navarro L., Peña L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Mol. Breed.* 2004;14:171-183. DOI 10.1023/B:MOLB.0000038005.73265.61.
- Faize M., Faize L., Burgos L. Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC Biotechnol.* 2010;10:53. DOI 10.1186/1472-6750-10-53.
- Flachowsky H., Riedel M., Reim S., Hanke V. Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. *Electron. J. Biotechnol.* 2008;11(1):26-40. DOI 10.4067/S0717-34582008000100003.
- Fulton T.M., Chunwongse J., Tanksley S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1995;13:207-209. DOI 10.1007/BF02670897.
- Gomaa A.M., Raldugina G.N., Burmistrova N.A., Radionov N.V., Kusnetsov V.I. Response of transgenic rape plants bearing the *OsMyb4* gene from rice encoding a trans-factor to low above-zero temperature. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012;59(1):105-114. DOI 10.1134/S1021443711060070.
- Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edn. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 1994;6:271-282. DOI 10.1046/j.1365-3113X.1994.6020271.x.
- Hoang T.G., Raldugina G.N. Regeneration of transgenic plants expressing the *gfp* gene from rape cotyledonary and leaf explants: effects of the genotype and ABA. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012;59(3):406-412. DOI 10.1134/S1021443712030089.
- Irish V.F. Cell lineage in plant development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1991;1:169-173. DOI 10.1016/s0959-437x(05)80065-6.
- Li B., Xie C., Qiu H. Production of selectable marker-free transgenic tobacco plants using a non-selection approach: chimerism or escape, transgene inheritance, and efficiency. *Plant Cell Rep.* 2009;28:373-386. DOI 10.1007/s00299-008-0640-8.
- Lindblad K.A., Bracht J.R., Williams A.E., Landweber L.F. Thousands of RNA-cached copies of whole chromosomes are present in the ciliate *Oxytricha* during development. *RNA*. 2017;23(8):1200-1208. DOI 10.1261/rna.058511.116.
- Lolle S.J., Victor J.L., Young J.M., Pruitt R.E. Genome wide non-Mendelian inheritance of extra-genomic information in *Arabidopsis*. *Nature*. 2005;434:505-509. DOI 10.1038/nature03380.
- Malyschenko S.I., Tyul'kina L.G., Zvereva S.D., Raldugina G.N. Transgenic *Brassica campestris* plants expressing the *gfp* gene. *Russ. J. Plant Physiol.* 2003;50(2):276-281. DOI 10.1023/A:1022997803459.
- Mercier R., Jolivet S., Vignard J., Durand S., Drouaud J., Pelletier G., Nogué F. Outcrossing as an explanation of the apparent unconventional genetic behavior of *Arabidopsis thaliana* *hth* mutants. *Genetics*. 2008;180:2295-2297. DOI 10.1534/genetics.108.095208.
- Miyagawa Y., Ogawa J., Iwata Y., Koizumi N., Mishiba K.-I. An attempt to detect siRNA-mediated genomic DNA modification by artificially induced mismatch siRNA in *Arabidopsis*. *PLoS One*. 2013;8(11):e81326. DOI 10.1371/journal.pone.0081326.
- Popelka J.C., Stephanie G., Moore A., Molvig L., Higgins T.J.V. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. *Plant Cell Rep.* 2006;25:304-312. DOI 10.1007/s00299-005-0053-x.

- Qin Y., Gao L.H., Pulli S., Guo Y.D. Shoot differentiation, regeneration of cauliflower and analysis of somaclonal variation by RAPD. *Hereditas*. 2006;143:91-98. DOI 10.1111/j.2006.0018-0661.01944.x.
- Rakosy-Tican E., Aurori C.M., Dijkstra C., Thieme R., Aurori A., Davey M.R. The usefulness of the *gfp* reporter gene for monitoring *Agrobacterium*-mediated transformation of potato dihaploid and tetraploid genotypes. *Plant Cell Rep.* 2007;26:661-671. DOI 10.1007/s00299-006-0273-8.
- Raldugina G.N., Maree M., Mattana M., Shumkova G., Mapelli S., Kholodova V.P., Karpichev I.V., Kuznetsov V.I. Expression of rice *OsMyb4* transcription factor improves tolerance to copper or zinc in canola plants. *Biol. Plant.* 2018;62:511-520. DOI 10.1007/s10535-018-0800-9.
- Sarmah B.K., Moore A., Tate W., Molvig L., Morton R.L., Rees D.P., Higgins T.J.V. Transgenic chickpea seeds expressing high levels of a bean α -amylase inhibitor. *Mol. Breed.* 2004;14(1):73-82. DOI 10.1023/b:molb.0000037996.01494.12.
- Schacherer J. Beyond the simplicity of Mendelian inheritance. *C. R. Biologies.* 2016;339(7-8):284-288. DOI 10.1016/j.crv.2016.04.006.
- Schmülling T., Schell J. Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. *Plant Mol. Biol.* 1993;21:705-708. DOI 10.1007/BF00014554.
- Sharma K.K., Thorpe T.A. *In vitro* regeneration of shoot buds and plantlets from seedling root segments of *Brassica napus* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1989;18:129-141. DOI 10.1007/BF00033471.
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962;59:223-239. DOI 10.1002/jcp.1030590302.
- Smiryaev A.V., Kilchevsky A.V. Genetics of Populations and Quantitative Traits. Moscow: KolosS Publ., 2007. (in Russian)
- Tizaoui K., Kchouk M.E. Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. *Genet. Mol. Biol.* 2012;35:640-649. DOI 10.1590/S1415-47572012000400015.
- Tooke F., Battey N. Models of shoot apical meristem function. *New Phytol.* 2003;159:37-52. DOI 10.1046/j.1469-8137.2003.00803.x.
- Walters D.A., Vetsch C.S., Potts D.E., Lundquist R.C. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol. Biol.* 1992;18:189-200. DOI 10.1007/BF00034948.
- Yu U., Zhao Y.-Q., Zhao B., Ren S., Guo Y.-D. Influencing factors and structural characterization of hyperhydricity of *in vitro* regeneration in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Can. J. Plant Sci.* 2011;91:159-165. DOI 10.1139/CJPS10034.
- Zhu X.Y., Zhao M., Ma S., Ge Y.M., Zhang M.F., Chen L.P. Induction and origin of adventitious shoots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell Rep.* 2007;26:1727-1732. DOI 10.1007/s00299-007-0398-4.
- Zvereva S.D., Romanov G.A. Reporter genes for plant genetic engineering: characteristics and detection. *Russ. J. Plant Physiol.* 2000;47:424-432. Record Number: 20001614176.

ORCID ID

G.N. Raldugina orcid.org/0000-0002-3349-8461

T.G. Hoang orcid.org/0000-0001-6891-0121

Acknowledgements. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. The state registration number of the state order is AAAA-A19-119081990032-1.

We would like to thank Dr. Peter Ivanov for providing pA3011 construct, Dr. Yulia Dolgikh for helpful discussions during preparation of this manuscript, Katrin Platonova for help in the preparation of figures and Olga Shamova for help in drawing pictures.

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

Received September 16, 2020. Revised January 23, 2021. Accepted January 27, 2021.

A positive experience in applying the biolistic approach to potato varieties Aksor and Nevskiy

N.P. Malakhova^{1, 2}✉, Y.A. Skiba^{1, 2, 3}, G.A. Iskakova^{1, 2}, D.A. Naizabayeva^{1, 3}, B.K. Tezekbaeva^{1, 2},
G.A. Ismagulova^{1, 2, 3}, E.R. Maltseva^{1, 2, 3}

¹ M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Kazakhstan

² Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

³ Almaty Branch of National Center for Biotechnology in the Central Reference Laboratory, Almaty, Kazakhstan

✉ tasha_malakhova@mail.ru

Abstract. The method of biological ballistics (biolistic transformation, genetic bombardment) of plants is one of the most modern methods used for direct gene transfer into plant cells. The main advantages of this method include the ability to simultaneously incorporate several target genes into the plant genome, carry out transfer without unnecessary agrobacterial parts and plasmid DNA sequences, and the short time needed to produce transgenic cells. For different plant objects, the efficiency of obtaining transgenic plants by the ballistic method varies from 1 to 3 %. For potato plants, the transformation efficiency is quite low at the moment and the selection of optimal conditions for biolistics is one of the pressing issues of practical biotechnology. This article presents a successful experience of introducing two genes of interest into two potato varieties using the biolistic approach. The results of biolistic transformation experiments are presented for two types of explants: potato internodes and calli of the varieties Aksor and Nevskiy. Of the 862 explants used for transformation, 56 regenerated plants were obtained. PCR screening of transformants revealed one plant with the insertion of the chitinase gene, one with the insertion of the endo- β -1,3-glucanase gene, and co-transformation by both genes was confirmed in four regenerants. The average transformation efficiency for potato explants was 0.7 %. A high number of regenerants (56) as opposed to a low number of transformants (6) reflects an attempt to increase the number of regenerants by using a lower concentration of the selective agent (kanamycin). Although this approach requires more effort, it can be used to produce potato lines with integrated genes of interest for further use in crop breeding. The lines of potato obtained in the current study by introducing two genes associated with the plant response to fungal pathogens will be further assessed for their resistance to fungal diseases and, if successful, will be used in potato crop breeding.

Key words: biolistic transformation; potato; explant; internodes; calli; biotechnology.

For citation: Malakhova N.P., Skiba Y.A., Iskakova G.A., Naizabayeva D.A., Tezekbaeva B.K., Ismagulova G.A., Maltseva E.R. A positive experience in applying the biolistic approach to potato varieties Aksor and Nevskiy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):157-163. DOI 10.18699/VJ21.019

Положительный опыт применения биобаллистического подхода к картофелю сортов Аксор и Невский

Н.П. Малахова^{1, 2}✉, Ю.А. Скиба^{1, 2, 3}, Г.А. Исакова^{1, 2}, Д.А. Найзабаева^{1, 3}, Б.К. Тезекбаева^{1, 2},
Г.А. Исмагулова^{1, 2, 3}, Э.Р. Мальцева^{1, 2, 3}

¹ Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

² Институт биологии и биотехнологии растений Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

³ Филиал Национального центра биотехнологии Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

✉ tasha_malakhova@mail.ru

Аннотация. Метод биобаллистической трансформации растений – один из наиболее современных способов, используемых для прямого переноса генов в клетки растений. К главным преимуществам этого метода относятся возможность одновременно встраивать в геном растений несколько целевых генов, проводить перенос без лишних агробактериальных участков и последовательностей плазмидной ДНК, а также короткие сроки получения трансгенных клеток. В среднем для разных объектов эффективность получения трансгенных растений баллистическим методом варьирует от 1 до 3 %. Для растений картофеля на сегодняшний момент эффективность трансформации довольно низкая, и подбор оптимальных условий проведения биобаллистики является одним из актуальных вопросов практической биотехнологии. В данной статье представлен положительный опыт внедрения двух генов интереса в два сорта картофеля с использованием подходов биобаллистики. Представлены результаты экспериментов по биобаллистической трансформации двух видов эксплантов – междоузлий и каллусов картофеля сортов Аксор и Невский. Из 862 эксплантов,

подвергнутых трансформации, получено 56 растений-регенерантов. В результате скрининга трансформантов методом ПЦР выявлено одно растение со вставкой гена хитиназы, одно со вставкой гена эндо- β -1,3-глюканазы и в четырех регенерантах подтверждена котрансформация обоими генами. Средняя эффективность трансформации эксплантов картофеля составила 0.7 %. Большое число растений-регенерантов (56) по отношению к числу трансформантов (6) отражает попытку увеличить количество регенерантов использованием низких концентраций селективного агента (антибиотика канамицина). Хотя этот подход требует заметных усилий, он может применяться для получения линий картофеля со вставкой генов интереса для их дальнейшего использования в селекции. Линии картофеля, полученные в данном исследовании после внедрения двух генов, связанных с устойчивостью растений к грибным патогенам, будут в дальнейшем оцениваться на устойчивость к грибным заболеваниям и в случае успешного прохождения испытаний будут включены в селекционный отбор.

Ключевые слова: биобаллистическая трансформация; картофель; эксплант; междоузлия; каллусы; биотехнология.

Introduction

Modern biotechnological studies dedicated to the transformation of potatoes use a number of approaches based on both direct gene transfer and agrobacteria. The agrobacterial approach has traditionally been used to transform potato leaves, internodes, and tubers. This is due to the good susceptibility of potato plants to agrobacteria, and this method serves best when it is necessary to transfer one gene to the genome of the host plant. If the goal of research is the introduction of several genes into the genome at once, with their coordinated integration and expression, then the method of choice will be the biolistic transformation (Romano et al., 2001; Craig et al., 2005).

It is known that the effectiveness of biolistic transformation depends on a large number of factors, including the number of embryogenic cells, their regenerative ability, the number of DNA-coated particles, and the amount of DNA that is bound to the particles (Rivera et al., 2012). However, in case of potatoes the transformation success also largely depends on the genotype of the plant (Jo et al., 2014).

Despite the fact that the method of biolistic transformation has been used for about 20 years and has become routine for some crops (Taylor, Fauquet, 2002), it is still rarely used for potatoes. The first work on the bombardment of potatoes was published in 2001 (Romano et al., 2001), but since then the number of such works has not exceeded a dozen. The sizes of introduced sequences (Ercolano et al., 2004), the comparison with PEG-mediated transformation of protoplasts (Craig et al., 2005) and even the possibility of conducting bombardment with agrobacterial cells carrying three genes of interest were studied (Nguyen et al., 2001).

According to available literature, the efficiency of potato transformation largely depends on the explants for bombardment: for leaves, it is 0.02 plants per transformed explant; this index is higher for micro-tuber slices (0.1 plants per transformed explant), and the maximum result is achieved when using internodes (0.77 plants per transformed explant) (Romano et al., 2001).

However, to date, there are not enough comparable data in the literature on the effectiveness of transformation using the bombardment method depending on the type of explants. The explant type mostly used in the studies where transformation efficiency was indicated in numbers was potato leaves. For example, Craig et al. (2005) indicate 0.5 transformation events per leaf as efficiency, and Nguyen et al. (2001) confirm these numbers, indicating that the transformation efficiency was

similar to Craig's data. The only comparable data available in the literature are the data by Romano et al. (2001).

In addition, all works that somehow describe the effectiveness of transformation state that it depends on the genotype, with a special mention of "low frequency of the appearance of regenerants selected using kanamycin" (Ercolano et al., 2004). The experiments performed by Joe and colleagues (Jo et al., 2014) even show that marker-free transformation is more prone to the characteristics of the variety compared to marker-mediated transformation. The authors suggest that this may be due to the variety-specific features of antibiotic tolerance, which gives transformed cells different opportunities for shoot development.

Although the interest in biolistic transformation for its use in potato breeding increases, more studies on the application of method are needed to establish the most suitable explant type and fine-tune the procedures for both bombardment and post-bombardment stages.

The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of the biolistic transformation of potatoes depending on the plant explant type.

Materials and methods

The object of study was potato of two varieties – Aksor and Nevskiy. Aksor is a potato variety of Kazakhstan's breed, characterized by relative heat resistance, drought resistance, and disease resistance (http://www.kartofel.org/cultivars/reg_cult/aksor.pdf). Nevskiy is a potato variety of Russian selection, medium early, high-yielding, poorly resistant to fusarium infection (<http://www.kartofel.org/katalog/katalog1.pdf>).

Preparing plant explants for transformation. Explant type 1. The internodes of test plants (21–28 days old), grown on the medium for test tube plants, were longitudinally cut into segments and directly exposed to OSS osmotic medium with cut side up (composition of the medium is provided below in the corresponding section) 24 hours before the bombardment (Sanford et al., 1993).

Explant type 2. A two-week callus was obtained from potato plants cultivated on the medium for test tube plants, cut along internodes and put with cut side up on callus-inducing medium. Resulting callus was transferred to osmotic medium and simultaneously embryogenic callus was selected with the control of a stereoscopic microscope (Sambrook et al., 1989).

Genetic constructs for potato transformation. The full-size genes – class I chitinase and potato endo- β -1,3-gluca-

Table 1. The composition of the media used in the study

Parameter	Test tube plants' Medium	Callus-inducing Medium	Osmotic Medium (OSS)	Selection Medium	Regeneration Medium
Murashige–Skoog Basal Medium, g/l	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
Murashige–Skoog vitamins, ml/l	1	1	1	1	1
Sucrose, g/l	30	30	30	30	30
Agar, g/l	8	8	8	8	8
2,4-D, mg/l	–	2	2	2	–
Mannitol, g/l	–	–	36.43	–	–
Zeatin, mg/l	–	0.5	–	0.5	0.5
Kanamycin, mg/l	–	–	–	20	20
Gibberellic acid, mg/l	–	–	–	–	2

nase – were cloned from the potato variety Aksor induced by *Fusarium solani* (Chirkin et al., 2016). The genes were excised from pUC57 vector by *Bam*HI and *Sac*I sites and independently cloned to pBI121 vector containing the selective kanamycin resistance gene, resulting in two separate genetic constructs. Minimal expression unit (MEU) was excised from the vector with *Eco*RI and *Bg*/II restriction endonucleases.

Biolistic transformation of potato embryogenic callus and internodes. The biolistic transformation of the potatoes was carried out on PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad) device at vacuum pressure of 91.4–94.8 kPa, using gold particles bound to DNA according to the manufacturer's instructions. For each experiment, 100 ng of elution-purified MEU was used. Microparticles (1 µm) of gold (Bio-Rad) coated with DNA according to the binding procedure (Sanford et al., 1993) were used. Four to seven shots were fired for each design, using both 900 and 1100 psi discs.

Nutrient media. The composition of the nutrient media used in the study is provided in Table 1. All the media are based on Murashige–Skoog medium (Murashige, Skoog, 1962).

Cultivation of plant tissue after transformation. After the bombardment, the plant material was left on osmotic media for two days, then the transformed calli were planted on Selection Medium containing antibiotic kanamycin as a selective agent. Selection took from 45 to 65 days with exposition to the light to register points of growth, detected by the presence of chlorophyll-bearing cells at 10–20× magnification. The selected growth points were passaged to regeneration medium. Regenerants were first planted in Petri dishes, and then, as they grew, into Magenta boxes. Resulting individual plants were passaged to test tubes plants' medium.

Analysis of the presence of the target gene insert in regenerated plants. All regenerated plants were analyzed

for the presence of the target gene insert. The analysis of the insert was carried out by a polymerase chain reaction using primers selected for the introduced genetic design. For analysis of the presence of the glucanase gene insert in potato plants, the following primers were used: Ch_S_F (CCACG TCTTCAAAGCAAGTGG); Gl_S_R (TGAATGTTGGTG GCAACAAGTAAT).

The primer design for the chitinase gene insert was the following: Ch_S_F (CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG); Ch_S_R (CATTTGTATTACCACACCAGCCG).

DNA for analysis was isolated using Sigma EXTRACT-N-AMP-RED PLANT PCR kit. Two microliters of the resulting DNA were used for PCR along with 2 µl HotTaq ×10 buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 10 pmol of each primer and 1 unit of HotTaq DNA polymerase. The regime for the amplification of both genes was the following: initial denaturation at 95 °C for 5 minutes, followed by 35 cycles (94 °C – 30 sec; 55 °C – 30 sec; 72 °C – 40 sec) and 72 °C – 5 minutes.

Visualization of the PCR products was carried out in 1.5 % ethidium bromide-stained agarose gel in TAE buffer and processed by gel documentation system (Bio-Rad).

Results

For the biolistic transformation, we used two potato varieties (Aksor and Nevskiy) introduced in Kazakhstan and the genetic constructs based on the pBI121 vector (Fig. 1) containing selective kanamycin resistance gene and two target genes – class I chitinase gene and potato endo-β-1,3-glucanase gene – cloned from the potato variety Aksor induced by *Fusarium solani* infection (Chirkin et al., 2016). These genes were part of the previous research of plants resistance to fungal diseases, with the idea that their constant expression might increase plant resistance to fungal diseases.

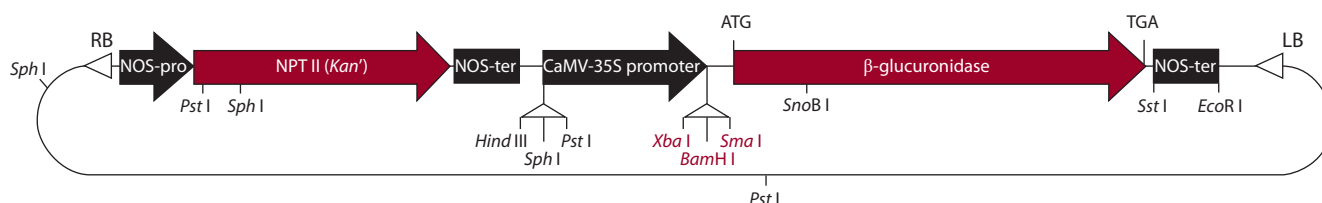


Fig. 1. Scheme of pBI121 vector.

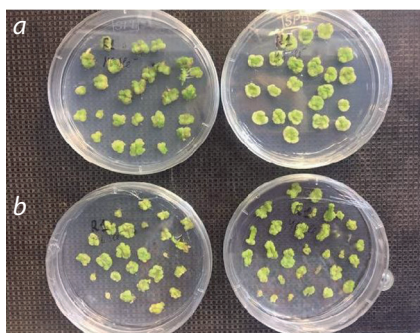


Fig. 2. Embryogenic callus of potato on a nutrient medium for the callus induction: *a* – calli of Aksor potato; *b* – calli of Nevskiy potato.

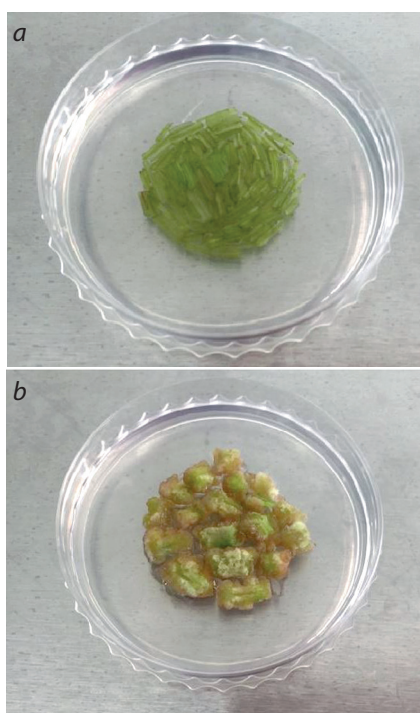


Fig. 3. Potato explant on an osmotic biolistic medium: *a* – fresh internodes; *b* – calli derived from internodes.

The genes were introduced into the vector instead of the second selective marker, the β -glucuronidase gene, under the control of CaMV-35S promoter to ensure constant expression of the genes, allowing the study of their importance in the plant's immune response and the development of potato plants with enhanced resistance to fungal diseases. An independent construct was created for each gene; the presence of the selective gene in both constructs allowed selecting plants with both genes at once, as well as with individually introduced genes.

To transform potato cells with two target genes at once, we performed a biolistic transformation, in which the co-transformation efficiency is quite high and, according to the available literature (Romano et al., 2001), is up to 85 % when using two constructs simultaneously.

The regenerative ability of potatoes is lost quite quickly during callus formation and cultivation, so, when choosing the optimal tissue for biolistic experiments, we were primarily guided by the presence of the regenerative ability of the callus cultures for a long period necessary for the biolistics itself and subsequent regeneration and selection on a nutrient medium.

A few studies dedicated to potato biolistic transformation use leaves of 4–5-week-old seedlings as explant material. However, our preliminary experiments have shown insufficient regeneration efficiency of this type of explant on the Aksor and Nevskiy varieties. It should be noted that explants obtained from internodes have high regeneration potential, and therefore have been successfully used in a number of studies on agrobacterial transformation to improve the efficiency of the process (Kisgyörgy et al., 2008; Mielby et al., 2012).

Our preliminary biolistic experiments showed higher effectiveness of internodes as explant in comparison with leaves and apical meristems. In this regard, to study the effectiveness of the potato biolistic transformation depending on the type of plant explant, we selected two types of explant – internodes and 2–3-week calli obtained from potato internodes.

It should be noted that the two potato varieties selected as the starting material – Aksor and Nevskiy – differed in behavior in cell culture. During the cultivation of internodes on a callus-inducing nutrient medium (Fig. 2), the embryogenic calli of Aksor potatoes were large, uniform, while the calli of Nevskiy potato did not reach large sizes and began to turn yellow and die relatively quickly.

Both types of explants – fresh potato internodes and a 2–3-weeks-old callus obtained from potato internodes (Fig. 3) – were used for the biolistic experiment.

This approach was supposed to offset the difference in callus formation of explants taken in the experiment. This was especially important for calli of the Nevskiy variety as they showed insufficient callus formation from the original plant material, according to the results of the visual assessment of their ability to start callus formation *in vitro*.

A total of 5 series of transformation experiments was conducted, each containing 10 plates, with a total number of explants used – 862, of which 475 explants were obtained from the Aksor variety, and the remaining 387 – from the Nevskiy variety. In the presence of the selective agent, cells carrying the antibiotic resistance gene survived, while non-transformed cells died. Kanamycin, an antibiotic widely used in the potato transformation studies, was used as a selective agent at a concentration of 20 mg/l. By the end of the selection stage, during which callus was induced in the fresh internodes used for ballistics, the two types of explants were almost equal in shape and size.

After subculturing the explants on the selection medium for 2 months, the plates were visually analyzed for the presence of the developing plantlets (points of growth), which were transferred to regeneration medium. Only calli with visible signs of regeneration were selected, as in Figure 4, *a*, which shows the explants to be transferred to regeneration medium (see Fig. 4, *b*) to stimulate the regenerative abilities of the material by zeatin and gibberellic acid. The regenerant plants were grown and subcultured on test tube plants' medium for further study and propagation.

In general, the explants' regenerative ability was sufficient, but not all visible seedlings reached the stage of separation from the main callus into separate magenta boxes or subsequent transfer to separate tubes. After separation from the main callus, some regenerants acted differently in the second round of selection. As shown in Figure 5, one of the plants (right) is tolerant to the presence of kanamycin, while the other (left) did not go through the selection stage and was rejected.

As a result of the selection, potato regenerant plants presumably carrying an insert of target chitinase and glucanase genes were obtained. The number of potato regenerant plants obtained after the transformation of various types of explants (internode and callus) was different for the two varieties. A total of 56 regenerants was

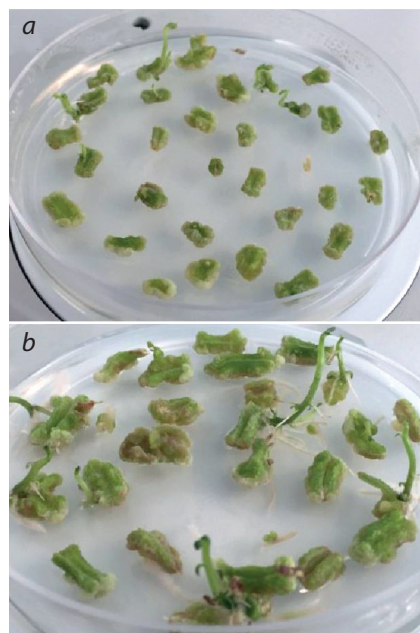


Fig. 4. Potato explants after biolistic transformation: *a* – potato explants after exposure to selective medium; *b* – potato explants at the regeneration stage.



Fig. 5. Regenerant plants on selective medium in the second stage of selection.

obtained from the 862 explants taken in the experiment, with the largest number of regenerants from the internodes of the Nevskiy variety. The survival of regenerated plants from the Aksor callus tissue was 7.4, and that of the Nevskiy variety was 4.8 (Table 2).

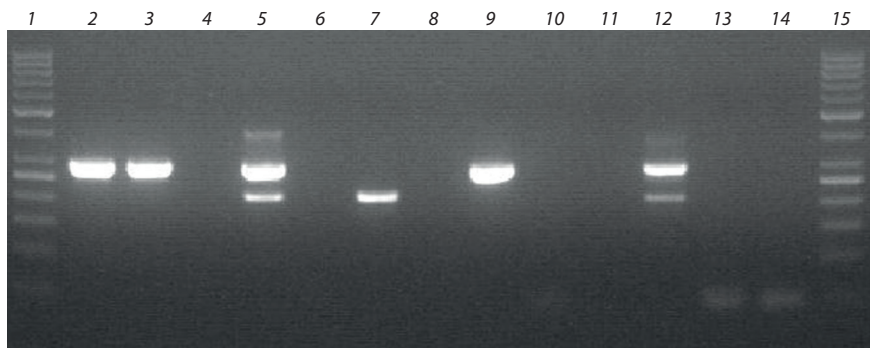


Fig. 6. Electrophoretic analysis of potato regenerated plants for the presence of chitinase and glucanase gene inserts.

Lane 1 and 15 – molecular weight marker (50 bp), lane 12 – positive control, lanes 13, 14 – negative controls, lanes 2–11 – test samples: 2, 3 and 9 – Aksor line carrying chitinase gene (DNA extracted from three plants of one line), 5 – Nevskiy line with chitinase and glucanase genes, 7 – Nevskiy line with glucanase insert, 4, 6, 8 – Aksor lines with no inserts, 10, 11 – Nevskiy lines with no inserts.

The screening of plants was performed after co-transformation. The resulting regenerated potato plants of both varieties were propagated microclonally *in vitro*. For each of the 56 transformed plants (lines), 10 test tube plants were obtained, which were used to perform polymerase chain reaction (PCR) for the presence of the target gene insert. Part of the leaf was cut from the plants for DNA isolation, and subsequently used for PCR with insert-specific primers.

The analysis of potato regenerants was carried out by PCR with specific primers. Since the introduced genes were also originally isolated from potatoes, the primers were designed in a special way: the forward sequence of the primer was annealing to the promoter part of the construct, and the reverse – with chitinase and glucanase genes, respectively, leading to two reaction products of 290 bp (chitinase gene) and 210 bp (glucanase gene).

Of the 56 potato regenerant plants, one plant carried an insert of the chitinase gene (Aksor variety, explant type – fresh internodes), one carried an insert of the glucanase gene (Nevskiy variety, fresh internodes), and four more were characterized by the presence of two genes (two belonged to Aksor variety, fresh internodes, one to Aksor variety, callus, and one to Nevskiy variety, callus). An example of the PCR confirmation results of the target genes' insertion is given in Figure 6.

Thus, the data of PCR analysis show that out of 862 explants of potato internodes and calli, only six plants were successfully transformed as the result of biolistic transformation; these plants carry either one or both inserts of the target chitinase and glucanase genes. Transformation efficiency was assessed by the number of viable regenerated plants relative to the number of explants subjected to biolistics (Table 3).

As seen from the data presented in Table 3, the average transformation efficiency for both varieties of potatoes was 0.7 %. At the same time, the maximum transformation efficiency was achieved using fresh internodes of the Aksor variety (0.96 %), and the minimum – with fresh internodes of the Nevskiy variety. It should be noted

Table 2. The number of potato regenerants on Selection Medium

Variety	Explant	Number of explants	Number of regenerants
Aksor	Internodes	312	17
	Callus	163	12
Nevskiy	Internodes	242	20
	Callus	145	7
Total		862	56

Table 3. The transformation efficiency of potato varieties Aksor and Nevskiy

Variety	Explant	Number of explants	Number of transformants	Efficiency of transformation, %
Aksor	Internodes	312	3	0.96
	Callus	163	1	0.61
Nevskiy	Internodes	242	1	0.41
	Callus	145	1	0.69
Total		862	6	0.70

that in experiments with Aksor potatoes, the minimum level of biolistics efficiency on calli taken as explants (0.61 %) slightly differs from the maximum value of transformation efficiency for the Nevskiy variety on internodes – 0.41 %, which indicates the difference in characteristics for each varieties of potatoes.

In experiments on the co-transformation of potatoes 4 out of 6 regenerant plants were co-transformed, which is 66.7 %. These results confirm the data of other authors on the high degree of joint integration of two separate genes of interest (Romano et al., 2001).

Discussion

This study was aimed to compare the effectiveness of the biolistic transformation using different explant types and depending on the potato genotype. At the same time, the low number of transformed plants does not let us draw solid conclusions. It is doubtless that for the biolistic transformation it is necessary to consider the individual characteristics of the potato variety and experimentally select a specific explant type. Moreover, even with a low number of transformants we can state that fresh internodes are best suited for transforming the Aksor variety, while embryogenic callus should be selected for the Nevskiy variety. This finding will be used in future works dedicated to biolistic transformation for potato crop breeding.

The average transformation efficiency was not very high (0.7 %), which corresponds with the findings of other authors. At the same time, it seems that some transformed embryogenic callus might be lost at the selection and regeneration stages, so adaptation of these procedures will help raise the efficiency index. One of the attempts to do so was done in the current work – we reflected on the concern of other authors that selection with kanamycin adversely influences the regenerants' appearance and took the lower limit of the selective agent's concentration – kanamycin was used at 20 mg/l, whereas in some sources up to 100 mg/l is recommended. This explains the high number of regenerants as opposed to the number of transformants. The decision on kanamycin's concentration was taken after the preliminary experiments on stable transformation (data not shown), in which no regenerants were obtained after the selection stage, while the experiments on transient transformation showed sufficient number of transformed cells (data not shown). Thus, further research is needed for the post-bombardment stage to make the transformation event more successful. Although kanamycin is one of the most used antibiotics for potato transformation, other selective agents should be explored, including such options as herbicide resis-

tance agents, which are also a valuable trait for crop breeding and will help in agricultural crop production.

The high co-transformation efficiency justifies the use of this method for introduction of several genes of interest in one shot. Further studies should be dedicated to introducing more than two genes at once for the evaluation of this approach's efficiency. Combined, the protocol of adapted selective/regeneration stage and biolistic technique with more than two genes of interest at once will provide potato crop breeding with valuable efficient and time-saving methods.

Conclusion

Despite the fact that agrobacterial transformation remains the most used method of introducing new genes into potato, the biolistic transformation method has certain advantages depending on the goals of the transformation. For example, with the help of bombardment, several genes can be introduced at once, and this can be done both as a single cassette and as co-transformation, the efficiency of which is quite high. This study showed high co-transformation efficiency of two independent genetic constructs, and will serve as a basis for further studies dedicated to introduction of more independent genetic constructs at once. Considering the insufficient number of published works on stable biolistic transformation of potatoes, we believe that data obtained in this study will make a certain contribution to the development of biolistic transformation technology of potatoes.

At the same time, the lines produced in the course of this work will be used to evaluate their resistance to fungal diseases, and, if successful, can be used in potato crop breeding for increased resistance to fungal diseases.

References

- Chirkin A.P., Zhidkeeva R.E., Ismagulova G.A. Cloning and analysis of basic class I chitinase and β -1,3-glucanase genes from potato induced by *Fusarium solani* infection. *Izvestiya Natsionalnoy Akademii Nauk Respubliki Kazakhstan = News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series Biol. Med.* 2016; 4(316):92-97. (in Russian)
- Craig W., Gargano D., Scotti N., Nguyen T.T., Lao N.T., Kavanagh T.A., Dix P.J., Cardi T. Direct gene transfer in potato: a comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Cell Rep.* 2005;24(10):603-611. DOI 10.1007/s00299-005-0018-0.
- Ercolano M.R., Ballvora A., Paal J., Steinbiss H.H., Salamini F., Gebhardt C. Functional complementation analysis in potato via biolistic transformation with BAC large DNA fragments. *Mol. Breed.* 2004; 13(1):15-22. DOI 10.1023/B:MOLB.0000012326.01128.5d.
- Jo K.-R., Kim C.-J., Kim S.-J., Kim T.-Y., Bergervoet M., Jongma M.A., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. Development of

- late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnol.* 2014;14(1):50. DOI 10.1186/1472-6750-14-50.
- Kisgyörgy B.N., Tamás C., Rákszegi M., Sági L., Láng L., Bedô Z. Regeneration ability of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryos after bombardment with a particle gun. *Acta Biol. Szeged.* 2008;52(1): 127-130.
- Mielby H., Sandoe P., Lassen J. The role of scientific knowledge in shaping public attitudes to GM technologies. *Public Underst. Sci.* Publ. online 2012. Publ. 2013;22(2):155-168. DOI 10.1177/0963662511430577.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15(3): 473-497.
- Nguyen T.T., Dix P.J., Nugent G.D. Transformation of potato via *Agrobacterium* coated microparticle bombardment. *Biol. Plant.* 2001; 54(1):141-144.
- Rivera A.L., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. Physical methods for genetic plant transformation. *Phys. Life Rev.* 2012;9(3): 308-345. DOI 10.1016/j.plrev.2012.06.002.
- Romano A., Raemakers K., Visser R., Mooibroek H. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 2001;20(3):198-204. DOI 10.1007/s002990000314.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor laboratory, 1989.
- Sanford B.J.C., Smith F.D., Russel J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Meth. Enzymol.* 1993;217: 483-509.
- Taylor N.J., Fauquet C.M. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biol.* 2002; 21(12):963-977. DOI 10.1089/104454902762053891.

ORCID ID

N.P. Malakhova orcid.org/0000-0001-5312-9674
G.A. Isakova orcid.org/0000-0002-1989-9031
D.A. Naizabayeva orcid.org/0000-0002-0606-4289
B.K. Tezekbaeva orcid.org/0000-0003-2313-9737
G.A. Ismagulova orcid.org/0000-0002-2735-4939
E.R. Maltseva orcid.org/0000-0001-9198-695X

Acknowledgements. This work was carried out as part of research project AR05136045 "Obtaining new wheat and potato lines based on a set of innovative approaches of genetic engineering and cell technology" of Subprogram 102 "Grant funding for research" in the priority area "Life and health sciences", and as part of research on the project "Development of biotechnology for producing potato forms with improved signs of resistance to late blight on the basis of cisgenic bio-ballistic transformation" in the framework of BR05236574 "Use of adaptive plant mechanisms in the development of modern technologies for producing crops resistant to stress factors" (O.0798).

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

Received June 11, 2020. Revised January 6, 2021. Accepted January 7, 2021.

Генетические аспекты устойчивости картофеля к фитофторозу

Т.С. Фролова^{1, 2}✉, В.А. Черенко^{1, 2}, О.И. Сеницына^{1, 2}, А.В. Кочетов^{1, 2}

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ frolova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Оомицет *Phytophthora infestans* Mont. de Bary – основной патоген сельскохозяйственных культур семейства Пасленовые, особенно картофеля (*Solanum tuberosum*). С учетом того, что картофель – четвертая культура в мире по масштабам выращивания, ежегодные потери от фитофтороза огромны. Исследования базовых механизмов взаимодействия между картофелем и возбудителем фитофтороза не только расширяют фундаментальные знания в этой области, но и открывают новые возможности для влияния на эти взаимодействия с целью повышения резистентности к патогену. Взаимодействие картофеля и возбудителя фитофтороза можно рассматривать с генетической точки зрения, причем интересно как ответ картофеля на процесс колонизации со стороны *P. infestans*, так и изменение активности генов у фитофторы при заражении растения. Можно исследовать этот процесс через изменение профиля вторичных метаболитов хозяина и патогена. Помимо фундаментальных исследований в этой области, не меньшее значение имеют и прикладные работы в виде создания новых препаратов для защиты картофеля. Представленный обзор кратко описывает основные этапы исследований устойчивости картофеля к фитофторозу, начиная с самых первых работ. Большое внимание уделяется ключевым моментам по изменению профиля вторичных метаболитов (фитоалексинов). Отдельный раздел посвящен описанию как качественных, так количественных признаков устойчивости картофеля к возбудителю фитофтороза: их вкладу в общую резистентность, картированию и возможности регуляции. Оба вида признаков важны для селекции картофеля: качественная устойчивость за счет *R*-генов быстро преодолевается патогеном, в то время как пирамидирование локусов количественных признаков способствует созданию высокоустойчивых сортов. Новейшие подходы молекулярной биологии дают возможность изучать и транскрипционные профили, что позволяет посмотреть на взаимодействие картофеля и возбудителя фитофтороза. Показано, что процесс колонизации картофеля отражается не только на активности различных генов и профиле вторичных метаболитов, выявлены также белки-маркеры ответа на заражение со стороны картофеля – это патоген-зависимые белки и пластидная углекислая ангидраза. Маркерами заражения от *P. infestans* были белки грибной целлюлозо-синтазы и гаусторий-специфический мембранный белок. В данном обзоре приведена информация по наиболее актуальным комплексным исследованиям генетических механизмов устойчивости картофеля к фитофторозу. Ключевые слова: *Phytophthora infestans*; *Solanum tuberosum*; фитофтороз; резистентность; *R*-гены; локусы количественных признаков; вторичные метаболиты.

Для цитирования: Фролова Т.С., Черенко В.А., Сеницына О.И., Кочетов А.В. Генетические аспекты устойчивости картофеля к фитофторозу. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(2):164-170. DOI 10.18699/VJ21.020

Genetic aspects of potato resistance to phytophthorosis

T.S. Frolova^{1, 2}✉, V.A. Cherenko^{1, 2}, O.I. Sinitsyna^{1, 2}, A.V. Kochetov^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ frolova@bionet.nsc.ru

Abstract. *Phytophthora infestans* Mont. de Bary is the main oomycete pathogen of cultivated crops in the family Solanaceae, especially potato (*Solanum tuberosum*). Because potato is the fourth most cultivated crop worldwide, its annual losses from late blight are tremendous. Studies of the basic mechanisms of interaction between potato and the late blight pathogen not only expand the fundamental knowledge in this area, but also open up new possibilities for regulating these interactions in order to increase resistance to the pathogen. The interaction of potato and the late blight pathogen can be considered from a genetic point of view, and it is interesting to consider both the response of the potato to the colonization process by *P. infestans* and the change in gene activity in late blight during plant infection. We can also investigate this process by changing the profile of secondary metabolites of the host and the pathogen. In addition to fundamental work in this area, applied work in the form of the development of new preparations for protecting potatoes is of no less importance. This review briefly describes the main stages of studies of potato resistance to late blight, starting almost from the first works. Much attention is paid to key works on changing the profile of secondary metabolites phytoalexins. A separate section is devoted to the description of both qualitative and quantitative characteristics of potato resistance to the late blight pathogen: their contribution to overall resistance, gene mapping, and

regulation capabilities. Both types of traits are important for potato breeding: quantitative resistance due to *R*-genes is quickly overcome by the pathogen, while quantitative trait loci make it possible to create varieties with almost absolute resistance due to the pyramid of effective genes. The latest approaches in molecular biology make it possible to study translatomic profiles, which makes it possible to look at the interaction of potatoes and the late blight pathogen at a different angle. It has been shown that the process of potato colonization affects not only the activity of various genes and the profile of secondary metabolites: proteins-markers of the response to infection from potatoes have also been identified: they are pathogen-bound proteins and plastid carbonic anhydrase. On the part of *P. infestans*, fungal cellulose synthase proteins and haustorium-specific membrane protein were markers of infection. Thus, the review contains information on the most relevant complex studies of the genetic mechanisms of potato resistance to late blight.

Key words: *Phytophthora infestans*; *Solanum tuberosum*; late blight; resistance; *R*-genes; quantitative trait loci; secondary metabolites.

For citation: Frolova T.S., Cherenko V.A., Sinitsyna O.I., Kochetov A.V. Genetic aspects of potato resistance to phytophthorosis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):164–170. DOI 10.18699/VJ21.020 (in Russian)

Введение

Картофель, или паслен клубненосный (*Solanum tuberosum* L.), был одомашнен около 7000–10000 лет назад на территории современного Южного Перу. В Европу картофель был завезен испанцами относительно недавно, во второй половине XVI в. С тех пор он стал одной из основных сельскохозяйственных культур, занимая по масштабам выращивания четвертое место после кукурузы, пшеницы и ржи. В связи с большими объемами возделывания весьма существенными являются потери урожая из-за различных патогенов, основной из которых – возбудитель фитофтороза (*Phytophthora infestans*), способного полностью уничтожить растения спустя несколько дней после появления первых симптомов заражения. Поэтому изучение механизмов взаимодействия картофеля и возбудителя фитофтороза на молекулярном и генетическом уровнях очень важны для создания новых подходов для повышения резистентности картофеля.

Первые труды, посвященные взаимодействию *S. tuberosum* и *P. infestans*, относятся к концу 1960-х гг. (Ingram, Robertson, 1965; Ingram, 1967; Robertson et al., 1968). В работах проводили сравнение восприимчивого (Majestic) и устойчивого (Orion) к возбудителю фитофтороза сортов картофеля. Ранее было показано, что гены устойчивости (*R*-гены) экспрессируются только во фрагментах ткани толщиной более 10 клеток (Tomiyama et al., 1958), поэтому исследование осуществляли на клеточных культурах и тканевых агрегатах. Было сделано два ключевых вывода: 1) в тканях обоих сортов содержатся вещества, стимулирующие рост возбудителя фитофтороза, т. е. они являются нормальными метаболитами живых тканей, а не образуются в ответ на заражение; 2) тканевые агрегаты сорта Orion тормозили развитие возбудителя фитофтороза, но после заморозки и, как следствие, разрушения тканей это свойство пропадало. Таким образом, был сделан вывод, что резистентность – это свойство живых тканей, способных реагировать на патоген (Ingram, Robertson, 1965). В дальнейшем было установлено, что картофель сорта Orion может быстро развивать постинфекционную токсичность, тормозящую рост зародышевых трубок *P. infestans*, тем самым предотвращая инфицирование. Ключевая роль в развитии этого ответа отводится *R*-гену (Ingram, 1967).

Соединения, обуславливающие устойчивость растений к патогенам, ранее были названы фитоалексинами (Müller, Behr, 1949). В предыдущих исследованиях высказывалось

предположение, что именно они нарабатываются в тканях в ответ на инфицирование, что и приводит к ингибированию патогенов. Позднее была опубликована статья, свидетельствующая о накоплении фенольных соединений в токсичных для фитофторы фракциях (Robertson et al., 1968): салициловой, *n*-гидроксibenзойной и ванилиновой кислот. Авторы высказывают предположение, что система устойчивости, основанная на *R*-гене, может быть связана с постинфекционной индукцией синтеза фитоалексинов. Примерно в это же время были описаны фитоалексины сесквитерпеноидной структуры: ришитин, любимин, фитуберин и солаветивон, выделенные из зараженных клубней картофеля (Katsui et al., 1968; Kuć, 1982; Kuć, Rush, 1985).

Спустя почти 20 лет было издано подробное исследование временного накопления ришитина как наиболее показательного маркера иммунного ответа в клубнях резистентных и восприимчивых сортов в ответ на заражение *P. infestans* (Rohwer et al., 1987). Обнаружено, что ришитин и некоторые его структурно родственные производные (любимин) быстро накапливались в клубнях при несовместимых взаимодействиях картофеля и фитофторы и достаточно медленно – у совместимых, в листьях подобный ответ отсутствовал. Сделан вывод, что сесквитерпены могут быть полезны в развитии иммунного ответа, но не являются обязательными компонентами устойчивости.

Интересная работа была проведена по приданию устойчивости картофеля к *P. infestans* через создание соматических и половых гибридов культивируемого *S. tuberosum* с диким подвидом *S. circaefolium* Bitter, устойчивость которого к возбудителю фитофтороза – весьма привлекательный признак для включения в генофонд культурного картофеля. Путем слияния клеток были получены тетраплоидные гибридные каллусы (Mattheij et al., 1992), а растения из них обладали полной устойчивостью к *P. infestans*. Исследователи сравнили содержание гликоалкалоидов у родительских растений и гибридов и обнаружили повышенное содержание томатыдин гликозида, позаимствованное гибридом от дикого *S. circaefolium*. Кроме того, был обнаружен новый гликозид демиссидин, не найденный ни у одного из родителей. Отмечаются фертильность полученных женских растений и возможность их скрещивания с культивируемым *S. tuberosum* для закрепления приобретенной устойчивости. Этой же группой исследователей были созданы половые гибриды

S. tuberosum и *S. circaefolium* (Louwes et al., 1992). Среди гибридов наблюдались преимущественно триплоидные растения (83 %), несущие двойной геном *S. circaefolium*, что делает их более устойчивыми к патогену и, как следствие, более перспективными для использования в селекции. Половые гибриды также обладали повышенным содержанием томатидин гликозида и демиссидин гликозидом, не обнаруженным у родительских растений.

Картирование признаков устойчивости в геноме *S. tuberosum*

Качественные признаки, обусловленные *R*-генами

В начале XXI в. развитие компьютерных технологий и статистических методов дало возможность проводить более масштабный анализ групп сцепления, выявлять локусы с генами количественных признаков и строить для них карты сцепления. Были созданы карты сцепления для диплоидного картофеля, согласно которым локусы качественной устойчивости к возбудителю фитофтороза располагаются практически в каждой хромосоме, а на хромосомах III, IV, V и VI были сцеплены с поздней спелостью (Gebhardt, Valkonen, 2001; Simko, 2002). Позднее подобные результаты были получены и для тетраплоидного картофеля (Bradshaw et al., 2004) при скрещивании устойчивого (Stirling) и восприимчивого сортов. Среди множества групп сцепления обнаружен перспективный локус в хромосоме IV, который не сцеплен с поздней спелостью клубней. У устойчивого родительского растения *R*-ген, переданный потомству, был картирован в хромосоме XI.

Несмотря на обилие работ, посвященных картированию *R*-генов в геноме картофеля (Ballvora et al., 2002; Van Der Vossen et al., 2003; Park et al., 2005; Restrepo et al., 2005; Bradshaw et al., 2006a, b; Solomon-Blackburn et al., 2007; Brugmans et al., 2008; Tan et al., 2008; Rauscher et al., 2010), следует отметить, что устойчивость к возбудителю фитофтороза сортов картофеля на основании *R*-генов сохраняется на протяжении 5–10 лет, после чего сорт становится восприимчивым к новым расам *P. infestans* (Stewart et al., 2003). Распознавание патогена *R*-геном довольно быстро нивелируется мутациями в соответствующем гене авирулентности *P. infestans*, что позволяет патогену успешно проникать и колонизировать растение-хозяина при совместимом взаимодействии (Poland et al., 2009).

Биоинформатические методы были использованы и для изучения механизмов восприимчивости. Показано, что карбоангидраза – фермент, обратимо конвертирующий диоксид углерода в бикарбонат, может играть большую роль во время несовместимых взаимодействий между патогеном и хозяином (Restrepo et al., 2005). С помощью ДНК-микрочипов было исследовано временное изменение экспрессии *R*-генов: в первые часы после заражения (6–12 ч) в целом наблюдалась индукция экспрессии, но спустя некоторое время (48–72 ч) большая часть генов подверглась репрессии. Интересным выглядит подавление жасмонатного пути при восприимчивых взаимодействиях. Однако при заражении в основном подавляются гены, связанные с фотосинтезом: так, наиболее выраженное подавление обнаружено для пластидной карбоангидразы,

которая обладает антиоксидантной активностью и способностью связывать салициловую кислоту (Slaymaker et al., 2002). В первые 12 ч наблюдалось существенное усиление экспрессии карбоангидразы при несовместимых взаимодействиях, тогда как через 24 или 48 ч ее следы едва обнаруживались, что позволяло однозначно отличать устойчивые формы. Значительная роль салициловой кислоты именно в раннем ответе *S. tuberosum* на инфицирование была продемонстрирована с помощью трансгенных NahG растений, которые не способны накапливать салициловую кислоту, их восприимчивость к *P. infestans* была гораздо выше, чем у дикой формы. Однако предварительная обработка растений препаратом салициловой кислоты практически уравнивала вероятность заражения (Halim et al., 2007).

Помимо единичных доминантных *R*-генов устойчивости, отвечающих за распознавание соответствующего гена авирулентности *P. infestans* и запускающих защитный ответ, проявляющийся в локальной гибели клеток (реакция сверхчувствительности) и тем самым останавливающий рост патогенных микроорганизмов, у растений существует группа генов с другим механизмом защиты – гены множественной устойчивости. Исследована экспрессия четырех генов-транспортеров у картофеля, транскрипция которых регулировалась различными препаратами (Ruocco et al., 2011). Среди них были выявлены и те, экспрессия которых существенно возрастает при заражении *P. infestans*, – гены *StPDR1* и *StPDR2* экспрессировались активнее в 13 и 37 раз соответственно спустя 18 ч после заражения. Авторы полагают, что все исследованные ими гены (*StPDR1–4*) являются частью более сложного системного ответа растения на биотические и абиотические факторы.

Локусы количественных признаков у *S. tuberosum*

Масштабная попытка картирования локусов количественных признаков у картофеля была предпринята в 2018 г. (Santa et al., 2018). Исследователи снова выбрали в качестве объекта тетраплоидный геном картофеля, отмечая его высокую важность для селекции и при этом существенные затруднения в силу высокой гетерозиготности у автотетраплоидного картофеля. Ученым удалось обнаружить два новых QTL на хромосомах III и VIII. Отмечается, что один из аллелей первого локуса может опосредовать в среднем более высокую степень тяжести заболевания. Этот локус также включает транскрипционный фактор Arf2, связанный со старением листьев, вызванный окислительным стрессом у *Arabidopsis* и передачей сигналов гиббереллина и брассиностероидных путей при взаимодействии растения с патогеном (Vert et al., 2008; Lim et al., 2010; Koch et al., 2016). Аллель, определяющий в среднем более низкую степень тяжести заболевания, содержал QTL хромосомы VIII. Этот маркер связан с геном, который кодирует фактор транскрипции спираль-петля-спираль (bHLH) JAF13, участвующий в биосинтезе флавоноидов у *Petunia × hybrida* (Quattrocchio et al., 2006).

Были получены трансгенные растения со сверхэкспрессией гена редуктазы D-галактуроновой кислоты и повышенным уровнем L-аскорбата (Chung et al., 2019). После заражения размер некротических пятен у трансгенных растений был меньше, чем в контрольной груп-

пе, при этом обнаружено увеличение экспрессии генов, участвующих в антиоксидантной активности. В результате выявлено снижение активных форм кислорода (АФК) в клетках, что может объяснять меньший размер некротического пятна за счет уменьшения ответа реакции сверхчувствительности, индуцируемого АФК. В целом отмечалась большая устойчивость трансгенных растений к возбудителю фитофтороза, однако полной устойчивости не наблюдалось. L-аскорбат снизил содержание абсцизовой кислоты и увеличил содержание гибберелиновой кислоты. Но при этом установлена существенная потеря в урожайности картофеля, которая все же превышала урожай от зараженного.

Транскриптомный анализ для совместимых и несовместимых взаимодействий *P. infestans* и *S. tuberosum*

В 2012 г. впервые выполнен транскриптомный анализ для совместимых и несовместимых взаимодействий *P. infestans* и *S. tuberosum* (Gyvetvai et al., 2012). Исследовано пять изогенных линий, которые различались только наличием и отсутствием *R*-гена (*RI*), с целью исключить влияние генетического фона на транскриптом. Однако оказалось, что изменения транскриптома между растениями одной линии отличаются больше, чем средние транскриптомы линий между собой, что указывает на значительное влияние как индивидуальных физиологических параметров, так и факторов окружающей среды в процессе защитной реакции. Одним из них может быть движение во времени и пространстве защитных сигналов от места первоначального физического контакта между зооспорами *P. infestans* и клетками-хозяевами и соседними клетками. Анализ DeepSAGE позволил выявить некоторые интересные аспекты общей структуры транскриптома. Две трети (68 %) унитаров были экспрессированы на низких уровнях (< 10 CPM) в ткани листьев, из которых одна треть (36 %) не соответствовала ни одному из известных транскриптов картофеля, что может быть объяснено немодельным объектом и немногочисленными данными о транскриптоме *S. tuberosum*. С другой стороны, только 3 % унитаров показали среднюю экспрессию выше 100 CPM, но составили 32 % от общего транскриптома. Из очень частых транскриптов только 14 % были не известны. Нужно отметить следующие транскрипты из этого исследования:

1. Наиболее частый тег (StET008016) соответствует унигену *TC208859*, аннотированному как белок клеточной стенки – экспрессия этого гена составляла 4 % всех транскриптов в тканях листьев. Белки этого семейства выполняют функцию каркаса в качестве агглютинирующих агентов для отложения компонентов клеточной стенки (Mangeon et al., 2010). Обнаружено также их участие в защитной реакции растений против бактерий и грибов (Park et al., 2000; Fu et al., 2007).
2. Через один день после инокуляции транскрипт StET009643, соответствующий гену трансацетилазы ToTAL2 (*TC196885*), специфически и временно повышался во время несовместимых взаимодействий. Трансацетилазы (EC 2.2.1.2) катализируют образование одного из предшественников шикимовой кислоты, который участвует в образовании фенилпропаноидов,

алкалоидов и растительных гормонов ауксина и салициловой кислоты – важного компонента системы защиты растения.

3. Через три дня после инфицирования транскрипт StET010841, соответствующий гену фибриллина 8 (*TC207935*), был строго и специфически репрессирован. Растительные фибриллины представляют собой структурные липид-ассоциированные белки, расположенные в тилакоидных мембранах, которые, по-видимому, играют роль в реакциях биотического и абиотического стресса, роста и развития и в гормональной сигнализации.
4. Снижается уровень транскриптов карбоангидразы, что может быть использовано для повышения устойчивости к *P. infestans* (унигены *TC209461*, *TC218724* или *TC221870* аннотированы как карбоангидразы).

В работе показано, что изменения транскрипции во время инфекции в совместимых взаимодействиях были более выраженными, чем в несовместимых. Число последовательностей-мишеней, однако, было одинаковым: 240 и 220 для несовместимых и совместимых взаимодействий соответственно. В целом транскриптомы несовместимых и совместимых взаимодействий показали больше различий, чем общности. Несовместимое взаимодействие приводит к запрограммированной гибели небольшого числа клеток в месте первичного контакта с патогеном. Транскриптом этих клеток может претерпеть значительные изменения, тогда как отобранные соседние ткани остаются относительно нетронутыми. Наблюдаемые изменения могут быть причинами или следствиями сигналов системной приобретенной резистентности.

Таким образом, через некоторое время интерес к *R*-генам как перспективным для селекции кандидатам существенно уменьшился, устойчивость за счет них достаточно быстро сводилась к нулю новыми расами возбудителя фитофтороза. Вместо поиска основного гена исследователи перешли к мнению, что резистентность более перспективно рассматривать как полигенный и, как следствие, количественный признак. Поэтому вектор исследований изменился на поиск новых генов-кандидатов и их картирования для эффективного сочетания аллелей повышенной резистентности в улучшенных сортах. Постулируется, что для преодоления полигенной устойчивости картофеля требуется большее число мутаций в генах авирулентности возбудителя.

При использовании SNP-маркеров были выявлены следующие гены: гены липоксигеназы (жасмонатный путь), 3-гидрокси-3-метил-глутарил-коэнзим А редуктаза (мевапонатный путь) и цитохром р450 (терпеновый биосинтез) (Mosquera et al., 2016).

С учетом предыдущих исследований (Pajerowska-Mukhtar et al., 2009; Odeny et al., 2010; Mukhtar et al., 2015) суммарно выявлено 10 наиболее подходящих локусов для применения в качестве диагностических маркеров в селекционных программах. Эти гены кодируют ферменты, функционирующие в жасмонатном и оксипиноновом путях (*StAOS2*, *Plox1*), в биосинтезе липидов (*BCCP*, биотинкарбоксильный белок-носитель) и вторичных терпеновых метаболитов (*HMGCR*, *CYP71D11*). Есть гены с неизвестной функцией (*StGP28*) или функцией распозна-

вания патогенов (*Rpi-vnt1*) и транскрипционной регуляции (*TEF1*, *C3HL-TF*, *RBP50*). Их важность как генов-кандидатов для придания устойчивости в селекции важна для (1) непосредственного участия в контроле количественной устойчивости к возбудителю фитофтороза, которая не изменяется при поздней зрелости растений, (2) дальнейшей функциональной характеристики и (3) подтверждения диагностической способности в различных селекционных популяциях и средах.

Изопрен синтезируется в растениях двумя путями: ацетат/мевалонатным и дезоксиксилозафосфат/метилэритритфосфатным. Ген-участник резистентности 1-дезоксид-ксилозо-5-фосфат синтазы 1 (*StDXS1*) был обнаружен во втором пути (Henriquez et al., 2016). Его экспрессия изменяется в ответ на заражение и коррелирует с накоплением 1-дезоксид-ксилозо-5-фосфат синтазы – фермента, катализирующего начальную стадию 2-С-метил-Д-эритрит-4-фосфатного пути (*DOXP-MEP*), участвующего в биосинтезе изопrenoидов, необходимых для мембран хлоропластов. Изопrenoиды также нужны для синтеза каротиноидов и хлорофилла, абсцизовой и гибберелиновой кислот, содержание которых, соответственно, увеличивается при увеличении экспрессии *StDXS1*.

Еще одна временная динамика при заражении была получена для гена *StPOTHR1* с использованием трансгенных растений, где целевой ген был выключен за счет РНК интерференции (Chen et al., 2018). Белковый продукт гена *StPOTHR1* локализуется на плазматической мембране клеток и существенно уменьшает степень колонизации, причем его сверхэкспрессия усиливает резистентность, экспрессироваться этот ген начинает после заражения в устойчивых сортах.

Исследование посттрансляционных модификаций (SUMO) в процессе заражения картофеля возбудителем фитофтороза

Сумоилирование – один из типов посттрансляционной модификации белков в клетке, реализуемой за счет небольшого (~100 аминокислотных остатков) белка SUMO (small ubiquitin-related modifier), способного ковалентно присоединяться к мишени, подобно убиквитинилированию, однако не приводящему к деградации субстрата.

Инвазивные растительные патогены развили возможность модифицировать метаболизм своего хозяина, стимулируя метаболические процессы, которые способствуют росту патогена (Colignon et al., 2017). Действительно, было обнаружено, что во время процесса заражения содержание большинства известных конъюгатов SUMO *S. tuberosum* значительно изменяется, некоторые уменьшаются, но многие существенно увеличиваются. Выявлены белки-маркеры ответа на заражение со стороны картофеля – это патоген-связанные белки (PR1) и вышеупомянутая пластидная карбоангидраза (СА). Маркерами от *P. infestans* заражения были белки грибной целлюлозо-синтазы (CesA3) (Grenville-Briggs et al., 2008) и гаусторий-специфический мембранный белок (PiHmp1) (Avrova et al., 2008). Синтез белка PR1 стимулируется салициловой кислотой, способность поддерживать его в высокой концентрации после заражения отличает резистентные растения (Eschen-Lippold et al., 2012). Роль СА все еще остается

неясной, однако разница в уровне СА также позволяет различить устойчивые и не устойчивые к возбудителю фитофтороза сорта (Restrepo et al., 2005). Гены белковых маркеров *P. infestans* сначала активно экспрессировались как в устойчивых, так и в неустойчивых сортах, но при несовместимом взаимодействии их активность начинала снижаться через 24 ч после заражения. Таким образом, получены доказательства, что в восприимчивых сортах картофеля патогену удается ингибировать защитные механизмы растения и успешно инфицировать растения, в то время как в устойчивых сортах такое явление не наблюдалось.

Заключение

В настоящее время генетических исследований защитных реакций со стороны картофеля существенно больше, чем вирулентности со стороны *P. infestans*, и основная их часть направлена на поиск и картирование локусов количественных признаков, отвечающих за резистентность. На заре исследований наибольший интерес вызывали R-гены, одного аллеля которых часто было достаточно для устойчивости к возбудителю фитофтороза. Таким образом, резистентность рассматривалась преимущественно как качественный признак. Позже выяснилось, что созданные сорта невыгодны с экономической точки зрения – *P. infestans* легко преодолевает моногенную устойчивость за счет особенностей строения своего генома. Это обстоятельство заставило пересмотреть взгляды и перейти к оценке резистентности как к признаку количественному, поэтому встал вопрос о поиске локусов количественных признаков, которые могут быть перспективны для селекции. В процессе исследования установлено, что у культурного картофеля основные локусы, дающие резистентность, часто сцеплены с негативными для продуктивности растений качествами, например с поздней зрелостью клубней. Поэтому поиск новых локусов по-прежнему остается актуальной задачей.

Несмотря на большой прогресс в понимании механизмов устойчивости и способности предсказывать вспышки фитофтороза, пандемические вспышки с колоссальным уроном все еще случаются в разных странах (Fry et al., 2013; Chowdappa et al., 2015), что свидетельствует о недостаточности полученных знаний для эффективной защиты сельскохозяйственных растений и необходимости новых исследований в этом направлении.

Список литературы / References

- Avrova A.O., Boevink P.C., Young V., Grenville-Briggs L.J., van West P., Birch P.R., Whisson S.C. A novel *Phytophthora infestans* haustorium-specific membrane protein is required for infection of potato. *Cell Microbiol.* 2008;10(11):2271-2284. DOI 10.1111/j.1462-5822.2008.01206.x.
- Ballvora A., Ercolano M.R., Weiss J., Meksem K., Bormann C.A., Oberhagemann P., Salamini F., Gebhardt C. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J.* 2002; 30(3):361-371. DOI 10.1046/j.1365-3113.2001.01292.x.
- Bradshaw J.E., Bryan G.J., Lees A.K., McLean K., Solomon-Blackburn R.M. Mapping the *R10* and *R11* genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) present in the potato (*Solanum tuberosum*) R-gene differentials of Black. *Theor. Appl. Genet.* 2006a; 112(4):744-751. DOI 10.1007/s00122-005-0179-9.

- Bradshaw J.E., Hackett C.A., Lowe R., McLean K., Stewart H.E., Tierney L., Vilaro M.D., Bryan G.J. Detection of a quantitative trait locus for both foliage and tuber resistance to late blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] on chromosome 4 of a dihaploid potato clone (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* 2006b;113(5):943-951. DOI 10.1007/s00122-006-0353-8.
- Bradshaw J.E., Pande B., Bryan G.J., Hackett C.A., McLean K., Stewart H.E., Waugh R. Interval mapping of quantitative trait loci for resistance to late blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary], height and maturity in a tetraploid population of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Genetics.* 2004;168(2):983-995. DOI 10.1534/genetics.104.030056.
- Brugmans B., Wouters D., van Os H., Hutten R., van der Linden G., Visser R.G., van Eck H.J., van der Vossen E.A. Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS profiling. *Theor. Appl. Genet.* 2008;117(8):1379-1388. DOI 10.1007/s00122-008-0871-7.
- Chen Q., Tian Z., Jiang R., Zheng X., Xie C., Liu J. *StPOTHR1*, a NDR1/HIN1-like gene in *Solanum tuberosum*, enhances resistance against *Phytophthora infestans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;496(4):1155-1161. DOI 10.1016/j.bbrc.2018.01.162.
- Chowdappa P., Nirmal Kumar B.J., Madhura S., Mohan Kumar S.P., Myers K.L., Fry W.E., Cooke D.E.L. Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in South India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. *Plant Pathol.* 2015;64:191-199. DOI 10.1111/ppa.12228.
- Chung I.M., Venkidasamy B., Upadhyaya C.P., Packiaraj G., Rajakumar G., Thiruvengadam M. Alleviation of *Phytophthora infestans* mediated necrotic stress in the transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) with enhanced ascorbic acid accumulation. *Plants (Basel).* 2019;8(10):365. DOI 10.3390/plants8100365.
- Colignon B., Dieu M., Demazy C., Delaive E., Muhovski Y., Raes M., Mauro S. Proteomic Study of SUMOylation during *Solanum tuberosum*–*Phytophthora infestans* interactions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2017;30(11):855-865. DOI 10.1094/MPMI-05-17-0104-R.
- Eschen-Lippold L., Landgraf R., Smolka U., Schulze S., Heilmann M., Heilmann I., Hause G., Rosahl S. Activation of defense against *Phytophthora infestans* in potato by down-regulation of syntaxin gene expression. *New Phytol.* 2012;193(4):985-996. DOI 10.1111/j.1469-8137.2011.04024.x.
- Fry W.E., McGrath M.T., Seaman A., Zitter T.A., McLeod A., Danies G., Small I.M., Myers K., Everts K., Gevens A.J., Gugino B.K., Johnson S.B., Judelson H., Ristaino J., Roberts P., Secor G., Seebold K.J., Snover-Clift K., Wyenandt A., Grünwald N.J., Smart C.D. The 2009 late blight pandemic in the eastern United States – causes and results. *Plant Dis.* 2013;97(3):296-306. DOI 10.1094/PDIS-08-12-0791-FE.
- Fu Z.Q., Guo M., Jeong B.R., Tian F., Elthon T.E., Cerny R.L., Staiger D., Alfano J.R. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature.* 2007;447(7142):284-288. DOI 10.1038/nature05737.
- Gebhardt C., Valkonen J.P. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2001;39:79-102. DOI 10.1146/annurev.phyto.39.1.79.
- Grenville-Briggs L.J., Anderson V.L., Fugelstad J., Avrova A.O., Bouzenzana J., Williams A., Wawra S., Whisson S.C., Birch P.R., Bulone V., van West P. Cellulose synthesis in *Phytophthora infestans* is required for normal appressorium formation and successful infection of potato. *Plant Cell.* 2008;20(3):720-738. DOI 10.1105/tpc.107.052043.
- Gyertvai G., Sønderkær M., Göbel U., Basekow R., Ballvora A., Imhoff M., Kersten B., Nielsen K.L., Gebhardt C. The transcriptome of compatible and incompatible interactions of potato (*Solanum tuberosum*) with *Phytophthora infestans* revealed by DeepSAGE analysis. *PLoS One.* 2012;7(2):e31526. DOI 10.1371/journal.pone.0031526.
- Halim V.A., Eschen-Lippold L., Altmann S., Birschwilks M., Scheel D., Rosahl S. Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2007;20(11):1346-1352. DOI 10.1094/MPMI-20-11-1346.
- Henriquez M.A., Soliman A., Li G., Hannoufa A., Ayele B.T., Daayf F. Molecular cloning, functional characterization and expression of potato (*Solanum tuberosum*) 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase 1 (StDXS1) in response to *Phytophthora infestans*. *Plant Sci.* 2016;243:71-83. DOI 10.1016/j.plantsci.2015.12.001.
- Ingram D.S. The expression of *R*-gene resistance to *Phytophthora infestans* in tissue cultures of *Solanum tuberosum*. *J. Gen. Microbiol.* 1967;49(1):99-108. DOI 10.1099/00221287-49-1-99.
- Ingram D.S., Robertson N.F. Interaction between *Phytophthora infestans* and tissue cultures of *Solanum tuberosum*. *J. Gen. Microbiol.* 1965;40(3):431-437. DOI 10.1099/00221287-40-3-431.
- Katsui N., Murai A., Takasugi M., Imaizumi K., Masamune T., Tomiyama K. The structure of rishitin, a new antifungal compound from diseased potato tubers. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1968;1:43-44. DOI 10.1039/C19680000043.
- Koch A., Biedenkopf D., Furch A., Weber L., Rossbach O., Abdelatef E., Linicus L., Johannsmeier J., Jelonek L., Goesmann A., Cardoza V., McMillan J., Mentzel T., Kogel K.H. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS Pathog.* 2016;12(10). DOI 10.1371/journal.ppat.1005901.
- Kuč J. Phytoalexins from the Solanaceae. In: Bailey J.A., Mansfield J.W. (Eds.). *Phytoalexins*. Blackie; Glasgow; London, 1982; 81-105.
- Kuč J., Rush J.S. Phytoalexins. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985;236(2):455-472. DOI 10.1016/0003-9861(85)90648-4.
- Lim P.O., Lee I.C., Kim J., Kim H.J., Ryu J.S., Woo H.R., Nam H.G. Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J. Exp. Bot.* 2010;61(5):1419-1430. DOI 10.1093/jxb/erq010.
- Louwes K.M., Hoekstra R., Mattheij W.M. Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *S. circaefolium* subsp. *circaefolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens: 2. Sexual hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 1992;84(3-4):362-370. DOI 10.1007/BF00229495.
- Mangeon A., Junqueira R.M., Sachetto-Martins G. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav.* 2010;5(2):99-104. DOI 10.4161/psb.5.2.10336.
- Mattheij W.M., Eijlander R., de Koning J.R., Louwes K.M. Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *S. circaefolium* subsp. *circaefolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens: 1. Somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 1992;83(4):459-466. DOI 10.1007/BF00226534.
- Mosquera T., Alvarez M.F., Jiménez-Gómez J.M., Muktar M.S., Paulo M.J., Steinemann S., Li J., Draffehn A., Hofmann A., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H.R., Walkemeier B., Gebhardt C. Targeted and untargeted approaches unravel novel candidate genes and diagnostic SNPs for quantitative resistance of the potato (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans* causing the late blight disease. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156254. DOI 10.1371/journal.pone.0156254.
- Muktar M.S., Lübeck J., Strahwald J., Gebhardt C. Selection and validation of potato candidate genes for maturity corrected resistance to *Phytophthora infestans* based on differential expression combined with SNP association and linkage mapping. *Front Genet.* 2015;6:294. DOI 10.3389/fgene.2015.00294.
- Müller K.O., Behr L. Mechanism of *Phytophthora*-resistance of potatoes. *Nature.* 1949;163(4143):498-499. DOI 10.1038/163498a0.
- Odeny D.A., Stich B., Gebhardt C. Physical organization of mixed protease inhibitor gene clusters, coordinated expression and association

- with resistance to late blight at the *StKI* locus on potato chromosome III. *Plant Cell Environ.* 2010;33(12):2149-2161. DOI 10.1111/j.1365-3040.2010.02213.x.
- Pajeroska-Mukhtar K., Stich B., Achenbach U., Ballvora A., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H.R., Ilarionova E., Bellin D., Walkemeier B., Basekow R., Kersten B., Gebhardt C. Single nucleotide polymorphisms in the allene oxide synthase 2 gene are associated with field resistance to late blight in populations of tetraploid potato cultivars. *Genetics*. 2009;181(3):1115-1127. DOI 10.1534/genetics.108.094268.
- Park C.J., Park C.B., Hong S.S., Lee H.S., Lee S.Y., Kim S.C. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant Mol. Biol.* 2000;44(2):187-197. DOI 10.1023/a:1006431320677.
- Park T.H., Vleeshouwers V.G., Huigen D.J., van der Vossen E.A., van Eck H.J., Visser R.G. Characterization and high-resolution mapping of a late blight resistance locus similar to *R2* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(3):591-597. DOI 10.1007/s00122-005-2050-4.
- Poland J.A., Balint-Kurti P.J., Wisser R.J., Pratt R.C., Nelson R.J. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci.* 2009;14(1):21-29. DOI 10.1016/j.tplants.2008.10.006.
- Quattrocchio F., Verweij W., Kroon A., Spelt C., Mol J., Koes R. PH4 of *Petunia* is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *Plant Cell.* 2006;18(5):1274-1291. DOI 10.1105/tpc.105.034041.
- Rauscher G., Simko I., Mayton H., Bonierbale M., Smart C.D., Grünwald N.J., Greenland A., Fry W.E. Quantitative resistance to late blight from *Solanum berthaultii* cosegregates with *R(Pi-ber)*: insights in stability through isolates and environment. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121(8):1553-1567. DOI 10.1007/s00122-010-1410-x.
- Restrepo S., Myers K.L., del Pozo O., Martin G.B., Hart A.L., Buell C.R., Fry W.E., Smart C.D. Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2005;18(9):913-922. DOI 10.1094/MPMI-18-0913.
- Robertson N.F., Friend J., Aveyard M., Brown J., Huffee M., Homans A.L. The accumulation of phenolic acids in tissue culture pathogen combinations of *Solanum tuberosum* and *Phytophthora infestans*. *J. Gen. Microbiol.* 1968;54(2):261-268. DOI 10.1099/00221287-54-2-261.
- Rohwer F., Fritzemeier K.H., Scheel D., Hahlbrock K. Biochemical reactions of different tissues of potato (*Solanum tuberosum*) to zoospores or elicitors from *Phytophthora infestans*: Accumulation of sesquiterpenoid phytoalexins. *Planta.* 1987;170(4):556-561. DOI 10.1007/BF00402991.
- Ruocco M., Ambrosino P., Lanzuise S., Woo S.L., Lorito M., Scala F. Four potato (*Solanum tuberosum*) ABCG transporters and their expression in response to abiotic factors and *Phytophthora infestans* infection. *J. Plant Physiol.* 2011;168(18):2225-2233. DOI 10.1016/j.jplph.2011.07.008.
- Santa J.D., Berdugo-Cely J., Cely-Pardo L., Soto-Suárez M., Mosquera T., Galeano M.C.H. QTL analysis reveals quantitative resistant loci for *Phytophthora infestans* and *Tecia solanivora* in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *PLoS One.* 2018;13(7). DOI 10.1371/journal.pone.0199716.
- Simko I. Comparative analysis of quantitative trait loci for foliage resistance to *Phytophthora infestans* in tuber-bearing *Solanum* species. *Am. J. Pot. Res.* 2002;79:125-132. DOI 10.1007/BF02881521.
- Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., del Pozo O., Martin G.B., Klessig D.F. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99(18):11640-11645. DOI 10.1073/pnas.182427699.
- Solomon-Blackburn R.M., Stewart H.E., Bradshaw J.E. Distinguishing major-gene from field resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) and selecting for high levels of field resistance. *Theor. Appl. Genet.* 2007;115(1):141-149. DOI 10.1007/s00122-007-0550-0.
- Stewart H.E., Bradshaw J.E., Pand B. The effect of the presence of R-genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) on the underlying level of field resistance. *Plant Pathology.* 2003;52(2):193-198. DOI 10.1046/j.1365-3059.2003.00811.x.
- Tan M.Y., Hutten R.C., Celis C., Park T.H., Niks R.E., Visser R.G., van Eck H.J. The *R(Pi-mcd1)* locus from *Solanum microdontum* involved in resistance to *Phytophthora infestans*, causing a delay in infection, maps on potato chromosome 4 in a cluster of NBS-LRR genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008;21(7):909-918. DOI 10.1094/MPMI-21-7-0909.
- Tomiyama K., Takakuwa M., Takase N. The metabolic activity in healthy tissue neighbouring the infected cells in relation to resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de By in potatoes. *Phytopathol. Z.* 1958;31:237-250.
- Van der Vossen E., Sikkema A., Hekkert B., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs S. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 2003;36(6):867-882. DOI 10.1046/j.1365-313x.2003.01934.x.
- Vert G., Walcher C.L., Chory J., Nemhauser J.L. Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(28):9829-9834. DOI 10.1073/pnas.0803996105.

ORCID ID

T.S. Frolova orcid.org/0000-0002-4400-0665
A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181

Acknowledgements. This work was supported by the Russian Science Foundation, project 19-74-00067.

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

Received August 3, 2020. Revised November 10, 2020. Accepted December 23, 2020.

Original Russian text www.bionet.nsc.ru/vogis/

Problems and possibilities of studying malting quality in barley using molecular genetic approaches

N.V. Trubacheeva , L.A. Pershina

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kurchatov Genomics Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia
 natas@bionet.nsc.ru

Abstract. About one-third of the world's barley crop is used for malt production to meet the needs of the brewing industry. In this regard, the study of the genetic basis of malting quality traits and the breeding of malting barley varieties that are adaptive to their growing conditions are relevant throughout the world, particularly in the Russian Federation, where the cultivation and use of foreign malting varieties of barley prevails. The main parameters of malting quality (artificially germinated and dried barley grains) are malt extract, diastatic power, Kolbach index, viscosity, grain protein, wort β -glucan, free amino nitrogen, and soluble protein content. Most of these components are under the control of quantitative trait loci (QTLs) and are affected by environmental conditions, which complicates their study and precise localization. In addition, the phenotypic assessment of malting quality traits requires elaborate, expensive phenotypic analyses. Currently, there are more than 200 QTLs associated with malting parameters, which were identified using biparental mapping populations. Molecular markers are widely used both for mapping QTL loci responsible for malting quality traits and for performing marker-assisted selection (MAS), which, in combination with conventional breeding, makes it possible to create effective strategies aimed at accelerating the process of obtaining new promising genotypes. Nevertheless, the MAS of malting quality traits faces a series of difficulties, such as the low accuracy of localization of QTLs, their ineffectiveness when transferred to another genetic background, and linkage with undesirable traits, which makes it necessary to validate QTLs and the molecular markers linked to them. This review presents the results of studies that used MAS to improve the malting quality of barley, and it also considers studies that searched for associations between genotype and phenotype, carried out using GWAS (genome-wide association study) approaches based on the latest achievements of high-throughput genotyping (diversity array technology (DART) and single-nucleotide polymorphism markers (SNPs)).

Key words: *Hordeum vulgare*; malting barley; QTL; marker-assisted selection; genome-wide association studies.

For citation: Trubacheeva N.V., Pershina L.A. Problems and possibilities of studying malting quality in barley using molecular genetic approaches. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021; 25(2):171-177. DOI 10.18699/VJ21.021

Проблемы и возможности изучения пивоваренных признаков ячменя с использованием молекулярно-генетических подходов

Н.В. Трубаچهва , Л.А. Першина

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
 natas@bionet.nsc.ru

Аннотация. Около одной трети урожая выращиваемого в мире ячменя используется для переработки в солод для обеспечения нужд пивоваренной промышленности. В связи с этим изучение генетической основы пивоваренных признаков и селекция пивоваренных сортов ячменя, адаптивных к условиям их произрастания, актуальны как во всем мире, так и в Российской Федерации, где преобладают выращивание и использование зарубежных солодовых сортов ячменя. К основным параметрам качества солода (искусственно пророщенного и высушенного зерна ячменя) относятся: экстрактивность, диастатическая сила, индекс Кольбаха, вязкость, содержание в зерне белка, β -глюкана, свободного аминного азота и растворимого белка. Большинство этих компонентов находится под контролем локусов количественных признаков (quantitative trait loci, QTL) и подвержено влиянию условий среды, что осложняет их изучение и точную локализацию. Кроме того, фенотипическая оценка пивоваренных признаков – трудоемкий и дорогостоящий процесс. В настоящее время известно более 200 QTL, связанных с пивоваренными параметрами, выявленных с привлечением двуродительских картирующих популяций. Молекулярные маркеры широко применяются как для картирования QTL-локусов, ответственных за пивоваренные качества, так и для выполнения работ по

маркер-опосредованной селекции (МОС), что в комбинации с традиционными селекционными подходами дает возможность создавать эффективные стратегии, направленные на ускорение процесса получения новых перспективных генотипов. Тем не менее МОС пивоваренных признаков сталкивается с рядом трудностей, таких как невысокая точность локализации QTL-локусов, их неэффективность при переносе в другую генотипическую среду, сцепленность с нежелательными признаками, что обуславливает необходимость валидации QTL и сцепленных с ними молекулярных маркеров. В обзоре приведены результаты работ по использованию МОС для улучшения пивоваренных качеств ячменя, а также рассматриваются исследования по поиску ассоциаций между генотипом и фенотипом, выполненные с помощью ПГАА-анализа (полногеномный поиск ассоциаций) на основе последних достижений в области высокопроизводительного генотипирования (diversity array technology, DArT и single-nucleotide polymorphism, SNP маркеры).

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*; пивоваренный ячмень; QTL; маркер-опосредованная селекция, полногеномный поиск ассоциаций.

Introduction

Barley (*Hordeum vulgare* L.) ranks fourth in worldwide production, after wheat, rice, and maize. It is used for feed, food, and malting. About 30 % of the barley is processed into malt, mainly used for brewing beer (Newton et al., 2011; Bond et al., 2015; <http://www.fao.org/faostat/ru/>).

The amount and composition of the ingredients formed during malting (low-molecular-weight sugars, amino acids, fatty acids, and enzymes) affect the quality of malt (Bamforth, 2009). The quality of malt is mainly determined by the optimal values of malt extract (the amount of dissolved substances that pass into the solution during mashing, determined by measuring its relative density), diastatic power (the ability of enzymes to hydrolyze starch to simple sugars), viscosity (the solubility and filtration speed of the malt wort), content of β -glucan in the wort, Kolbach index (the solubility of malt protein), and contents of free amino nitrogen, soluble protein, and protein in the grain (Meledina et al., 2013; Cu et al., 2016). At the same time, it is necessary that the grain is of a suitable malting variety, has a high germinating capacity and energy, is sensitive to water absorption, does not have impurities, and does not contain microbial or chemical pollutants (Stanca et al., 2016).

In general, the main breeding goal is the development of barley varieties with high malting quality and increased yield (Li et al., 2009; Nikolaev et al., 2017). Maintaining a balance between these two parameters is a serious problem, since high yields, often dependent on the use of nitrogen fertilizers, are associated with high protein and β -glucan content, which is undesirable for high-quality malt (Chen et al., 2006). From a breeding point of view, there is no single barley ideotype universally accepted as describing a malting variety. Earlier, it was reported that two-row barleys were used for malting all over the world, except in the United States of America (USA) and Mexico, where six-row varieties were mainly used (Riggs, Kirby, 1978). The best malting varieties have a spring growth habit. However, due to the depletion of their genetic diversity (Laidò et al., 2009; Meledina et al., 2013), as well as climate change, interest in winter varieties has increased, and the brewing associations of Europe and the USA have included them in the list of recommended malting varieties (<http://www.ukmalt.com/press-release-update-november-2019>; <https://ambainc.org/amba-publications/recommended-malting-barley-varieties/>).

The Russian Federation ranks first in worldwide production of barley and in areas featuring this crop (Varietal re-

sources..., 2010; <http://www.fao.org/faostat/ru/>). However, breeding of malting barley in Russia has not been particularly developed; as a result, 80–90 % of malt is produced from imported raw materials or when growing foreign malting varieties (Goncharov, Mordovin, 2019). The breeding and cultivation of Russian malting barley varieties in the Russian Federation is carried out both in the European region and in Western Siberia and Altai (Surin et al., 2014; Aniskov et al., 2016; Nikolaev et al., 2017; Musalitin et al., 2019). Due to strict standards of the brewing industry and different climatic conditions in the various regions of the Russian Federation, the development of a raw material base for malting barley faces significant difficulties (Surin et al., 2014; Musalitin et al., 2019). As a rule, foreign varieties have good technological characteristics that meet the requirements of brewing production; however, when grown in Russian regions, the parameters of malt and beer produced from them often do not reach the declared characteristics (Aniskov et al., 2016; Nikolaev et al., 2017). In this regard, the development of competitive local varieties of malting barley that combine adaptability to growing conditions with optimal technological parameters is an important goal.

Malting quality traits belong to complex quantitative traits and have polygenic control (Fox et al., 2003), which makes it difficult to study them using conventional methods of analysis. The use of molecular markers makes it possible to significantly expand the possibilities for chromosomal localization of genes and QTLs (quantitative trait loci) that determine malt quality characteristics and provide breeders with an effective tool for accelerated and directed plant selection (marker-assisted selection) (Han et al., 1997).

This review examines and discusses the main problems associated with molecular genetic mapping of malting quality traits, as well as the results of using recent high-throughput genotyping technologies for applied research to obtain breeding material with improved malting characteristics.

Genetic control of barley malting characteristics

The phenotype that determines the malting quality of barley is the result of interactions among a large number of components, each of which shows a complex inheritance (Molina-Cano et al., 1997; Fox et al., 2003). Most of them are quantitative traits with a comparatively low heritability, which are controlled by multiple genes (Fox et al., 2003). For example, the mean heritability for malt extract assessed in the F_2 and F_3 generations using different methods and populations ranged from

8 to 70 %, whereas the heritability of α -amylase activity in F_2 and F_5 plants ranged from 37 to 65% and from 39 to 74 %, respectively (Foster et al., 1967). In addition, the phenotypic variation of quantitative traits often depends on growing conditions, such as soil composition, temperature, irrigation, fertilizer application (Qi et al., 2005), genotype $\times$ environment interactions (Coles et al., 1991), methods of laboratory analysis (Cullis et al., 2003), and complex relationships among components that determine malting quality. All these aspects make it difficult to accurately localize the QTLs that control malting quality traits.

In some studies, QTLs for certain malting quality traits were found in different regions of the genome, due to the influence of different genotypes used in cross populations and/or the influence of genotype $\times$ environment interactions. For example, QTLs controlling the content of malt extract were identified on chromosomes 1H and 2H in populations derived from two North American varieties (Marquez-Cedillo et al., 2000) and on chromosomes 1H and 5H in populations from Australian and Canadian varieties (Collins et al., 2003). Even when using the same population (Blenheim $\times$ E224/3), QTLs for malt extract on chromosome 2H were found by different researchers in different amounts and positions (Thomas et al., 1996; Powell et al., 1997). This makes it necessary to validate QTLs using different mapping populations grown under different conditions in order to assess their interaction with the environment (Panozzo et al., 2007; Elia et al., 2010).

However, QTL analysis based on biparental mapping populations has been widely used to identify and localize QTLs (Marquez-Cedillo et al., 2000; Collins et al., 2003; Edney, Mather, 2004; Emebiri et al., 2005; Panozzo et al., 2007; Rae et al., 2007). QTLs or genes controlling malting traits were identified on all seven barley chromosomes, but most were identified on chromosomes 1H, 4H, 5H, and 7H (Schmalenbach, Pillen, 2009; Wang et al., 2015). Many studies investigating QTLs related to malting quality were based on genotyping data obtained using various molecular markers (Han et al., 1997; Mather et al., 1997; Coventry et al., 2003; Panozzo et al., 2007; Rae et al., 2007; Schmalenbach, Pillen, 2009; Szűcs et al., 2009; Castro et al., 2013). In addition, the database of barley markers has significantly expanded with the development of methods for detecting SNPs (single-nucleotide polymorphisms) using Illumina GoldenGate technology, which provided access to thousands of alleles and led to the creation of a high-density consensus genetic map of barley containing 2943 SNP loci (Close et al., 2009). Information about these SNPs was combined with other genetic markers such as RFLP, AFLP, SSR, and diversity array technology (DArT) in the integrated barley malting QTL database (Szűcs et al., 2009). As a result, a map was compiled with 154 QTLs associated with 18 malting quality traits localized on all barley chromosomes.

At least 268 malting QTLs/genes are known to have been identified in more than 20 mapping populations (Hayes et al., 2000; Zale et al., 2000; Fang et al., 2019). However, the results of these studies are difficult to directly apply to breeding for many reasons. For example, most mapping populations do not include genotypes used to produce new varieties, QTLs may be specific to a particular population, alleles desirable for malting quality may only be fixed in certain genotypes, and some

QTLs may have low localization accuracy due to the small size of mapping populations (Sneller et al., 2009). A particular problem for breeding is that QTLs identified in mapping populations may not segregate in breeding populations, such as QTLs for malting quality traits on barley chromosomes 4H and 7H (Condon et al., 2008). In this regard, it is emphasized that the use of local breeding lines for mapping can be more effective in identifying QTLs that are adequate to specific growing conditions and breeding goals (Pozniak et al., 2012).

Using marker-assisted selection to improve malting qualities

The marker-assisted selection (MAS) of barley is of particular interest in terms of developing genotypes with good malting quality, since the phenotypic evaluation of malting quality characteristics using laboratory equipment is an expensive process and requires large amounts of grain. In addition, these traits are affected by the interaction of the genotype with the environment. Molecular markers for assessing malting quality traits can provide rapid selection of plants at the early stages of breeding through a study of large populations, thereby increasing the likelihood of detecting the desired genetic combinations (Igartua et al., 2000).

Marker-assisted selection for quantitative traits, which include malting quality traits, has two main limitations. First, in comparison with monogenic traits, quantitative traits are characterized by low heritability, which leads to a less accurate assessment of their genetic localization. As a result, it is necessary to select a large fragment of the chromosome, which is associated with the transfer of many potentially undesirable genes. Second, many of the QTL alleles are difficult to detect when transferred to a different genetic background (Rae et al., 2007). Most studies on QTL mapping for malting quality traits were based on crosses of parents contrasting in malting traits, for example, malting variety $\times$ feed variety, which goes against the common breeding practice for malting barley, whereby feed genotypes are not typically used. In this regard, QTLs for malting quality traits should be verified in breeding programs before being used in marker-assisted selection. In addition, some of the identified QTLs cannot be used in MAS since they are associated not only with target traits, but also with undesirable ones. For example, one of these QTLs found on the long arm of chromosome 3H was associated not only with an increase in diastatic power, but also with an increase in viscosity (Panozzo et al., 2007).

One successful example of improving malting quality using MAS is the work related to the enzyme β -amylase, which mainly determines the diastatic power (Zhang et al., 2007). The *Bmy1* locus on chromosome 4H controls β -amylase activity, free/bound enzyme ratio, and thermal stability, and its alleles are different isoenzyme types. PCR markers have been developed that allow selection of different alleles of β -amylase, which allows the use of these markers in MAS depending on the needs of the brewing industry (Erkkilä, 1999). For example, if high diastatic power and enzymatic activity are required, the *Sd2-H* and *Sd3* alleles should be selected. Using molecular markers and double-haploid technology, the *Bmy1-Sd3* allele from *Hordeum spontaneum* L. was transferred to two commercial barley varieties. As a result,

the activity of β -amylase and, thus, the diastatic power in these varieties increased by an average of 30 % (Li et al., 2004). The use of the CAPS marker made it possible to transfer the *Sd3* allele of the thermostable β -amylase from wild barley (*H. spontaneum*) into a commercial barley (variety Gairdner) and obtain elite lines with high malting quality characteristics (Xu et al., 2018). Supplementary material¹ presents a description of the markers used in MAS for barley malting characteristics.

Cultivated barley contains two isoforms of the enzyme lipoxygenase, which oxidizes unsaturated fatty acids to the corresponding hydroxyperoxides. One of the isoforms, LOX1, promotes the synthesis of substances that impair the flavor stability of beer (Hirota et al., 2006). It was found that this trait is encoded by a locus on chromosome 4H, and the absence of this protein is caused by a single-nucleotide mutation. The use of the CAPS marker for the selection of mutants lacking this protein made it possible to develop new breeding lines in three years, despite this process usually taking approximately ten years. Beers made with barley lacking LOX1 (null-Lox variety) were found to have a 75 % reduction in the content of substances that cause a stale flavor due to oxidation compared to beer made from ordinary barley malt (Hirota et al., 2005). One of the indicators of beer quality is the stability of beer foam, which depends on the combined action of various proteins, iso-alpha acids, polysaccharides, and metal ions contained in beer. To select haplotypes of Z4 and Z7 proteins associated with the quality of beer foam, CAPS markers were developed, and their efficiency was shown in the analysis of 23 malting barley varieties (Imure et al., 2009).

The possibility of using MAS to select populations with improved malting quality has been shown (Coventry, et al., 2003). For example, it was found that lines carrying an allele linked to SSR marker EBmac501 on chromosome 1H were characterized by increased diastatic power, as well as β -amylase and α -amylase activities, compared to other lines. In addition, this marker locus was associated with an increased content of malt extract and, therefore, was considered promising for use in MAS (Collins et al., 2003). The use of MAS for the selection of plants carrying the target malting quality traits made it possible to develop promising breeding lines when crossing feed barley Keel with three donor varieties with high malting quality characteristics (Vassos et al., 2004). F. Han et al. (1997) compared the efficiency of malting quality trait selection using phenotypic assessment and marker-assisted selection using molecular markers flanking the QTL1 and QTL2 genome regions for malt extract, α -amylase activity, diastatic power, and β -glucan content. It was shown that, for QTL1, the combination of MAS and phenotype assessment was more effective than phenotypic selection only, which involves laborious and expensive procedures. The selection of desired genotypes can be greatly facilitated using PCR markers; therefore, a number of RFLP markers for malting QTLs have been converted to PCR markers (Lee, Penner, 1997).

A number of other examples of the use of MAS to identify QTLs associated with malting quality traits are also known. For example, the localization of two QTLs affecting malting

quality traits on chromosome 5H was confirmed using molecular markers. Later, the selection of genotypes carrying alleles from the malting variety Harrington made it possible to obtain double-haploid lines with improved malting characteristics, such as low β -glucan values and protein content in grain, high diastatic power, and high malt extract (Igartua et al., 2000). The use of PCR markers for the QTL region on chromosome 5H affecting α -amylase activity made it possible to introgress this trait from the malting barley variety Morex to the feed barley Labelle (Ayoub et al., 2003). In addition, this study showed that MAS can be successfully applied to incorporate QTLs into populations where only one of the parents (the Morex variety) was used for the initial QTL identification and mapping. Using SSR markers, the QTL regions for protein content, malt extract, and viscosity were introgressed from the winter malting barley Nure to the double-haploid population obtained from crossing Nure with the spring malting variety Tremois (Laidò et al., 2009). SSR markers flanking QTLs on chromosomes 2H, 6H, and 7H were developed. These loci had a significant effect on protein content and, according to the authors, may be useful in the development of varieties with a high protein content (Fan et al., 2017). Using the populations obtained by crossing elite malting barley varieties, QTLs for malting quality traits were mapped, and two SSR markers promising for use in MAS were identified (Panozzo et al., 2007).

Genome-wide association analysis as a perspective for the development of molecular selection of malting quality traits

The emergence of more cost-effective, high-throughput genotyping platforms such as diversity array technology (DArT) (Wenzl et al., 2004) and Illumina's GoldenGate assay (Close et al., 2009), as well as improvements in statistical methodology and computer programs, has enabled genome-wide association studies (GWAS) to be a promising alternative approach to conventional QTL analysis of biparental populations for the detection and accurate mapping of quantitative trait loci. The advantages of this method include a wider coverage of the genetic diversity of the population, i.e., simultaneous study of a large number of alleles, high-resolution mapping, establishment of single-nucleotide polymorphisms, and reduced study time due to the absence of the need to develop a mapping population (Rafalski, 2010).

For the effective use of available technologies, a number of researchers used information obtained during long-term breeding trials when performing GWAS, which significantly reduced the cost of genetic research. For example, data on malting quality traits from 97 breeding trials conducted on 1862 lines were combined with the results of using 3072 SNP markers for association mapping. This approach was found to provide improved accuracy for identifying QTLs associated with malting quality traits compared to previous mapping studies (Mohammadi et al., 2014). In addition, the GWAS method can identify a much larger number of molecular markers compared to traditional QTL mapping (Cai et al., 2013). In another study, phenotypic data of 18 malting traits accumulated over 25 years for 174 European barley varieties were used in the study of GWAS using DArT markers.

¹ Supplementary material is available in the online version of the paper: http://vavilov.elpub.ru/jour/manager/files/SupplTrubacheeva_Engl.pdf

In addition to confirming the already known QTLs on chromosomes 1H, 2H, and 5H, new associations were found, for example, markers linked to the malting quality and viscosity (Matthies et al., 2014). A collection of 91 elite malting barley lines was analyzed using association mapping to identify DArT markers associated with seven malting traits, and 19 putative candidate expressed sequence tags responsible for marker-trait associations were identified (Beattie et al., 2010). The study of a collection of 224 spring barleys using 1536 SNPs made it possible to detect 57 novel QTLs responsible for agronomic valuable traits, including starch and protein content (Pasam et al., 2012). Thus, the associations between genotype and phenotype identified in the studies reviewed may be useful for selecting parent genotypes carrying the desired alleles in order to model future breeding studies, although the results obtained need to be validated in the field.

Conclusion

The malting quality of barley is the result of a complex interaction of various components controlled by multiple genes. In this regard, selection based on phenotypic characteristics is a time-consuming and expensive process. Marker-associated selection of malting quality traits is an effective alternative or complement to conventional breeding, but requires detailed information about genes/QTLs responsible for the target traits. QTL analysis is widely used for the chromosomal localization of agronomic traits and the detection of molecular markers. To date, a large number of QTLs have been identified that control malting quality traits, and the use of associated molecular markers and recent advances in molecular tools for high-resolution genotyping make it possible to effectively select the desired genotypes for breeding barley varieties with high malting quality characteristics.

References

- Anis'kov N.I., Nikolaev P.N., Popolzukhin P.V., Safonova I.V., Bratseva L.I. A new middle-ripening spring malting barley variety Omskiy 100. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2016; 4(138):14-19. (in Russian)
- Ayoub M., Armstrong E., Bridger G., Fortin M.G., Mather D.E. Marker-based selection in barley for a QTL region affecting alpha amylase activity of malt. *Crop Sci.* 2003;43:556-561.
- Bamforth C.W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *J. Cereal Sci.* 2009;50:353-357. DOI 10.1016/j.jcs.2009.03.001.
- Beattie A.D., Edney M.J., Scoles G.J., Rossnagel B.G. Association mapping of malting quality data from western Canadian two-row barley cooperative trials. *Crop Sci.* 2010;50(5):1649. DOI 10.2135/cropsci2009.06.0334.
- Bond J., Capehart T., Allen E., Kim G. Boutique Brews, Barley, and the Balance Sheet: Changes in Malt Barley Industrial Use Require an Updated Forecasting Approach. Washington, DC: Economic Research Division, United States Department of Agriculture, 2015;18-23.
- Cai S., Yu G., Chen X., Huang Y.C., Jiang X.G., Zhang G.P., Jin X. Grain protein content variation and its association analysis in barley. *BMC Plant Biol.* 2013;13(35). DOI 10.1186/1471-2229-13-35.
- Castro A., Cammarota L., Gomez B., Gutierrez L., Hayes P.M., Locatelli A., Motta L., Pieroni S. Genome-wide association mapping of malting quality traits in relevant barley germplasm in Uruguay. In: Zhang G., Li C., Liu X. (Eds.). *Advances in Barley Sciences*. New York: Springer, 2013;37-46. DOI 10.1007/978-94-007-4682-4_3.
- Chen J., Dai F., Wei K., Zhang G. Relationship between malt qualities and β -amylase activity and protein content as affected by timing of nitrogen fertilizer application. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2006;7: 79-84. DOI 10.1631/jzus.2006.B0079.
- Close T.J., Bhat P.R., Lonardi S., Wu Y., Rostoks N., Ramsay L., Druka A., Stein N., Svensson J.T., Wanamaker S., Bozdag S., Roose M.L., Moscou M.J., Chao S., Varshney R.K., Szucs P., Sato K., Hayes P.M., Matthews D.E., Kleinhofs A., Muehlbauer G.J., DeYoung J., Marshall D.F., Madishetty K., Fenton R.D., Condamine P., Graner A., Waugh R. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics*. 2009; 10:582. DOI 10.1186/1471-2164-10-582.
- Coles G.D., Jamieson P.D., Haslemore R.M. Effect of moisture stress on malting quality in triumph barley. *J. Cereal Sci.* 1991;14:161-177. DOI 10.1016/S0733-5210.
- Collins H.M., Panozzo J.F., Logue S.J., Jefferies S.P., Barr A.R. Mapping and validation of chromosome regions associated with high malt extract in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Aust. J. Agric. Res.* 2003;54:1223-1240. DOI 10.1071/AR02201.
- Condon F., Gustus C., Rasmusson D., Smith K. Effect of advanced cycle breeding on genetic diversity in barley breeding germplasm. *Crop Sci.* 2008;48:1027-1036. DOI 10.2135/cropsci2007.07.0415.
- Coventry S.J., Collins H.M., Barr A.R., Jefferies S.P., Chalmers K.J., Logue S.J., Langridge P. Use of putative QTLs and structural genes in marker assisted selection for diastatic power in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Aust. J. Agric. Res.* 2003;54:1241-1250. DOI 10.1071/AR02193.
- Cu S.T., March T.J., Stewart S., Degner S., Coventry S., Box A., Stewart D., Skadhauge B., Burton R.A., Fincher G.B., Eglinton J. Genetic analysis of grain and malt quality in an elite barley population. *Mol. Breed.* 2016;36:129. DOI 10.1007/s11032-016-0554-z.
- Cullis B.R., Smith A.B., Panozzo J.F., Lim P. Barley malting quality: are we selecting the best? *Aust. J. Agric. Res.* 2003;54:1261-1275. DOI 10.1071/AR02195.
- Edney M.J., Mather D.E. Quantitative trait loci affecting germination traits and malt friability in a two-rowed by six rowed barley cross. *J. Cereal Sci.* 2004;39:283-290. DOI 10.1016/j.jcs.2003.10.008.
- Elía M., Swanson J.S., Moralejo M., Casas A., Pérez-Vendrell A.M., Ciudad F.J., Thomas W.T.B., Smith P.L., Ullrich S.E., Molinacano J.-L. A model of the genetic differences in malting quality between European and north American barley cultivars based on a QTL study of the cross Triumph $\times$ Morex. *Plant Breed.* 2010;129: 280-290. DOI 10.1111/j.1439-0523.2009.01694.x.
- Emebiri L.C., Moody D.B., Horsley R., Panozzo J., Read B.J. The genetic control of grain protein content variation in a doubled haploid population derived from a cross between Australian and north American two-rowed barley lines. *J. Cereal Sci.* 2005;41:107-114. DOI 10.1016/j.jcs.2004.08.012.
- Erkkilä M.J. Intron III-specific markers for screening of β -amylase alleles in barley cultivars. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1999;17:139-147. DOI 10.1023/A:1007595821379.
- Fan C., Zhai H., Wang H., Yue Y., Zhang M., Li J., Wen S., Guo G., Zeng Y., Ni Z., You M. Identification of QTLs controlling grain protein concentration using a high-density SNP and SSR linkage map in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biol.* 2017;17(1):122. DOI 10.1186/s12870-017-1067-6.
- Fang Y., Zhang X., Xue D. Genetic analysis and molecular breeding applications of malting quality QTLs in barley. *Front. Genet.* 2019; 10:352. DOI 10.3389/fgene.2019.00352.
- Foster A.E., Peterson G.A., Banasik O.J. Heritability of factors affecting malting quality of barley. *Crop Sci.* 1967;7:611-613. DOI 10.2135/cropsci1967.0011183X000700060016x.
- Fox G.P., Panozzo J.F., Li C.D., Lance R.C.M., Inkerman P.A., Henry R.J. Molecular basis of barley quality. *Aust. J. Agric. Res.* 2003; 54:1081-1101. <https://doi.org/10.1071/AR02237>.
- Goncharov S.V., Mordovin A.N. Malting barley is a driver of intensification. In: *Biologization of Agriculture: Prospects and Real Opportunities*. Voronezh, 2019;116-125. (in Russian)

- Han F., Romagosa I., Ullrich S., Jones B., Hayes P., Wesenberg D. Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. *Mol. Breed.* 1997;3:427-437. DOI 10.1023/A:1009608312385.
- Hayes P., Castro A., Marquez-Cedillo L., Corey A., Henson C., Jones B., Kling J., Mather D., Matus I., Rossi C. A summary of published barley. *QTL Reports*. 2000. <http://www.barleyworld.org/northamericanbarley/qtlsummary.php>.
- Hirota N., Kaneko T., Kuroda H., Kaneda H., Takashio M., Ito K., Takeda K. Characterization of lipoxygenase-1 null mutants in barley. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(8):1580-1584. DOI 10.1007/s00122-005-0088-y.
- Hirota N., Kuroda H., Takoi K., Kaneko T., Kaneda H., Yoshida I., Takashio M., Ito K., Takeda K. Brewing performance of malted lipoxygenase-1 null barley and effect on the flavor stability of beer. *Cereal Chem.* 2006;83(3):250-254. DOI 10.1094/CC-83-0250.
- Igartua E., Edney M., Rossmagel B.G., Spaner D., Legge W.G., Scoles G.J., Eckstein P.E., Penner G.A., Tinker N.A., Briggs K.G., Falk D.E., Mather D.E. Marker-based selection of QTL affecting grain and malt quality in two-row barley. *Crop Sci.* 2000;40:1426-1433. DOI 10.2135/cropsci2000.4051426x.
- Iimure T., Kihara M., Ichikawa S., Ito K., Takeda K., Sato K. Development of DNA markers associated with beer foam stability for barley breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2011;122:199-210. DOI 10.1007/s00122-010-1436-0.
- Laidò G., Barabaschi D., Tondelli A., Gianinetti A., Stanca A.M., Li Destri Nicosia O., NDi F., Francia E., Pecchioni N. QTL alleles from a winter feed type can improve malting quality in barley. *Plant Breed.* 2009;128:598-605. DOI 10.1111/j.1439-0523.2009.01636.x.
- Lee S.J., Penner G.A. The conversion of RFLP markers to allele specific amplicons linked to QTLs governing malting quality in barley. *Mol. Breed.* 1997;3:457-462. DOI 10.1023/A:1009660921822.
- Li C.D., Cakir M., Lance R. Genetic improvement of malting quality through conventional breeding and marker-assisted selection. In: Zhang G., Li C. (Eds.). *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*. Advanced Topics in Science and Technology in China. Berlin; Heidelberg: Springer, 2009.
- Li C.D., Lance R., Tarr A., Broughton S., Harasymow S., Appels R., Jones M. Improvement of barley malting quality using a gene from *Hordeum spontaneum*. In: VI Int. Barley Genet. Symp. Brno, Czech Republic, 2004.
- Marquez-Cedillo L.A., Hayes P.M., Jones B.L., Kleinhofs A., Legge W.G., Rossmagel B.G., Sato K., Ullrich S.E., Wesenberg D.M. QTL analysis of malting quality in barley based on the doubled-haploid progeny of two elite north American cultivars representing different germplasm groups. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101:173-184. DOI 10.1007/s001220051466.
- Mather D.E., Tinker N.A., LaBerge D.E., Edney M., Jones B.L., Rossmagel B.G., Legge W., Briggs K.G., Irvine R.G., Falk D.E., Kasha K.J. Regions of the genome that affect grain and malt quality in a north American two-row barley cross. *Crop Sci.* 1997;37:544-554. DOI 10.2135/cropsci1997.0011183X003700020039x.
- Matthies I.E., Malosetti M., Röder M.S., van Eeuwijk F. Genome-wide association mapping for kernel and malting quality traits using historical European barley records. *PLoS One*. 2014;9(11):e110046. DOI 10.1371/journal.pone.0110046.
- Meledina T.V., Prokhorchik I.P., Kuznetsova L.I. *Biochemical Processes in Malt Production*. St. Petersburg, 2013. (in Russian)
- Mohammadi M., Endelman J.B., Nair S.S., Chao S., Jones S.S., Muehlbauer G.J., Ullrich S.E., Baik B.J., Wise M.L., Smith K.P. Association mapping of grain hardness, polyphenol oxidase, total phenolics, amylose content, and β -glucan in US barley breeding germplasm. *Mol. Breed.* 2014;34:1229-1243. DOI 10.1007/s11032-014-0112-5.
- Molina-Cano J., Francesch M., Perez-Vendrell A.M., Ramo T., Voltas J., Brufau J. Genetic and environmental variation in malting and feed quality of barley. *J. Cereal Sci.* 1997;25:37-47. DOI 10.1007/s00122-015-2481-5.
- Musalitin G.M., Boradulina V.A., Kuzikeev Zh.V. Barley in the Altai region and the results of breeding. *Vestnik Buryatskoy Gosudarstvennoy Sel'skokhozyaystvennoy Akademii im. V.R. Filippova = Bulletin of the Filippov Buryat State Agricultural Academy*. 2019; 2(55):29-34. (in Russian)
- Newton A.C., Flavell A.J., George T.S., Leat P., Mullholland B., Ramsay L., Revoredo-Giha C., Russell J., Steffenson B.J., Swanson J.S., William T.B., Waugh R., Waugh T., White P.J., Bingham I.J. Crops that feed the world 4 barley: a resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. *Food Secur.* 2011;3:141-178. DOI 10.1007/s12571-011-0126-3.
- Nikolaev P.N., Popolzhukhin P.V., Aniskov N.I., Yusova O.A., Safonova I.V. Agrobiological characteristics of the malting spring barley cultivar Omskiy 100. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2017;178(4):90-99. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-90-99. (in Russian)
- Panozzo J.F., Eckermann P., Mather D.E., Moody D.B., Black C.K., Collins H.M., Barr A.R., Lim P.O., Cullis B.R. QTL analysis of malting quality traits in two barley populations. *Aust. J. Agric. Res.* 2007;58(9):858-866. DOI 10.1071/AR06203.
- Paris M., Jones M.G.K., Eglinton J.K. Genotyping single nucleotide polymorphisms for selection of barley β -amylase alleles. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2002;20:149-159. DOI 10.1007/BF02799430.
- Pasam R.K., Sharma R., Malosetti M., Van Eeuwijk F.A., Hase-neyer G., Kilian B., Graner A. Genome-wide association studies for agronomical traits in a world wide spring barley collection. *BMC Plant Biol.* 2012;12(1):16. DOI 10.1186/1471-2229-12-16.
- Powell W., Thomas W.T.B., Baird E., Lawrence P., Booth A., Harrower B., McNicol J.W., Waugh R. Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. *Heredity*. 1997;79:48-59. DOI 10.1038/hdy.1997.122.
- Pozniak C.J., Clarke J.M., Clarke F.R. Potential for detection of marker-trait associations in durum wheat using unbalanced, historical phenotypic dataset. *Mol. Breed.* 2012;30:1537-1550. DOI 10.1007/s11032-012-9737-4.
- Qi J.C., Chen J.X., Wang J.M., Wu F.B., Cao L.P., Zhang G.P. Protein and hordein fraction content in barley seeds as affected by sowing date and their relations to malting quality. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2005;6(11):1069-1075. DOI 10.1631/jzus.2005.B1069.
- Rae S.J., Macaulay M., Ramsay L., Leigh F., Matthews D., O'Sullivan D.M., Donini P., Morris P.C., Powell W., Marshall D.F., Waugh R., Thomas W.T.B. Molecular barley breeding. *Euphytica*. 2007;158:295-303. DOI 10.1007/s10681-006-9166-8.
- Rafalski J.A. Association genetics in crop improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010;13:1-7. DOI 10.1016/j.pbi.2009.12.004.
- Riggs T.J., Kirby E.J.M. Developmental consequences of two-row and six-row ear type in spring barley. *J. Agric. Sci.* 1978;91:199-205.
- Schmalenbach I., Pillen K. Detection and verification of malting quality QTLs using wild barley introgression lines. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118:1411-1427. DOI 10.1007/s00122-009-0991-8.
- Sneller C.H., Mather D.E., Crepeux S. Analytical approaches and population types for finding and utilizing QTL in complex plant populations. *Crop Sci.* 2009;49:363-380. DOI 10.2135/cropsci2008.07.0420.
- Stanca A.M., Gianinetti A., Rizza F., Terzi V. Barley: an overview of a versatile cereal grain with many food and feed uses. In: Wrigley C.W., Corke H., Seetharaman K., Faubion J. (Eds.). *Encyclopedia of Food Grains*. 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2016;147-152.
- Surin N.A., Zobova N.V., Lyahova N.E. The genetic potential of barley in Siberia and its importance for breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(2):378-386. (in Russian)
- Szűcs P., Blake V.C., Bhat P.R., Close T.J., Cuesta-Marcos A., Muehlbauer G.J., Ramsay L.V., Waugh R., Hayes P.M. An integrated resource for barley linkage map and malting quality QTL alignment. *Plant Genome*. 2009;2:134-140. DOI 10.3835/plantgenome2008.01.0005.

- Thomas W.T.B., Powell W., Swanston J.S., Ellis R.P., Chalmers K.J., Barua U.M., Jack P., Lea V., Forster B.P., Waugh R., Smith D.B. Quantitative trait loci for germination and malting quality characters in a spring barley cross. *Crop Sci.* 1996;36:265-273. DOI 10.2135/cropsci1996.0011183X003600020009x.
- Varietal Resources of Grain Fodder Crops in the Nonchernozem Zone of Russia (Catalog). Yekaterinburg: GNU Ural Research Institute of Agriculture Publ., 2010. (in Russian)
- Vassos E.J., Barr A.R., Eglinton J.K. Genetic conversion of feed barley varieties to malting types. In: Proceedings of the 9th International Barley Genetics Symposium. Czech, 20-26 June, 2004.
- Wang J., Yang J., Zhang Q., Zhu J., Jia Q., Hua W., Shang Y., Li C., Zhou M. Mapping a major QTL for malt extract of barley from a cross between TX9425 × Naso Nijo. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128: 943-952. DOI 10.1007/s00122-015-2481-5.
- Wenzl P., Carling J., Kudrna D., Jaccoud D., Huttner E., Kleinhofs A., Kilian A. Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101:9915-9920. DOI 10.1073/pnas.0401076101.
- Xu Y., Zhang X., Harasymow S., Westcott S., Zhang W., Li C. Molecular marker-assisted backcrossing breeding: an example to transfer a thermostable β -amylase gene from wild barley. *Mol. Breed.* 2018; 38:63-72. DOI 10.1007/s11032-018-0828-8.
- Zale J., Clancy J., Ullrich S., Jones B., Hayes P. Summary of barley malting quality QTLs mapped in various populations. *Barley Genet. Newsl.* 2000;30:44-54.
- Zhang W.S., Li X., Liu J.B. Genetic variation of Bmy1 alleles in barley (*Hordeum vulgare* L.) investigated by CAPS analysis. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:1039-1050. DOI 10.1007/s00122-006-0497-6.

ORCID ID

N.V. Trubacheeva orcid.org/0000-0002-6701-6811
L.A. Pershina orcid.org/0000-0002-9941-2026

Acknowledgements. The work was funded by the Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia) according to the agreement with the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-15-2019-1662.

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

Received August 3, 2020. Revised September 24, 2020. Accepted October 26, 2020.

Антоцианы как компоненты функционального питания

Р.С. Юдина¹✉, Е.И. Гордеева¹, О.Ю. Шоева¹, М.А. Тихонова^{1, 2}, Е.К. Хлесткина^{1, 3}

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

² Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

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

✉ yurs@bionet.nsc.ru

Аннотация. Среди встречающихся в природе пигментов антоцианы являются, пожалуй, одной из наиболее изученных групп. Начиная с первых исследований о физико-химических свойствах антоцианов, проведенных еще в XVII в. британским естествоиспытателем Р. Бойлем, наука об этих уникальных соединениях сделала огромный шаг вперед. На сегодняшний день достаточно хорошо исследованы структура и функции антоцианов в растительных клетках, а путь их биосинтеза – один из самых полно охарактеризованных путей биосинтеза вторичных метаболитов как на биохимическом, так и на генетическом уровне. Наряду с этими фундаментальными достижениями, мы начинаем осознавать потенциал антоцианов как соединений промышленного значения, как пигментов самих по себе, а также в качестве компонентов функционального питания, способствующих предупреждению и снижению риска развития хронических заболеваний. Долгое время биологическая активность антоцианов была недооценена, в частности, из-за данных об их низкой биодоступности. Однако в ходе исследований было показано, что в организме человека и животных эти соединения активно метаболизируются и биодоступность, оцененная с учетом их метаболитов, превышала 12 %. Экспериментально подтверждено, что антоцианы обладают антиоксидантными, противовоспалительными, гипогликемическими, антимутагенными, антидиабетическими, противораковыми, нейропротекторными свойствами, а также полезны для здоровья глаз. Однако проведенные исследования не всегда могут объяснить молекулярные механизмы действия антоцианов в организме человека. По некоторым данным, наблюдаемые эффекты объясняются действием не антоцианов, а их метаболитов, которые, благодаря своей повышенной биодоступности, могут быть более биологически активными, чем исходные соединения. Высказывается также предположение о положительном эффекте на здоровье человека всего комплекса полифенольных соединений, поступающего в организм в составе растительной пищи. В представленном обзоре суммированы результаты основных направлений исследований антоцианов в качестве компонентов функционального питания. Отдельное внимание уделено результатам генетических исследований синтеза пигментов, данные которых приобретают особую важность в связи с актуализацией селекционных программ, направленных на повышение содержания антоцианов у культурных растений. Ключевые слова: растения; пигменты; вторичные метаболиты; флавоноиды; антоцианы; регуляторные гены; структурные гены; антиоксиданты; биологическая активность.

Для цитирования: Юдина Р.С., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Тихонова М.А., Хлесткина Е.К. Антоцианы как компоненты функционального питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022

Anthocyanins as functional food components

R.S. Yudina¹✉, E.I. Gordeeva¹, O.Yu. Shoeva¹, M.A. Tikhonova^{1, 2}, E.K. Khlestkina^{1, 3}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine, Novosibirsk, Russia

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

✉ yurs@bionet.nsc.ru

Abstract. Among the natural pigments, anthocyanins are assumed to represent one of the most studied groups. Starting with the first studies on the physicochemical properties of anthocyanins carried out in the 17th century by British naturalist Robert Boyle, the science about these unique compounds has progressed substantially. To date, the structure and functions of anthocyanins in plant cells have been well studied, and the pathway of their biosynthesis is one of the most fully characterized pathways of secondary metabolite biosynthesis at both the biochemical and genetic levels. Along with these fundamental achievements, we are beginning to realize the potential of anthocyanins as compounds of industrial importance, as pigments themselves, as well as components of functional food that contribute to the prevention and reduction of risk of chronic diseases. For a long time, the biological activity of anthocyanins has been underestimated, in particular, due to the data on their low bioavailability. However, studies showed that in humans and animals, these compounds are actively metabolized and the bioavailability, estimated taking into account their metabolites, exceeded 12 %. It has been experimentally shown that anthocyanins have antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic, antimutagenic, antidiabetic, anti-cancer, neuroprotective properties, and they are

beneficial for eye health. However, the studies conducted cannot always explain the molecular mechanism of action of anthocyanins in the human body. According to some reports, the observed effects are not due to the action of anthocyanins themselves, but to their metabolites, which can be more biologically active because of their increased bioavailability. Other data ascribe the positive effect on human health not to individual anthocyanins, but to the whole complex of polyphenolic compounds consumed. The review summarizes the results of the studies of anthocyanins as components of functional food. Special attention is paid to genetic control of the pigment synthesis. These data are of particular importance in respect to the initiated breeding programs aimed at increasing the content of anthocyanins in cultural plants.

Key words: plants; pigments; secondary metabolites; flavonoids; anthocyanins; regulatory genes; structural genes; antioxidants; biological activity.

For citation: Yudina R.S., Gordeeva E.I., Shoeva O.Yu., Tikhonova M.A., Khlestkina E.K. Anthocyanins as functional food components. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022 (in Russian)

Введение

В последние годы в науке о питании появилось новое направление – функциональное питание. Его концепция возникла в Японии в 1980–1990-х гг. и базируется на употреблении в пищу так называемых функциональных продуктов питания (Фотев и др., 2018). Согласно определению, функциональными называют пищевые продукты, содержащие физиологически активные, ценные и безопасные для здоровья ингредиенты с известными физико-химическими характеристиками, для которых выявлены и научно обоснованы полезные для сохранения и улучшения здоровья свойства (ГОСТ Р 52349-2005). К таким веществам относятся растворимые и нерастворимые пищевые волокна, витамины, минеральные вещества, жиры и вещества, сопутствующие жирам, полисахариды, вторичные растительные соединения, про- и пребиотики.

В качестве компонентов функционального питания активно исследуются различные биологически активные соединения, среди которых антоцианы привлекают особое внимание (Calderaro et al., 2020). Эти соединения являются водорастворимыми пигментами, окраска которых, в зависимости от структуры и pH среды, может варьировать от красного и пурпурного до синего цвета. Антоцианы широко представлены в группе покрытосеменных растений и встречаются у некоторых представителей голосеменных, тогда как в других таксонах они отсутствуют (Rauscher, 2006). Окрашивая генеративные органы и плоды, антоцианы участвуют в привлечении опылителей и распространителей семян, в вегетативных органах они задействованы в адаптивных реакциях к условиям окружающей среды (Natiel, Gould, 2008).

К настоящему времени появились убедительные, научно-обоснованные данные о пользе антоцианов для животных и человека, помимо их важной роли в жизни растений. Ингибирование антоцианами различных форм рака, метаболических, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний было задокументировано как на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*, так и в клинических и эпидемиологических исследованиях (Тараховский и др., 2013; Li et al., 2017). Ранее предполагалось, что только антиоксидантные свойства антоцианов ответственны за их укрепляющие здоровье эффекты. Однако было показано, что они способны взаимодействовать с регуляторными белками, а также с компонентами сигнальных путей и, таким образом, модулировать физиологические процессы, протекающие в организме человека (Li et al., 2017).

Основные источники антоцианов – темноокрашенные плоды, среди которых ягоды бузины, рябины черноплодной, граната и черники – лидеры по содержанию этих соединений (Ramos et al., 2014). В последнее время в качестве источников антоцианов стали рассматривать более экзотические в этом плане культуры, такие как злаки и картофель, зерно и клубни которых также способны накапливать антоциановые соединения (Pauyavula et al., 2013; Zhu, 2018). Несмотря на то что и в зерне, и в клубнях антоцианов содержится меньше, чем в ягодах, они также являются привлекательными источниками этих соединений, поскольку характеризуются более длительным хранением, доступностью и повседневным употреблением в пищу, по сравнению с сезонными ягодами и фруктами. Исследования потребительских характеристик изделий, приготовленных из зерна пшеницы, содержащего антоцианы, показали, что они не уступают, а по некоторым параметрам даже превосходят контрольные изделия, не содержащие антоцианы (Bartl et al., 2015; Pasqualone et al., 2015; Хлесткина и др., 2017; Ma et al., 2018).

В связи с большим потенциалом антоцианов в качестве компонентов функционального питания сегодня становятся востребованными знания об их генетическом контроле, которые находят свое применение в селекционных программах, направленных на создание новых сортов культурных растений с повышенным содержанием этих ценных для здоровья человека соединений.

В настоящем обзоре представлены данные о синтезе антоцианов у растений и его генетическом контроле, особое внимание уделено исследованиям антоцианов в качестве функциональных компонентов продуктов питания, в частности их биодоступности и механизмам позитивного действия в организме человека.

Химическая структура и разнообразие антоцианов

Антоцианы относятся к флавоноидным соединениям, входящим в группу полифенолов. В их структуре выделяют углеводный остаток и неуглеводное основание – агликон. Все флавоноиды, включая антоцианы, имеют общий 15-углеродный скелет $C_6-C_3-C_6$, который состоит из двух ароматических колец А и В, соединенных C_3 -фрагментом (рис. 1). Степень окисления С-кольца определяет класс флавоноидов, к которому относится искомое соединение. У антоцианов С-кольцо имеет две двойные связи и несет положительный заряд (ион флавилия).

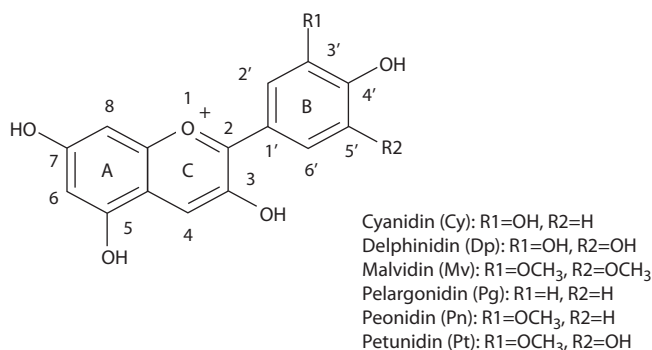


Fig. 1. Basic structure of anthocyanins.

Все разнообразие антоцианов, которых, по данным 2006 г., было выявлено около 600 индивидуальных соединений, обуславливают 25 различных агликонов, при этом 90 % идентифицированных антоцианов являются производными только шести из них: цианидина (Cy), дельфинидина (Dp), мальвидина (Mv), пеларгонидина (Pg), пеонидина (Pn) и петунидина (Pt) (Andersen, Jordheim, 2006).

При общем строении C₁₅-углеродного скелета в классе антоцианов индивидуальные соединения выделяют на основе наличия, положения и характера модификаций основного скелета. Все антоциановые соединения представляют собой гликозиды, полученные в результате присоединения сахаров к агликонам, среди которых наиболее частыми являются глюкоза (Glu) и рамноза (Rha), а также встречаются галактоза (Gal), арабиноза (Ara), ксилоза (Xyl), рутиноза (Rut), могут попадаться дисахариды и очень редко – трисахариды. Помимо гликозилирования, антоцианы могут подвергаться ацилированию с помощью ароматических или алифатических ацильных остатков, наиболее распространенными из которых являются *n*-кумаровая, кофейная и феруловая кислоты. Антоциановые соединения также могут подвергаться метилированию и метоксилированию, а благодаря наличию реакционноспособных гидроксильных групп они легко вступают в реакции алкилирования, образуя эфиры (Запрометов, 1974).

Биосинтез антоцианов и его генетическая регуляция

Многообразие флавоноидных соединений, включая антоцианы, образуется в результате общего фенилпропаноидного и флавоноидного путей биосинтеза, активность которых зависит от двух групп генов – структурных, кодирующих ферменты биосинтеза, и регуляторных, кодирующих транскрипционные факторы, которые тканеспецифически регулируют экспрессию структурных генов и определяют, таким образом, паттерны распределения пигментов.

Биосинтез антоцианов

Биосинтез всех флавоноидных соединений начинается с фенилаланина. Фенилаланин-аммиак-лиаза PAL, циннамат-4-гидроксилаза CHH, 4-кумарат:КоА-лигаза 4CL, действуя поочередно, преобразуют фенилаланин в 4-кумарил-КоА. Последующая конденсация одной молекулы

4-кумарил-КоА и трех молекул малонил-КоА с помощью халконсинтазы CHS приводит к образованию тетрагидроксихалкона и тригидроксихалкона, которые являются предшественниками различных классов флавоноидов и изофлавоноидов соответственно. Под действием халкон-флаванонизомеразы CHI тетрагидроксихалкон превращается в нарингенин. Последний служит субстратом для ферментов, осуществляющих реакции гидроксирования С-кольца в положении С3, либо В-кольца в положении С3'. Так, нарингенин с помощью фермента флаванон-3-гидроксилазы F3H преобразуется в дигидрокемпферол ДНК, а с помощью флавоноид-3'-гидроксилазы F3'H – в эриодиктиол.

Гидроксирование ДНК с помощью F3'H или флавоноид-3'5'-гидроксилазы F3'5'H приводит к образованию дигидрокеверцетина DHQ или дигидромирицетина DHM соответственно. Полученные дигидрофлавонолы ДНК, DHQ и DHM восстанавливаются дигидрофлавонол-4-редуктазой, DFR до соответствующих флаван-3,4-диолов лейкопеларгонидина, лейкоцианидина, лейкодельфинидина, которые преобразуются до 3-ОН-антоцианидинов пеларгонидина, цианидина и дельфинидина с помощью фермента антоцианидинсинтазы ANS. Последующие этапы биосинтеза антоцианов относятся к реакциям конечных модификаций, необходимых для их стабилизации и хранения. В этой стадии биосинтеза принимают участие ферменты, относящиеся к классам *O*-метилтрансфераз OMT, гликозилтрансфераз GT и ацилтрансфераз AT. Антоциановые соединения синтезируются на цитоплазматической поверхности эндоплазматического ретикулула, а затем транспортируются и хранятся в вакуолях (Winkel-Shirley, 2001).

Регуляция биосинтеза антоцианов

В регуляции биосинтеза антоцианов принимают участие транскрипционные факторы, принадлежащие к семействам MYB, bHLH и WD40, которые для выполнения регуляторных функций объединяются в MYB-bHLH-WD40 (MBW) комплексы (Hichri et al., 2011). Их регуляция может быть светозависимой и светонезависимой. Светозависимая регуляция инициируется фоторецепторами при действии света различной длины волны. Центральное место в передаче сигналов от фоторецепторов к синтезу антоцианов занимает регуляторный фактор ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) (Bulgakov et al., 2017), который напрямую может связываться с промотором гена *PAP1*, кодирующего транскрипционный фактор MYB (Shin et al., 2013). Другой важный участник светозависимой регуляции – убиквитинлигаза COP1, мишенями которой служат регуляторные факторы, вовлеченные в биосинтез антоцианов (например, PAP1 и PAP2) (Bulgakov et al., 2017).

У некоторых видов растений синтез антоцианов осуществляется в подземных органах, например в клубнях картофеля, что исключает его светозависимую регуляцию. Хотя точный механизм светонезависимой регуляции неизвестен, существует предположение, что он реализуется посредством сахарозы. Так, в промоторной области гена *ANI*, кодирующего MYB-подобный транскрипционный фактор, регулирующий синтез антоцианов в клубнях картофеля, у сортов с фиолетовой окраской клубней было

выявлено шесть SURE (sucrose responsive elements) элементов, тогда как у сортов с белой и желтой окраской клубней этот ген содержал один SURE. Предположительно, сахароза активирует экспрессию гена *AN1*, который, в свою очередь, активирует экспрессию структурных генов биосинтеза антоцианов, а также генов, кодирующих ферменты гидролиза сахарозы, такие как синтаза сахарозы и инвертаза. Гидролитические ферменты расщепляют сахарозу, приводя к снижению ее уровня в клетке с высвобождением гексоз, продукты распада которых служат предшественниками для синтеза фенилпропаноидов (Paayavula et al., 2013).

Фенотипическое изменение окраски у растений часто обусловлено мутациями именно в регуляторных генах, которые рассматриваются, таким образом, как наиболее эффективные мишени для селекции и биотехнологии. К примеру, накопление антоцианов в мякоти яблока происходит благодаря усиленной активации гена *MdMYB10*, в промоторе которого присутствуют пять 23-нуклеотидных повторов (Espley, 2009). Сходным образом накопление большого количества антоцианов в мякоти кровавого апельсина обусловлено инсерцией *Copia*-подобного ретротранспозона, приводящей к усилению экспрессии близлежащего гена *Ruby*, кодирующего транскрипционный фактор MYB, регулирующий синтез антоцианов (Butelli et al., 2012). У мягкой пшеницы выявлено шесть 261-нуклеотидных tandemных повторов в промоторе доминантного аллеля bHLH-кодирующего гена *Pp3/TaPpb1*, активирующего экспрессию структурных генов синтеза антоцианов в перикарпе зерновки, тогда как лишь один такой повтор был обнаружен в рецессивном аллеле у неокрашенных сортов (Shoeva et al., 2014; Jiang et al., 2018). Тандемная дупликация двух первых экзонов, первого интрона и части второго интрона, а также инсерция фрагмента длиной около 11 тыс. нуклеотидов обнаружены в промоторе bHLH-кодирующего гена *Kala4* у черnozерных сортов риса, но у белозерных сортов такой дупликации не выявлено (Oikawa et al., 2015).

Помимо мутаций в промоторных районах регуляторных генов, были описаны мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания. Так, у ячменя идентифицирован ген *HvMuc2*, контролирующий синтез антоцианов в алейроновом слое зерновки ячменя, рецессивные аллели которого имеют однонуклеотидную инсерцию в кодирующей части гена (Strygina et al., 2017). Мутации в генах, кодирующих WD40, менее распространены, поскольку эти гены имеют плейотропные функции, которые не ограничиваются лишь синтезом антоцианов (Zhang, Schrader, 2017).

Таким образом, на сегодняшний день достаточно полно охарактеризованы метаболический путь биосинтеза антоцианов, а также его регуляция. Установлено, что качественный состав антоциановых пигментов определяют ферменты биосинтеза, в то время как распределение пигментов в тканях растений, а также его количество контролируются регуляторными генами. Именно с выявлением триггерных регуляторных генов и их картированием на хромосомах связаны современные постгеномные методы селекции культурных растений с повышенным содержанием антоцианов в зерне.

Биодоступность антоцианов и их метаболизм в организме человека

Долгое время роль антоцианов в функциональном питании была недооценена, в частности, из-за данных об их низкой биодоступности, которая определяется как отношение части вещества, достигающего системной циркуляции, органов и тканей, к общему количеству потребляемого вещества. По некоторым оценкам, лишь 0.4 % исходного количества употребленных в пищу антоцианов детектировано в плазме крови животных и человека (Manach et al., 2005). Такие низкие концентрации антоцианов не могли объяснить физиологические эффекты, наблюдаемые после их употребления. Усовершенствование методов детекции позволило оценить биодоступность антоцианов с учетом их метаболитов и продуктов взаимодействия. С использованием радиоактивно меченного цианидин-3-гликозида C3G было показано, что не менее 12.38 % метаболитов антоцианов выводится из организма человека в составе мочи и выдыхаемого воздуха, что намного выше биодоступности, оцененной только по содержанию исходных соединений в плазме крови (Czank et al., 2013). Исследование образцов крови и продуктов выделения после однократного употребления 500 мг C3G выявило присутствие в них как интактного соединения, так и его катаболизированных производных, среди которых наиболее представленными были глюкурониды протокатехиновой кислоты и цианидина, их метилированные производные, феруловая, гиппуровая, фенилуксусная и фенилпропионовая кислоты (Czank et al., 2013).

У животных, которых кормили антоцианами, эти соединения были обнаружены практически во всех органах, в том числе в тканях головного мозга, что указывает на их активную абсорбцию и способность преодолевать гематоэнцефалический барьер (Celli et al., 2017; Sandoval-Ramírez et al., 2018). Важно отметить, что при краткосрочном употреблении антоцианов в тканях животных преобладают их исходные формы, а при долгосрочном — метаболиты, что связывают с деятельностью кишечной микробиоты (Sandoval-Ramírez et al., 2018).

Метаболизм антоцианов начинается в ротовой полости, где ряд их частично расщепляется гликозидазами бактериальной микрофлоры до соответствующих агликонов (Kamonpatana et al., 2012) (рис. 2). В желудке происходит первоначальная абсорбция гликолизированных антоцианов через желудочную стенку в кровяное русло воротной вены. Именно абсорбцией из желудка объясняют быстрое повышение концентрации антоцианов в плазме крови сразу после их приема. В транспортировке антоцианов через стенку желудка задействованы били-транслоказы и переносчики глюкозы GLUT1 и GLUT3 (Oliveira et al., 2019). По воротной вене антоцианы попадают в печень и распределяются по гепатоцитам, где они подвергаются глюкуронированию, метилированию и сульфатированию, которые осуществляются ферментами уридин-5-дифосфоглюкуронозил-трансферазой UDPGT, катехол-О-метилтрансферазой COMT и сульфотрансферазой SULT соответственно (Celli et al., 2017). В печени часть антоцианов и продуктов их деградации попадает в желчь и секретируется обратно в просвет кишечника через желчный проток (энтерогепатическая ре-

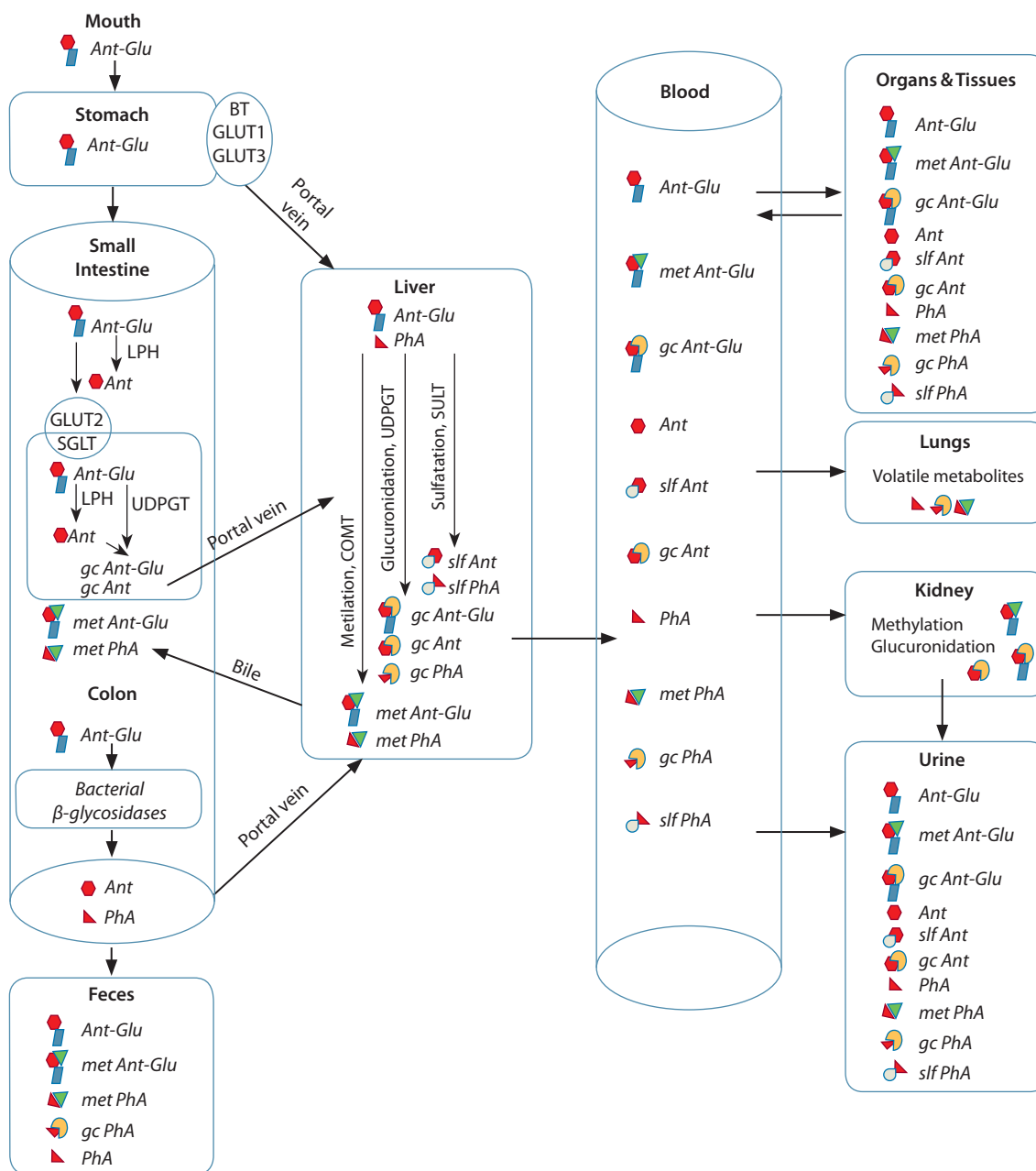


Fig. 2. Schematic presentation of the absorption and metabolism of anthocyanins in the human body.

Ant – anthocyanin aglicon; *Ant-Glu* – anthocyanin-glucoside; *gc Ant* – conjugate of anthocyanin aglicon with glucuronic acid; *gc Ant-Glu* – conjugate of anthocyanin-glucoside with glucuronic acid; *gc PhA* – conjugate of phenolic acid with glucuronic acid; *met Ant-Glu* – methylated anthocyanin-glucoside; *met PhA* – methylated phenolic acid; *PhA* – phenolic acid; *slf Ant* – sulfated aglicon of anthocyanin; *slf PhA* – sulfated phenolic acid; BT – bilitranslocase; COMT – catechol-O-methyltransferase; GLUT 1, 3 – glucose transporters 1, 3; LPH – lactase phlorizin hydrolase; SULT – sulfotransferase; UDPGT – uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. After (McGhie, Walton 2007; Celli et al., 2017).

циркуляция), тогда как другая часть попадает в общий кровоток.

Кроме вышеописанного специфического контура циркуляции, неабсорбированные в желудке антоцианы поступают в кишечник. Тонкий кишечник является вторым участком желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в котором происходит активная абсорбция антоцианов в виде интактных гликозидов либо образующихся под действием гидролаз их агликонов. В клетках энтероцитов каемчатого эпителия кишечника антоцианы, как и другие фла-

воноиды, могут подвергаться гидролизу под действием лактаза-флоризин гидролазы LPH (Day et al., 2000). Хотя транспортеры антоцианов в клетки кишечника до сих пор точно не установлены, предполагается, что в этом процессе участвуют переносчики глюкозы GLUT2 (Faria et al., 2009) и натрий-зависимый переносчик глюкозы SGLT1 (Zou et al., 2014). В энтероцитах антоцианы и их агликоны глюкуронируются. Перед тем как попасть в кровяное русло, эти вещества по воротной вене доставляются в печень, где они метилируются и сульфати-

руются соответствующими трансферазами. Антоцианы, не абсорбированные в тонком кишечнике, попадают в толстый кишечник, где они подвергаются расщеплению микробиотой, в результате чего образуются фенольные кислоты и гидроксициннаматы, которые, в свою очередь, могут всасываться эпителием, попадать в кровяное русло и в дальнейшем экскретироваться в мочу (Fang, 2014). Антоцианы и другие флавоноиды не могут быть полностью разрушены микробиотой толстого кишечника, что объясняет присутствие некоторого количества интактных антоцианов в содержимом фекальных выделений (He et al., 2005).

Таким образом, показано, что в организме человека антоцианы активно метаболизируются. Поскольку концентрация и профиль соединений, присутствующих в плазме крови, являются ключевыми для их возможного физиологического воздействия на целевые мишени, существует предположение, что продукты разложения антоцианов в ЖКТ и их конъюгированные метаболиты могут быть более биологически активными, чем исходные антоциановые соединения, вероятно, благодаря своей повышенной биодоступности.

Роль антоцианов в лечении и профилактике заболеваний

Антоцианы представляют собой общепризнанную догму в народной медицине во всем мире. Антоцианы из различных видов гибискуса исторически использовались в средствах от дисфункции печени и гипертонии, эти соединения из черники имеют давнюю историю применения при микробных инфекциях, диарее и других нарушениях здоровья (Smith et al., 2000; Wang et al., 2000). Именно полифенольными соединениями и их регулярным употреблением в составе красных вин удалось разрешить известный французский парадокс, заключающийся в низкой частоте возникновения ишемической болезни сердца у французов, несмотря на высокий уровень жира в их диете (Renaud, de Lorgeril, 1992). К настоящему времени установлено, что антоцианы характеризуются широким спектром биологического действия в организме человека (Приложение)¹. Их полезные для здоровья эффекты частично обусловлены антиоксидантными свойствами, а также способностью влиять на регуляторные белки и компоненты сигнальных путей и таким образом модулировать физиологические процессы, протекающие в организме человека.

Антоцианы как антиоксиданты

Наверное, самое известное и активно обсуждаемое свойство антоцианов – их антиоксидантная активность, которая не уступает, а по ряду оценок даже выше, чем у таких общепринятых антиоксидантов, как α -токоферол (Wang et al., 1997), тролокс и катехин (Kähkönen, Heinonen, 2003). Антиоксидантные свойства антоцианов обусловлены их структурными особенностями: числом гидроксильных групп, наличием катехинового фрагмента в В-кольце и иона оксония в С-кольце, паттерном гидроксирования, метилирования, ацилирования и гликозилирования (Yang

et al., 2011). Среди антоциановых агликонов наибольшую антиоксидантную активность проявляют Dp и Cy, за которыми в порядке уменьшения следуют Mv, Pn, Pg и Pt (Lucioli, 2012).

В организме человека антиоксидантные свойства антоцианов реализуются с помощью их прямого взаимодействия со свободными радикалами (Fukumoto, Mazza, 2000) либо опосредованно через модулирование антиоксидантной защитной системы организма (Shih et al., 2007; Steffen et al., 2008; Toufektsian et al., 2008).

Антоцианы для здоровья глаз

Благоприятное влияние антоцианов на улучшение зрения было впервые задокументировано во время Второй мировой войны, когда летчики Королевских военно-воздушных сил Британии для повышения остроты зрения в темное время суток употребляли джем из черники (Ghosh, Konishi, 2007). В клинических испытаниях было показано, что употребление антоцианов действительно способствует улучшению дневного, сумеречного и ночного зрения. Однако воздействие антоцианов на зрительные функции наблюдалось не во всех экспериментах, а зависело от принимаемой дозы, ее состава и продолжительности (Nakaishi et al., 2000; Lee et al., 2005).

Одним из механизмов, объясняющих положительное действие антоцианов на зрение, является их способность восстанавливать зрительный пигмент родопсин. При этом было установлено, что гликозид и рутинозид Cy ускоряли регенерацию родопсина, а производные Dp не оказывали никакого воздействия (Matsumoto et al., 2003). В исследованиях *in vitro* было выявлено, что антоцианы также способны ингибировать фотоокисление бисретинола A2E – хромофора липофусциновых гранул, который накапливается с возрастом в эпителиальных клетках сетчатки и может приводить к нарушению целостности их мембран (Jang et al., 2005). Поскольку гибель светочувствительных клеток сетчатки глаза рассматривается как основная причина развития возрастной макулодистрофии, полученные результаты позволяют предположить, что антоцианы могут служить эффективным профилактическим средством этого дегенеративного заболевания.

Антоцианы для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний

Результаты проведенных исследований указывают на то, что антоцианы помогают предотвратить и частично восстановить нарушения в организме, приводящие к сердечно-сосудистым заболеваниям – группе болезней сердца и кровеносных сосудов, являющихся основной причиной смертности во всем мире (Wallace et al., 2016). В частности, показано, что регулярное употребление антоцианов в пищу снижает концентрацию в плазме липопротеинов низкой плотности, агрегацию тромбоцитов, вероятность развития артериальной гипертензии и эндотелиальной дисфункции (Erlund et al., 2008; Zhu et al., 2014). Благодаря ингибированию ангиотензинпревращающего фермента, активирующего гормон ангиотензин, ответственный за сужение сосудов, антоцианы способствуют снижению артериального давления (Parichatikanond et al., 2012). Помимо этого, антоцианы повышают активность эндотели-

¹ Приложение см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx5.pdf>

альной синтазы оксида азота eNOS и увеличивают, таким образом, высвобождение оксида азота NO, обладающего вазодилатирующими, противотромбозными, антиатерогенными и антипролиферативными свойствами (Xu et al., 2004; Horie et al., 2019).

Благотворное влияние антоцианов на сердечно-сосудистую систему обусловлено также их противовоспалительными и антиагрегатными свойствами. Как противовоспалительные агенты, антоцианы могут подавлять экспрессию генов цитокинов, кодирующих медиаторы воспаления, среди которых ключевое место занимает сигнальный путь ядерного фактора NF-κB (Karlsen et al., 2010). Антоцианы также способны ингибировать экспрессию гена, кодирующего циклооксигеназу-2 COX-2, участвующую в синтезе простагландинов, обладающих противовоспалительной активностью (Hou et al., 2005).

Употребление антоцианов – эффективная профилактика атеросклероза, обусловленного сужением сосудов и снижением кровотока за счет отложения холестерина и некоторых фракций липопротеидов в просвете сосудов (Mauray et al., 2012). Они проявляют свои антиатерогенные свойства благодаря супрессирующему влиянию на образование тромбоцитарных белков хемокинов, участвующих в привлечении циркулирующих лейкоцитов и клеток-предшественников к месту повреждения эндотелия (Song et al., 2014).

Приведенные примеры представляют собой лишь малую часть полученных к настоящему времени данных о благотворном влиянии антоцианов на состояние сердечно-сосудистой системы. На сегодняшний день эта группа соединений рассматривается в качестве эффективных профилактических средств против сердечно-сосудистых патологий.

Антоцианы для профилактики нейродегенеративных заболеваний

Богатые антоцианами фрукты могут оказывать положительное влияние на изменение направления старения нейронов и поведения (Joseph et al., 1999). Проведено рандомизированное контролируемое клиническое исследование, в котором люди старшей возрастной группы (70+) с деменцией получали богатый антоцианами вишневый сок (200 мл/день) или контрольный сок с низким содержанием антоцианов. У группы, регулярно получавшей антоцианы, наблюдалось улучшение показателей беглости речи, кратковременной и долговременной памяти (Kent et al., 2017). Было отмечено положительное влияние богатых антоцианами экстрактов шелковицы на индукцию антиоксидантных ферментов и коррекцию когнитивных нарушений у мышей с ускоренным старением и нейродегенерацией альцгеймероподобного типа (Shih et al., 2010). Нейропротекторные эффекты антоцианов могут быть связаны с ослаблением нейротоксичности, индуцируемой перекисью водорода, амилоидом-бета, D-галактозой и ишемией (Tarozzi et al., 2010; Min et al., 2011; Rehman et al., 2017). Показана польза богатого антоцианами зерна пшеницы для когнитивных функций взрослых мышей (Tenditnik et al., 2017). На клеточных моделях болезни Паркинсона выявлено, что экстракты, богатые антоцианами и проантоцианидинами, проявляют нейропротекторную

активность против повреждения нейронов нейротоксином ротееноном (Strathearn et al., 2014).

Основными механизмами, с помощью которых антоцианы влияют на функции мозга, служат их способности защищать нейроны от повреждений, индуцированных нейротоксинами и воспалением, активировать синаптическую передачу и улучшать мозговое кровообращение, а также препятствовать высвобождению факторов индукции апоптоза (Spencer, 2010).

Антиканцерогенные свойства антоцианов

Антиканцерогенные свойства антоцианов продемонстрированы на клеточных моделях различного типа рака, на экспериментальных животных, а также в ходе клинических наблюдений (Hou, 2003; Smeriglio et al., 2016). Так, снижение жизнеспособности клеток рака гортани, рака желудка и рака молочной железы наблюдалось при обработке их экстрактом из плодов пурумы бразильской (Li et al., 2017). Частота возникновения индуцированных канцерогенами колоректальных аденом и карцином была заметно ниже у крыс, которых кормили фиолетовой кукурузой с высоким уровнем антоцианов по сравнению с группой крыс, в диете которых эти соединения отсутствовали (Hagiwara et al., 2001).

В ходе клинических наблюдений было установлено, что антоцианы из различных источников способны ингибировать инициацию и прогрессирование рака молочной железы, простаты, печени, толстого и тонкого кишечника, крови, шейки матки, легких, фибросаркомы и метастатической меланомы (Hou, 2003; Smeriglio et al., 2016; Li et al., 2017). При этом следует отметить, что индивидуальные соединения и их композиции проявляют разную антиканцерогенную активность, которая зависит как от типа агликона антоциана, паттерна его гликозилирования, метилирования и ацилирования, так и от комбинации индивидуальных соединений (Smeriglio et al., 2016; Li et al., 2017). Антиканцерогенные свойства антоцианов обусловлены их способностью прерывать клеточный цикл, индуцировать апоптоз, блокировать образование новых сосудов (антиангиогенные свойства), ингибировать окислительное повреждение ДНК, активировать ферменты детоксификации, а также способностью ингибировать циклооксигеназу COX-2 и модулировать иммунный ответ, в том числе через микробиоту (Smeriglio et al., 2016). Перечисленные механизмы могут быть реализованы совместно, что усиливает антиканцерогенные свойства.

Антоцианы для профилактики метаболических нарушений

В качестве функциональных компонентов питания антоцианы могут быть использованы для предотвращения ожирения, лечения неалкогольной жировой болезни печени и диабета 2-го типа. Исследования на людях и на экспериментальных животных позволили объяснить молекулярные механизмы, с помощью которых они регулируют жировой и углеводный обмен и снижают резистентность к инсулину (Ghosh, Konishi, 2007; Li et al., 2017).

Употребление антоцианов обуславливает снижение уровня глюкозы в крови как за счет снижения экспрессии генов, кодирующих транспортные белки натрия и

глюкозы, GLUT2 и SGLT1 соответственно, в кишечнике, ингибирования кишечной α -глюкозидазы (Adisakwattana et al., 2011) и панкреатической α -амилазы (Sui et al., 2016), так и за счет способности гликозированных антоцианов использовать транспортный механизм глюкозы в эпителиальных клетках желудка, таких как переносчики глюкозы GLUT1 и GLUT3 (Liu et al., 2014; Oliveira et al., 2019). Антоцианы также способны снизить резистентность к инсулину, повышая экспрессию регулируемого инсулином гена белка-транспортера глюкозы GLUT4 путем активации и фосфорилирования альфа-субъединицы АМФ-активируемой протеинкиназы АМФК α в белой жировой ткани, скелетных мышцах и печени, стимулирующей поглощение глюкозы и секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы, в то же время ингибируя выработку избытка глюкозы в печени (Tsuda et al., 2004; Takikawa et al., 2010).

Антоцианы оказывают защитное действие на β -клетки поджелудочной железы, уменьшая митохондриальную продукцию активных форм кислорода (Zhang et al., 2010; Sun et al., 2012). Они могут модулировать антиоксидантную защиту, активируя антиокислительные ферменты и способствуя синтезу восстановленного глутатиона (GSH) в печени. Так, потребление антоцианов восстанавливает уровень глутатионпероксидазы 3, который значительно снижается при приеме пищи с высоким содержанием жира (Tsuda, 2016).

При чрезмерном накоплении жировой ткани нарушаются процессы кровоснабжения жировых клеток адипоцитов, появляются очаги некроза и инфильтрация жировой ткани макрофагами, что приводит к избыточному образованию провоспалительных цитокинов и повышению уровня циркулирующих свободных жирных кислот, ведущих к системному воспалению (Tsuda, 2016). Антоцианы улучшают метаболизм жирных кислот и триглицеридов за счет повышения активности липопротеинлипазы в скелетных мышцах (Lefevre et al., 2008). Они также подавляют прирост массы тела, восстанавливают нарушенную функцию печени и значительно увеличивают концентрацию гормона адипонектина, вырабатываемого жировыми клетками, путем активации АМФК, в то же время снижая уровни инсулина и лептина (Takikawa et al., 2010; Wu et al., 2013). Снижая секрецию лептина, вырабатываемого жировой тканью, антоцианы модулируют активность нейрпептида Y и рецептора GABA_{B1} в гипоталамусе, сигнализирующих об энергетическом состоянии тела и контролирующих потребление пищи (Badshah et al., 2013). Другой механизм уменьшения гипергликемии и улучшения чувствительности к инсулину связан с подавлением антоцианами экспрессии ретинол-связывающего белка 4 (Sasaki et al., 2007). Кроме того, антоцианы регулируют FoxO1-опосредованную транскрипцию адипоцитарной триглицеридной липазы и, таким образом, ингибируют липолиз, индуцированный высоким содержанием глюкозы в адипоцитах, что позволяет предположить их потенциальное терапевтическое применение при гиперлипидемии, связанной с диабетом (Guo et al., 2012).

Действие антоцианов на неалкогольную жировую болезнь печени и диабетическую нефропатию также включает снижение накопления липидов и улучшение липидного

профиля в печени, ослабление инсулин-резистентности, повышение уровня PPAR α , снижение воспаления и окислительного стресса (Takayama et al., 2009; Guo et al., 2012; Qin et al., 2018; Sangsefidi et al., 2019).

Противомикробные свойства антоцианов

Антоцианы влияют на микробиоту кишечника. Они способны ингибировать рост патогенных микроорганизмов, таких как *Enterococcus* spp. и *Clostridium perfringens*, а также проявляют пребиотические эффекты, ускоряя рост *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. (Hidalgo et al., 2012). Показано, что экстракты антоцианов повышают проницаемость мембран бактерий, вызывающих пищевые отравления, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* и *Vibrio parahaemolyticus*. В результате повышенной проницаемости из клеток бактерий происходит утечка белков, нуклеиновых кислот и метаболитов. Помимо этого, антоцианы могут проникать в клетки бактерий и снижать активность ферментов основного метаболизма, таких как щелочная фосфатаза, аденозинтрифосфатаза, а также супероксиддисмутаза, нарушая, таким образом, работу бактериальной клетки (Sun et al., 2018).

Биологическая значимость природных комплексов, содержащих антоцианы

Как отмечают токсикологи, биологи и практикующие врачи, действие природных соединений ослабляется, когда биологически активные смеси (экстракты) разделяются на очищенные компоненты и вводятся отдельно (Liu, 2003; Lila, Raskin, 2005). Так, было определено, что фитохимические составляющие американской клюквы, хотя и индивидуально эффективные против канцерогенеза человека, обеспечили максимальную защиту только при совместном применении в натуральных смесях (Seeram et al., 2004). В этом исследовании были предложены потенциальные синергетические антипролиферативные эффекты от смесей антоцианов, проантоцианидинов и гликозидов флавонолов. В других исследованиях комбинации двух полифенольных соединений из винограда (ресвератрол и кверцетин) продемонстрировали синергетическую способность индуцировать апоптоз (активацию каспазы-3) в клеточной линии карциномы поджелудочной железы человека (Mouria et al., 2002). Аналогично, смешанный полифенольный экстракт из красного вина показал более сильное ингибирование синтеза ДНК в клетках орального плоскоклеточного рака, чем отдельные соединения, даже когда концентрации индивидуально вводимого кверцетина или ресвератрола были выше, чем концентрации в смешанном экстракте (Elattar, Virji, 1999).

Признанные потенцирующие взаимодействия между компонентами в природном фитохимическом комплексе оказывают сильную поддержку сторонникам «употребления всей (функциональной) пищи», не полагаясь только на однокомпонентные экстракты или вытяжки из пищевых продуктов, которые продаются в форме биологически активных добавок (БАД). В последнем случае потеря взаимодействующих фитохимикатов на этапе разработки продукта может привести к значительному снижению эффективности экстракта. В литературе хорошо задокумен-

тировано, что флавоноиды обладают широким спектром биологических свойств (см. Приложение), которые могут объяснять терапевтическое действие смеси взаимодействующих флавоноидов посредством нескольких путей вмешательства одновременно.

Таким образом, в настоящее время представляют огромный интерес не только сами антоциановые пигменты и их польза для здоровья, но и созданные природой растительные продукты, содержащие смеси этих соединений, долгое время применявшиеся в народной медицине без тщательного изучения и научного подтверждения их достоинств.

Заключение

В представленном обзоре суммированы результаты основных направлений исследований антоцианов в качестве компонентов функционального питания. Потенциальные эффекты, способствующие укреплению здоровья, многогранны. Выявленные положительные эффекты подтверждены экспериментальными исследованиями и клиническими испытаниями. Все эти данные свидетельствуют о том, что регулярное употребление в пищу цветных съедобных плодов, обогащенных антоцианами, и продуктов их переработки способствует улучшению здоровья и качества жизни людей. Отдельное внимание уделено результатам исследований генетического контроля синтеза этих пигментов у растений. Характеристика путей биосинтеза антоцианов различных видов растений и его генетическая регуляция обеспечивают ценный ресурс, позволяющий создавать новые организмы с повышенными функциональными качествами для улучшения питания животных и человека.

Список литературы / References

ГОСТ Р 52349-2005. Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения (с Изменением № 1). Дата введения: 2006-07-01.
[State Standard R 52349-2005. Foodstuffs. Functional Foods. Terms and Definitions. 2006. (in Russian)]

Запроматов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высш. шк., 1974.
[Zaprometov M.N. Fundamentals of the Biochemistry of Phenolic Compounds. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1974. (in Russian)]

Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдралилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушкино, 2013.
[Tarakhovskiy Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N. Flavonoids: Biochemistry, Biophysics, Medicine. Pushino, 2013. (in Russian)]

Фотев Ю.В., Пивоваров В.Ф., Артемьева А.М., Куликов И.М., Гончарова Ю.К., Сысо А.И., Гончаров Н.П. Концепция создания Российской национальной системы функциональных продуктов питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(7): 776-783. DOI 10.18699/VJ18.421.
[Fotev Yu.V., Pivovarov V.F., Artemyeva A.M., Kulikov I.M., Goncharova Y.K., Syso A.I., Goncharov N.P. Concept of producing of the Russian national system of functional food. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(7):776-783. DOI 10.18699/VJ18.421. (in Russian)]

Хлесткина Е.К., Усенко Н.И., Гордеева Е.И., Стабровская О.И., Шарфунова И.Б., Отмахова Ю.С. Маркер-контролируемое получение и производство форм пшеницы с повышенным уровнем биофлавоноидов: оценка продукции для обоснования значимости направления. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(5):545-553. DOI 10.18699/VJ17.25-o.

[Khlestkina E.K., Usenko N.I., Gordeeva E.I., Stabrovskaya O.I., Sharfunova I.B., Otmakhova Y.S. Evaluation of wheat products with high flavonoid content: justification of importance of marker-assisted development and production of flavonoid-rich wheat cultivars. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(5):545-553. DOI 10.18699/VJ17.25-o. (in Russian)]

Adisakwattana S., Yibchok-Anun S., Charoenlertkul P., Wongsasiripat N. Cyanidin-3-rutinoside alleviates postprandial hyperglycemia and its synergism with acarbose by inhibition of intestinal α -glucosidase. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2011;49:36-41. DOI 10.3164/jcbs.10-116.

Andersen O.M., Jordheim M. The anthocyanins. In: Andersen O.M., Markham K.R. (Eds.). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006;452-471.

Badshah H., Ullah I., Kim S.E., Kim T.H., Lee H.Y., Kim M. Anthocyanins attenuate body weight gain via modulating neuropeptide Y and GABAB1 receptor in rats hypothalamus. *Neuropeptides*. 2013; 47:347-353. DOI 10.1016/j.nepe.2013.06.001.

Bartl P., Albrecht A., Skrt M., Tremlová B., Ošťádalová M., Šmejkal K., Vovk I., Poklar U.N. Anthocyanins in purple and blue wheat grains and in resulting bread: quantity, composition, and thermal stability. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2015;66(5):514-519. DOI 10.3109/09637486.2015.1056108.

Bulgakov V.P., Avramenko T.V., Tsitsiashvili G.S. Critical analysis of protein signaling networks involved in the regulation of plant secondary metabolism: Focus on anthocyanins. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017;37(6):685-700. DOI 10.3109/07388551.2016.1141391.

Butelli E., Licciardello C., Zhang Y., Liu J., Mackay S., Bailey P., Martin C. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *Plant Cell*. 2012;24(3): 1242-1255. DOI 10.1105/tpc.111.095232.

Calderaro A., Barreca D., Bellocchio E., Smeriglio A., Trombetta D., Laganà G. Colored phytonutrients: role and applications in the functional foods of anthocyanins. In: Nabavi S.M., Sutar I., Barreca D., Khan H. (Eds.). *Phytonutrients in Food: From Traditional to Rational Usage*. Woodhead Publ., 2020;177-195. DOI 10.1016/B978-0-12-815354-3.00011-3.

Celli G.B., Ghanem A., Brooks M.S. A theoretical physiologically based pharmacokinetic approach for modeling the fate of anthocyanins *in vivo*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017;57(15):3197-3207. DOI 10.1080/10408398.2015.1104290.

Czank C., Cassidy A., Zhang Q., Morrison D.J., Preston T., Kroon P.A., Botting N.P., Kay C.D. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A (13)C-tracer study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013;97:995-1003. DOI 10.3945/ajcn.112.049247.

Day A., Canada F., Diaz J., Kroon P., McLauchlan R., Faulds C., Plumb G.W., Morgan M.R., Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 2000;468:166-170. DOI 10.1016/S0014-5793(00)01211-4.

Elattar T.M., Virji A.S. The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Res.* 1999;19(6B):5407-5414.

Erlund L., Koli R., Alfthan G., Marniemi J. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008;87(2):323-331. DOI 10.1093/ajcn/87.2.323.

Espley R.V. Regulation of anthocyanin accumulation in apple by the transcription factor MdMYB10. Thesis PhD (Biological Sciences), University of Auckland, 2009. <http://hdl.handle.net/2292/5170>

Fang J. Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metab. Rev.* 2014;46: 508-520. DOI 10.3109/03602532.2014.978080.

Faria A., Pestana D., Azevedo J., Martel F., de Freitas V., Azevedo I., Mateus N., Calhau C. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells – putative involvement of GLUT2. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009;53:1430-1437. DOI 10.1002/mnfr.200900007.

- Fukumoto L.R., Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48(8): 3597-3604. DOI 10.1021/jf000220w.
- Ghosh D., Konishi T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2007;16(2): 200-208.
- Guo H., Guo J., Jiang X., Li Z., Ling W. Cyanidin-3-O- β -glucoside, a typical anthocyanin, exhibits antilipolytic effects in 3T3-L1 adipocytes during hyperglycemia: Involvement of FoxO1-mediated transcription of adipose triglyceride lipase. *Food Chem. Toxicol.* 2012; 50(9):3040-3047. DOI 10.1016/j.fct.2012.06.015.
- Hagiwara A., Miyashita K., Nakanishi T., Sano M., Tamano S., Kadota T., Koda T., Nakamura M., Imaida K., Ito N., Shirai T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* 2001;171:17-25. DOI 10.1016/S0304-3835(01)00510-9.
- Hatier J.H.B., Gould K.S. Anthocyanin function in vegetative organs. In: Winefield C., Davies K., Gould K. (Eds.). *Anthocyanins*. New York: Springer, 2008;1-19. DOI 10.1007/978-0-387-77335-3_1.
- He J., Magnuson B.A., Giusti M.M. Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents: impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:2859-2866. DOI 10.1021/jf0479923.
- Hichri I., Barrieu F., Bogs J., Kappel C., Delrot S., Lauvergeat V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* 2011;62(8):2465-2483. DOI 10.1093/jxb/erq442.
- Hidalgo M., Oruna-Concha M.J., Kolida S., Walton G.E., Kallithraka S., Spencer J.P., de Pascual-Teresa S. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *J. Agri. Food Chem.* 2012;60(15):3882-3890. DOI 10.1021/jf3002153.
- Horie K., Nanashima N., Maeda H. Phytoestrogenic effects of blackcurrant anthocyanins increased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in human endothelial cells and ovariectomized rats. *Molecules.* 2019;24(7):1259. DOI 10.3390/molecules24071259.
- Hou D.X. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr. Mol. Med.* 2003;3(2):149-159. DOI 10.2174/1566524033361555.
- Hou D.X., Yanagita T., Uto T., Masuzaki S., Fujii M. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochem. Pharmacol.* 2005;70(3):417-425. DOI 10.1016/j.bcp.2005.05.003.
- Jang Y.P., Zhou J., Nakanishi K., Sparrow J.R. Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment cells. *Photochem. Photobiol.* 2005;81:529-536. DOI 10.1562/2004-12-14-RA-402.
- Jiang W., Liu T., Nan W., Jeewani D.C., Niu Y., Li C., Wang Y., Shi X., Wang C., Wang J., Li Y., Gao X., Wang Z. Two transcription factors *TaPpml* and *TaPpb1* co-regulate anthocyanin biosynthesis in purple pericarps of wheat. *J. Exp. Bot.* 2018;69(10):2555-2567. DOI 10.1093/jxb/ery101.
- Joseph J.A., Shukitt-Hale B., Denisova N.A., Bielinski D., Martin A., McEwen J.J., Bickford P.C. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J. Neurosci.* 1999;19(18):8114-8121. DOI 10.1523/JNEUROSCI.19-18-08114.1999.
- Kamonpatana K., Giusti M.M., Chitchumroonchokchai C., Moreno-Cruz M., Riedl K.M., Kumar P., Failla M.L. Susceptibility of anthocyanins to *ex vivo* degradation in human saliva. *Food Chem.* 2012; 135:738-747. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.04.110.
- Karlsen A., Paur I., Bøhn S.K., Sakhi A.K., Borge G.I., Serafini M., Erlund I., Laake P., Tonstad S., Blomhoff R. Bilberry juice modulates plasma concentration of NF- κ B related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. *Eur. J. Nutr.* 2010;49(6):345-355. DOI 10.1007/s00394-010-0092-0.
- Kähkönen M.P., Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51(3):628-633. DOI 10.1021/jf025551i.
- Kent K., Charlton K., Roodenrys S., Batterham M., Potter J., Traynor V., Gilbert H., Morgan O., Richards R. Consumption of anthocyanin-rich cherry juice for 12 weeks improves memory and cognition in older adults with mild-to-moderate dementia. *Eur. J. Nutr.* 2017;56: 333-341. DOI 10.1007/s00394-015-1083-y.
- Lee J., Lee H.K., Kim C.Y., Hong Y.J., Choe C.M., You T.W., Seong G.J. Purified high-dose anthocyanoside oligomer administration improves nocturnal vision and clinical symptoms in myopia subjects. *Br. J. Nutr.* 2005;93:895-899. DOI 10.1079/bjn20051438.
- Lefevre M., Wiles J.E., Zhang X., Howard L.R., Gupta S., Smith A.A., Ju Z.Y., DeLany J. Gene expression microarray analysis of the effects of grape anthocyanins in mice: a test of a hypothesis-generating paradigm. *Metabolism.* 2008;57:S52-S57. DOI 10.1016/j.metabol.2008.03.005.
- Li D., Wang P., Luo Y., Zhao M., Chen F. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: update from recent decade. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017;57(8):1729-1741. DOI 10.1080/10408398.2015.1030064.
- Lila M.A., Raskin I. Health-related interactions of phytochemicals. *J. Food Sci.* 2005;70(1):R20-R27. DOI 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09054.x.
- Liu R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 78(3):517S-520S. DOI 10.1093/ajcn/78.3.517S.
- Liu Y., Li D., Zhang Y., Sun R., Xia M. Anthocyanin increases adiponectin secretion and protects against diabetes-related endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2014;306(8):E975-E988. DOI 10.1152/ajpendo.00699.2013.
- Lucioli S. Anthocyanins: mechanism of action and therapeutic efficacy. In: Capasso A. (Ed.). *Medicinal Plants as Antioxidant Agents: Understanding Their Mechanism of Action and Therapeutic Efficacy*. Research Signpost, Kerala, India, 2012;27-57.
- Ma D., Zhang J., Li Y., Wang C. Quality of noodles made from colour-grained wheat. *Czech. J. Food Sci.* 2018;36:314-320. DOI 10.17221/130/2017-CJFS.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;81:230S-242S. DOI 10.1093/ajcn/81.1.243S.
- Matsumoto H., Nakamura Y., Tachibanaki S., Kawamura S., Hirayama M. Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51(12):3560-3563. DOI 10.1021/jf034132y.
- Mauray A., Felgines C., Morand C., Mazur A., Scalbert A., Milenkovic D. Bilberry anthocyanin-rich extract alters expression of genes related to atherosclerosis development in aorta of apo E-deficient mice. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2012;22:72-80. DOI 10.1016/j.numecd.2010.04.011.
- McGhie T.K., Walton M.C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007;51:702-713. DOI 10.1002/mnfr.200700092.
- Min J., Yu S.W., Baek S.H., Nair K.M., Bae O.N., Bhatt A., Majid A. Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 2011;500(3):157-161. DOI 10.1016/j.neulet.2011.05.048.
- Mouria M., Gukovskaya A., Jung Y., Buechler P., Hines O., Reber H., Pandol S. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int. J. Cancer.* 2002;98(5):761-769. DOI 10.1002/ijc.10202.
- Nakaishi H., Matsumoto H., Tominaga S., Hirayama M. Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. *Altern. Med. Rev.* 2000;5(6):553-562.

- Oikawa T., Maeda H., Oguchi T., Yamaguchi T., Tanabe N., Ebana K., Yano M., Ebitani T., Izawa T. The birth of a black rice gene and its local spread by introgression. *Plant Cell*. 2015;27:2401-2414. DOI 10.1105/tpc.15.00310.
- Oliveira H., Roma-Rodrigues C., Santos A., Veigas B., Brás N., Faria A., Calhau C., de Freitas V., Baptista P.V., Mateus N., Fernandes A.R., Fernandes I. GLUT1 and GLUT3 involvement in anthocyanin gastric transport-Nanobased targeted approach. *Sci. Rep.* 2019;9(1):1-14. DOI 10.1038/s41598-018-37283-2.
- Parichatikanond W., Pinthong D., Mangmool S. Blockade of the renin-angiotensin system with delphinidin, cyanin, and quercetin. *Planta Med.* 2012;78:1626-1632. DOI 10.1055/s-0032-1315198.
- Pasqualone A., Bianco A.M., Paradiso V.M., Summo C., Gabarcorta G., Caponio F., Blanco A. Production and characterization of functional biscuits obtained from purple wheat. *Food Chem.* 2015;180:64-70. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.02.025.
- Payyavula R.S., Singh R.K., Navarre D.A. Transcription factors, sucrose, and sucrose metabolic genes interact to regulate potato phenylpropanoid metabolism. *J. Exp. Bot.* 2013;64(16):5115-5131. DOI 10.1093/jxb/ert303.
- Qin Y., Zhai Q., Li Y., Cao M., Xu Y., Zhao K., Wang T. Cyanidin-3-O-glucoside ameliorates diabetic nephropathy through regulation of glutathione pool. *Biomed. Pharmacother.* 2018;103:1223-1230. DOI 10.1016/j.biopha.2018.04.137.
- Ramos P.R., Herrera R., Moya-Leyn M.-A. Anthocyanins: food sources and benefits to consumer's health. In: Warner L.M. (Ed.). *Handbook of Anthocyanins: Food Sources, Chemical Applications and Health Benefits* (Biochemistry Research Trends). Hauppauge; New York: Nova Science Publishers, Inc., 2014.
- Rausher M.D. The evolution of flavonoids and their genes. In: Grote-wold E. (Ed.). *The Science of Flavonoids*. New York: Springer, 2006;175-211. DOI 10.1007/978-0-387-28822-2_7.
- Rehman S.U., Shah S.A., Ali T., Chung J.I., Kim M.O. Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats. *Mol. Neurobiol.* 2017;54(1):255-271. DOI 10.1007/s12035-015-9604-5.
- Renaud S., de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339:1523-1526.
- Sandoval-Ramírez B.A., Catalán Ú., Fernández-Castillejo S., Rubio L., Macià A., Solà R. Anthocyanin tissue bioavailability in animals: possible implications for human health. A systematic review. *J. Agric. Food Chem.* 2018;66(44):11531-11543. DOI 10.1021/acs.jafc.8b04014.
- Sangsefidi Z.S., Hosseinzadeh M., Ranjbar A.M., Akhondi-Meybodi M., Fallahzadeh H., Mozaffari-Khosravi H. The effect of total anthocyanin-base standardized (*Cornus mas* L.) fruit extract on liver function, tumor necrosis factor α , malondialdehyde, and adiponectin in patients with non-alcoholic fatty liver: a study protocol for a double-blind randomized clinical trial. *Nutr. J.* 2019;18(1):39. DOI 10.1186/s12937-019-0465-z.
- Sasaki R., Nishimura N., Hoshino H., Isa Y., Kadowaki M., Ichi T., Horio F. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochem. Pharmacol.* 2007;74(11):1619-1627. DOI 10.1016/j.bcp.2007.08.008.
- Seeram N.P., Adams L.S., Hardy M.L., Heber D. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J. Agri. Food Chem.* 2004;52(9):2512-2517. DOI 10.1021/jf0352778.
- Shih P.H., Chan Y.C., Liao J.W., Wang M.F., Yen G.C. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* 2010;21(7):598-605. DOI 10.1016/j.jnutbio.2009.03.008.
- Shih P.H., Yeh C.T., Yen G.C. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55(23):9427-9435. DOI 10.1021/jf071933i.
- Shin D.H., Choi M.G., Kim K., Bang G., Cho M., Choi S.-B., Choi G., Park Y.-I. HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the MYB75/PAP1 transcription factor in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 2013;587:1543-1547. DOI 10.1016/j.febslet.2013.03.037.
- Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. The regulation of anthocyanin synthesis in the wheat pericarp. *Molecules*. 2014;19(12):20266-20279. DOI 10.3390/molecules191220266.
- Smeriglio A., Barreca D., Bellocchio E., Trombetta D. Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. *Phytother. Res.* 2016;30(8):1265-1286. DOI 10.1002/ptr.5642.
- Smith M., Marley K., Seigler D., Singletary K., Meline B. Bioactive properties of wild blueberry fruits. *J. Food Sci.* 2000;65:352-356. DOI 10.1111/j.1365-2621.2000.tb16006.x.
- Song F.L., Zhu Y.N., Shi Z.Y., Tian J.J., Deng X.J., Ren J., Andrews M.C., Ni H.Y., Ling W.H., Yang Y. Plant food anthocyanins inhibit platelet granule secretion in hypercholesterolaemia: involving the signaling pathway of PI3K-Akt. *Thromb. Haemost.* 2014;112:981-991. DOI 10.1160/TH13-12-1002.
- Spencer J.P.E. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British J. Nutr.* 2010;104:S40-S47. DOI 10.1017/S0007114510003934.
- Steffen Y., Gruber C., Schewe T., Sies H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;469:209-219. DOI 10.1016/j.abb.2007.10.012.
- Strathearn K.E., Yousef G.G., Grace M.H., Roy S.L., Tambe M.A., Ferruzzi M.G., Rochet J.C. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2014;1555:60-77. DOI 10.1016/j.brainres.2014.01.047.
- Strygina K.V., Börner A., Khlestkina E.K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone. *BMC Plant Biol.* 2017;17(1):184. DOI 10.1186/s12870-017-1122-3.
- Sui X., Zhang Y., Zhou W. *In vitro* and *in silico* studies of the inhibition activity of anthocyanins against porcine pancreatic α -amylase. *J. Funct. Foods*. 2016;21:50-57. DOI 10.1016/j.jff.2015.11.042.
- Sun C.D., Zhang B., Zhang J.K., Xu C.J., Wu Y.L., Li X., Chen K.S. Cyanidin-3-glucoside-rich extract from Chinese bayberry fruit protects pancreatic β cells and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Med. Food*. 2012;15(3):288-298. DOI 10.1089/jmf.2011.1806.
- Sun X.-H., Zhou T.-T., Wei C.-H., Lan W.-Q., Zhao Y., Pan Y.-J., Wu V.C.H. Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. *Food Control*. 2018;94:155-161. DOI 10.1016/j.foodcont.2018.07.012.
- Takayama F., Nakamoto K., Kawasaki H., Mankura M., Egashira T., Ueki K., Mori A. Beneficial effects of *Vitis coignetiae* Pulliat leaves on nonalcoholic steatohepatitis in a rat model. *Acta Med. Okayama*. 2009;63(2):105-111. DOI 10.18926/AMO/31835.
- Takikawa M., Inoue S., Horio F., Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J. Nutr.* 2010;140:527-533. DOI 10.3945/jn.109.118216.
- Tarozzi A., Morroni F., Merliccio A., Bolondi C., Teti G., Falconi M., Hrelia P. Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25-35) oligomer-induced toxicity. *Neurosci. Lett.* 2010;473(2):72-76. DOI 10.1016/j.neulet.2010.02.006.
- Tenditnik M.V., Tikhonova M.A., Pavlov K.S., Amstislavskaya T.G., Khlestkina E.K. Evaluating the neuroprotective potential of wheat grain with high anthocyanin content in correction of behavioral deficits induced by amyloid-beta neurotoxicity in mice. In: Belyaev conference: A triumphant event in commemoration of the centenary of the birth of Academician Dmitri Belyaev (August 7-10, 2017, Novosibirsk, Russia): Abstracts. Novosibirsk, 2017.

- Toufektsian M., Lorget M.D., Nagy N. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *J. Nutr.* 2008;138:747-752. DOI 10.1093/jn/138.4.747.
- Tsuda T. Recent progress in anti-obesity and anti-diabetes effect of berries. *Antioxidants.* 2016;5(2):13. DOI 10.3390/antiox5020013.
- Tsuda T., Ueno Y., Aoki H., Koda T., Horio F., Takahashi N., Kawada T., Osawa T. Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;316:149-157. DOI 10.1016/j.bbrc.2004.02.031.
- Wallace T.C., Slavin M., Frankenfeld C.L. Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease. *Nutrients.* 2016; 8(1):32-45. DOI 10.3390/nu8010032.
- Wang C.J., Wang J.M., Lin W.L., Chu C.Y., Chou F.P., Tseng T.H. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2000; 38(5):411-416. DOI 10.1016/S0278-6915(00)00011-9.
- Wang H., Cao G., Prior R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 1997;45(2):304-309. DOI 10.1021/jf960421t.
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 2001;126(2):485-493. DOI 10.1104/pp.126.2.485.
- Wu T., Qi X., Liu Y., Guo J., Zhu R., Chen W., Yu T. Dietary supplementation with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocyanins suppresses body weight gain in high-fat diet fed C57BL/6 mice. *Food Chem.* 2013;141(1):482-487. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.03.046.
- Xu J.W., Ikeda K., Yamori Y. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin-3-glucoside, a typical anthocyanin pigment. *Hypertension.* 2004;44:217-222. DOI 10.1161/01.HYP.0000135868.38343.c6.
- Yang M., Koo S.I., Song W.O., Chun O.K. Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review. *Curr. Med. Chem.* 2011;18(2):291-300. DOI 10.2174/092986711794088380.
- Zhang B., Kang M., Xie Q., Xu B., Sun C., Chen K., Wu Y. Anthocyanins from Chinese bayberry extract protect β cells from oxidative stress-mediated injury via HO-1 upregulation. *J. Agric. Food Chem.* 2010;59(2):537-545. DOI 10.1021/jf1035405.
- Zhang B., Schrader A. TRANSPARENT TESTA GLABRA 1-dependent regulation of flavonoid biosynthesis. *Plants.* 2017;6(4):65. DOI 10.3390/plants6040065.
- Zhu F. Anthocyanins in cereals: composition and health effects. *Food Res. Int.* 2018;109:232-249. DOI 10.1016/j.foodres.2018.04.015.
- Zhu Y., Huang X., Zhang Y., Wang Y., Liu Y., Sun R., Xia M. Anthocyanin supplementation improves HDL-associated paraoxonase 1 activity and enhances cholesterol efflux capacity in subjects with hypercholesterolemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;99(2):561-569. DOI 10.1210/jc.2013-2845.
- Zou T.-B., Feng D., Song G., Li H.-W., Tang H.-W., Ling W.-H. The role of sodium-dependent glucose transporter 1 and glucose transporter 2 in the absorption of cyanidin-3-O-beta-glucoside in Caco-2 cells. *Nutrients.* 2014;6(10):4165-4177. DOI 10.3390/nu6104165.

ORCID ID

R.S. Yudina orcid.org/0000-0001-7345-3594
E.I. Gordeeva orcid.org/0000-0003-3166-7409
O.Yu. Shoeva orcid.org/0000-0001-5289-8631
M.A. Tikhonova orcid.org/0000-0002-4265-8981
E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254

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

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

Received September 30, 2020. Revised November 17, 2020. Accepted November 18, 2020.

Следы отбора и гены-кандидаты адаптации к экстремальным факторам среды в геномах турано-монгольских пород крупного рогатого скота

Н.С. Юдин¹, А.А. Юрченко¹, Д.М. Ларкин^{1, 2} 

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

² Королевский ветеринарный колледж, Лондонский университет, Лондон, Великобритания

 dmlarkin@gmail.com

Аннотация. Изменения, происходящие в окружающей среде, заставляют популяции организмов адаптироваться к новым условиям либо за счет фенотипической пластичности, либо за счет генетических или эпигенетических изменений. Следы отбора, такие как специфические изменения частот аллелей и гаплотипов, снижение или повышение генетического разнообразия, помогают выявить изменения генома крупного рогатого скота в ответ на искусственный и естественный отбор, а также локусы и варианты, непосредственно влияющие на адаптивные и экономически важные признаки. Достижения генетики и биотехнологии дают возможность быстрого переноса уникальных генетических вариантов, возникших у местных пород крупного рогатого скота в процессе адаптации к локальной среде обитания, в геномы интернациональных высокопроизводительных пород с целью сохранения их выдающихся свойств в новых условиях обитания. Возможно и использование методов геномной селекции для повышения частот адаптивных аллелей у интернациональных пород. В обзоре рассмотрены недавние работы по истории происхождения и эволюции турано-монгольских пород крупного рогатого скота, адаптации турано-монгольского скота к экстремальным условиям среды. Сделано обобщение имеющихся сведений о потенциальных генах-кандидатах адаптации в геномах турано-монгольских пород, включая гены устойчивости к холоду, гены иммунного ответа и гены адаптации к высокогорью. Авторы приходят к выводу, что имеющиеся данные литературы не позволяют отдать предпочтение одному из двух возможных сценариев происхождения турано-монгольских пород – в результате доместикировки дикого тура на территории Восточной Азии или вследствие миграции тауринной протопопуляции из Ближнего Востока. Турано-монгольским породам свойственна высокая адаптация к экстремальным климатическим условиям (холод, жара и недостаток кислорода в горах) и паразитам (гнус, клещи, бактериальные и вирусные инфекции). В результате высокопроизводительного генотипирования и секвенирования геномов и транскриптомов представителей этих пород в последнее время были выявлены перспективные гены-кандидаты и генетические варианты, участвующие в адаптации к факторам внешней среды.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; *Bos taurus*; *Bos indicus*; турано-монгольский скот; адаптация; геном; следы отбора; холод; иммунитет; высокогорье.

Для цитирования: Юдин Н.С., Юрченко А.А., Ларкин Д.М. Следы отбора и гены-кандидаты адаптации к экстремальным факторам среды в геномах турано-монгольских пород крупного рогатого скота. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):190-201. DOI 10.18699/VJ21.023

Signatures of selection and candidate genes for adaptation to extreme environmental factors in the genomes of Turano-Mongolian cattle breeds

N.S. Yudin¹, A.A. Yurchenko¹, D.M. Larkin^{1, 2} 

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² The Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

 dmlarkin@gmail.com

Abstract. Changes in the environment force populations of organisms to adapt to new conditions, either through phenotypic plasticity or through genetic or epigenetic changes. Signatures of selection, such as specific changes in the frequency of alleles and haplotypes, as well as the reduction or increase in genetic diversity, help to identify changes in the cattle genome in response to natural and artificial selection, as well as loci and genetic variants directly affecting adaptive and economically important traits. Advances in genetics and biotechnology enable a rapid transfer of unique genetic variants that have originated in local cattle breeds in the process of adaptation to local environments into the genomes of cosmopolitan high-performance breeds, in order to preserve their outstanding performance in new environments. It is also possible to use genomic selection approach to increase the frequency of already present adaptive alleles in cosmopolitan breeds. The review examines recent work on the origin and

evolution of Turano-Mongolian cattle breeds, adaptation of Turano-Mongolian cattle to extreme environments, and summarizes available information on potential candidate genes for climate adaptation of Turano-Mongolian breeds, including cold resistance genes, immune response genes, and high-altitude adaptation genes. The authors conclude that the current literature data do not provide preference to one of the two possible scenarios of Turano-Mongolian breed origins: as a result of the domestication of a wild aurochs at East Asia or as a result of the migration of taurine proto-population from the Middle East. Turano-Mongolian breeds show a high degree of adaptation to extreme climatic conditions (cold, heat, lack of oxygen in the highlands) and parasites (mosquitoes, ticks, bacterial and viral infections). As a result of high-density genotyping and sequencing of genomes and transcriptomes, prospective candidate genes and genetic variants involved in adaptation to environmental factors have recently been identified. Key words: cattle; *Bos taurus*; *Bos indicus*; Turano-Mongolian cattle; adaptation; genome; selection signatures; cold; immunity; highlands.

For citation: Yudin N.S., Yurchenko A.A., Larkin D.M. Signatures of selection and candidate genes for adaptation to extreme environmental factors in the genomes of Turano-Mongolian cattle breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):190-201. DOI 10.18699/VJ21.023 (in Russian)

Введение

Локальные породы крупного рогатого скота (КРС) могут обладать ценными генетическими вариантами для проведения селекции и создания новых пород в ответ на возникающие вызовы животноводству, включая изменение климата, появившиеся или возрождающиеся угрозы заболеваний, инновации в области диетологии и изменившиеся запросы рынка (Kantanen et al., 2015). Достижения генетики и биотехнологии дают возможность быстрого переноса уникальных генетических вариантов, возникших у местных пород КРС в процессе адаптации к локальной среде обитания, в геномы коммерческих интернациональных высокопроизводительных пород с целью сохранения их выдающихся свойств в новых условиях обитания (Stranden et al., 2019). Для повышения частот адаптивных аллелей у коммерческих пород возможно и использование методов геномной селекции. Однако для успешного применения этих технологий недостаточно знать гены, вовлеченные в адаптацию или устойчивость к болезням; надо знать, какие именно генетические варианты вносят вклад в требуемый признак. То есть необходимо изучать геномы КРС на нуклеотидном уровне и при этом учитывать исторические взаимоотношения между породами и условия их формирования для того, чтобы отличить функционально важные генетические варианты от результатов генетического дрейфа и прохождения «бутылочного горлышка».

Целью настоящего обзора являлся анализ современного состояния проблемы происхождения и эволюции турано-монгольских пород КРС, а также обобщение имеющихся сведений о потенциальных генах-кандидатах, которые вносят вклад в адаптацию этих пород к экстремальным условиям внешней среды.

Методы

Поиск и отбор литературы были выполнены в соответствии с общепринятыми критериями, предъявляемыми к систематическим обзорам (Pautasso, 2013). Предварительно нами был составлен список турано-монгольских пород КРС (Приложение 1)¹ (Porter et al., 2016; Лазебная и др., 2018). Далее мы провели систематический поиск литературы, опубликованной в базах данных PubMed, Scopus, Web of Science и Google Scholar с января 2010 г.

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx6.pdf>

(начало широкого применения методов массового параллельного секвенирования) до января 2020 г. с использованием следующих поисковых запросов: «[Название породы] AND Cattle AND Whole genome genotyping», «[Название породы] AND Cattle AND Whole genome sequencing», «[Название породы] AND Cattle AND Transcriptome sequencing», «[Название породы] AND Cattle AND Selection signatures». Критериями для включения публикации в обзор служили: исследование хотя бы одной турано-монгольской породы либо ее гибрида с другими породами; описание секвенирования, полногеномного генотипирования или транскриптома генома турано-монгольской породы; результаты поиска следов позитивного отбора в геноме либо идентификация полиморфизма по числу копий ДНК (CNV).

Адаптация турано-монгольских пород к экстремальным условиям среды

Турано-монгольский скот – группа пород КРС, которые разводят преимущественно в Азии (см. Прил. 1) (Моисеева и др., 2006; Porter et al., 2016). По морфологии турано-монгольский скот отличается от европейских тауринных пород, особенно по форме черепа и рогов (Felius et al., 2011). Череп имеет клиновидную форму, узкую корону и углубление на лобной кости. Рога направлены вверх, а не вперед, как у большинства тауринных пород.

Многие породы турано-монгольского КРС проявляют большую выносливость и устойчивость к отрицательным температурам в результате адаптации к суровому азиатскому климату. В частности, породы азиатских степей способны выдерживать годовые колебания температуры от –50 до +35 °С (Моисеева и др., 2006). Особую адаптацию демонстрирует самая северная порода КРС в мире – якутский скот, центр разведения которого находится вблизи Северного полюса холода. Ряд морфологических признаков, таких как толстая зимняя шерсть, маленькие, покрытые мехом вымя и мошонка, эффективная терморегуляция и замедленный метаболизм при низких температурах, приводят к чрезвычайной устойчивости якутского скота к экстремальному холоду (Dmitriev, Ernst, 1989; Tapio et al., 2010). Для турано-монгольских пород характерны физическая выносливость, минимальное участие человека в их содержании, круглогодичное пребывание на свободном выпасе и сохранение жизне-способности при низкокалорийной и скудной кормовой

базе в отдельные периоды года, устойчивость к гнусу, способность переваривать грубые корма и находить их под снежным покровом (Лазебная и др., 2018). Также якутский скот, вероятно, обладает устойчивостью к туберкулезу, лейкозу и бруцеллезу (Dmitriev, Ernst, 1989).

Китайский турано-монгольский скот издавна использовался в качестве тягловой силы и ценится за свою устойчивость к паразитам, толерантность к факторам окружающей среды и физическую выносливость (Huai et al., 1993). Считается, что южный китайский скот устойчив к сырости, жаре и клещам. Северный скот, с более толстой кожей и густым волосатым покровом, устойчив к холоду и клещам. Кроме того, высокогорная тибетская порода КРС хорошо адаптирована к холоду и недостатку кислорода в высокогорных районах (Wu D.D. et al., 2018). По сравнению с чистым тауринным скотом, например голштинским, южно-китайская смешанная индицинно-тауринная порода Yunnan humped имеет высокую резистентность к тейлериозу, туберкулезу и клещам (Chen Y. et al., 2019).

Происхождение и эволюция турано-монгольских пород

Генетическая обособленность некоторых турано-монгольских пород КРС, включая якутскую, калмыцкую и монгольскую, была показана с использованием полилокусных ISSR-маркеров (Генджиева, Сулимова, 2012), а также микросателлитных ДНК-маркеров (Li M.H. et al., 2007; Svishcheva et al., 2020). Например, якутская порода выделялась в отдельный кластер при анализе 48 европейских пород по 19 микросателлитным маркерам (Li M.H., Kantanen, 2010). Другими авторами также была выявлена высокая обособленность якутского скота по сравнению с девятью другими породами КРС по данным полногеномного генотипирования. При этом калмыцкая порода оказалась родственной сербской породе буша (Iso-Touru et al., 2016), что соответствует полученным ранее этой группой данным по генетическому разнообразию мтДНК, Y-хромосомы и микросателлитных ДНК-маркеров у этих пород (Kantanen et al., 2009; Li M.H., Kantanen, 2010). Согласно результатам полногеномного анализа однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) девяти российских пород и 45 пород Евразии, якутская и калмыцкая породы формировали отдельный отдаленный кластер на дендрограмме только российских пород, построенной по алгоритму «сеть соседей» (Neighbor-Net) (Sermuyagin et al., 2018), а на дендрограмме всех евразийских пород входили в кластер пород турано-монгольского корня.

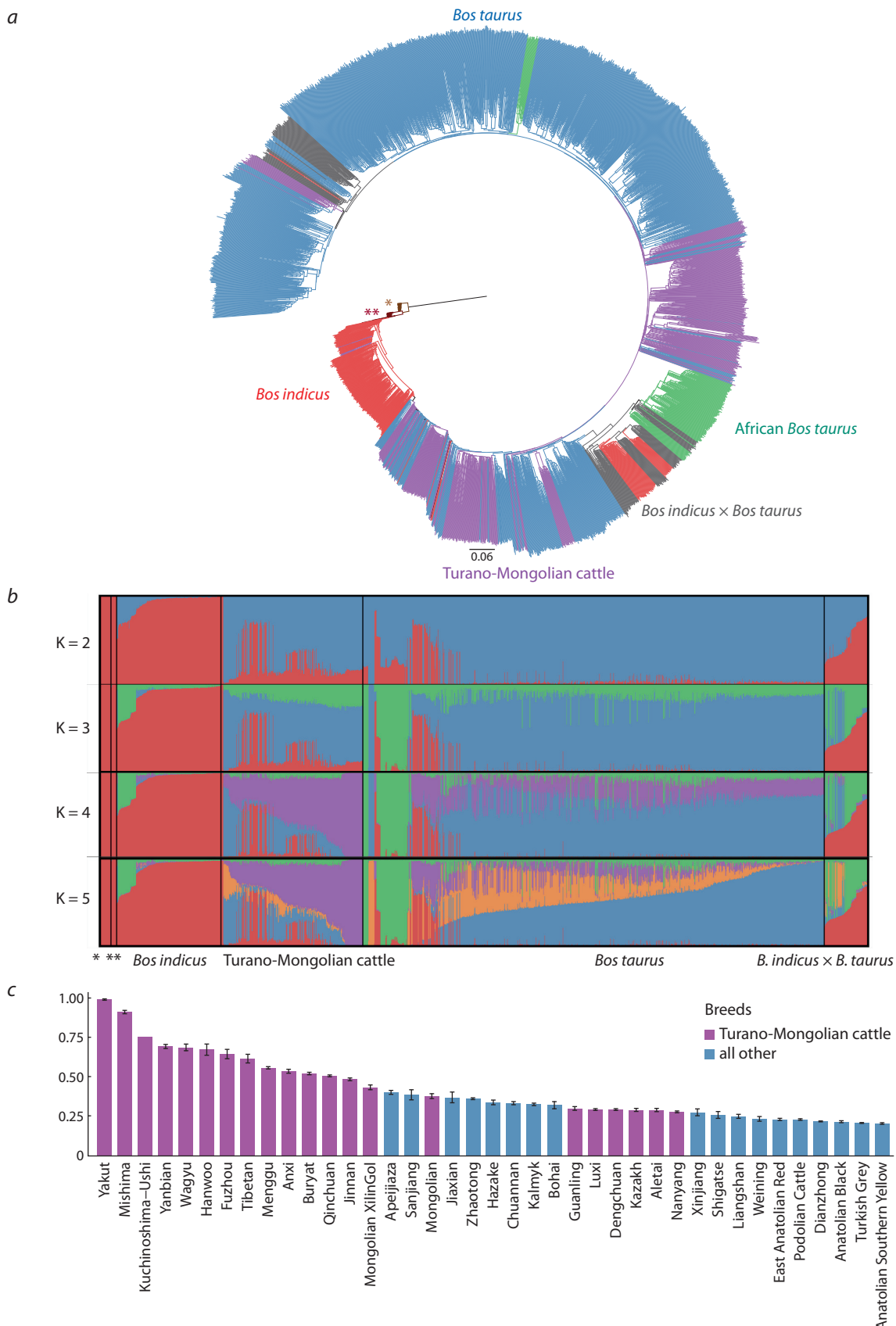
Вполне вероятно, что многие турано-монгольские породы в доисторические и исторические времена скрещивались с зебу (*Bos indicus*) (Peilieu, 1984; Huai et al., 1993; Kantanen et al., 2009), бантенгом (*Bos javanicus*) (Chen N. et al., 2018b; Zhang W. et al., 2018) и яком (*Bos grunniens*) (Xia et al., 2019). Исследования структуры популяций турано-монгольского скота в Китае по мтДНК показывают, что гаплогруппы *Bos taurus* более распространены в Северном Китае, гаплогруппы *Bos indicus* – в Южном, а породы КРС в Центральном Китае демонстрируют промежуточные частоты мтДНК зебу (Lai et al., 2006). При изучении ДНК Y-хромосомы в популяциях китайского КРС получена аналогичная географическая картина: гаплогруппа

Bos taurus Y2 преобладает на севере, а гаплогруппа *Bos indicus* Y3 – на юге Китая (Lu et al., 2017). В настоящее время многие турано-монгольские породы практически исчезли, другие для повышения продуктивности были разбавлены вливанием крови импортных тауринных пород и часто находятся под угрозой дальнейшей гибридизации (Peilieu, 1984; Huai et al., 1993; Kantanen et al., 2009; Gotoh et al., 2018). И только несколько турано-монгольских пород разводятся «в чистоте», например, в 2010 г. численность якутского скота составляла около 1200 животных (Tapió et al., 2010).

Чтобы оценить степень генетического родства и чистопородность современных турано-монгольских пород, мы собрали коллекцию опубликованных генотипов ОНП различных пород скота (Iso-Touru et al., 2016; Gao et al., 2017; Yurchenko et al., 2018b; Zhang Y. et al., 2020), насчитывающую 2676 животных из 198 пород (включая 513 животных из 23 турано-монгольских пород, Приложение 2).

После объединения и фильтрации всех файлов с генотипической информацией мы получили 18250 высококачественных ОНП для дальнейших исследований. С использованием программы rapidNJ для индивидуальных особей (Simonsen et al., 2010) была построена дендрограмма на основе метода ближайшего соседства. Большинство животных группировалось в соответствии со своими породами, формируя отдельные кластеры, относящиеся к *Bos indicus*, *Bos taurus* и африканским тауринам (см. рисунок, а). Породы турано-монгольского происхождения компактно группировались в стволе тауриновой клады, что, вероятно, отражает их древнее общее происхождение. Кластеризация животных методом ADMIXTURE (Alexander, Lange, 2011) позволила выявить при четырех-пяти кластерах отдельную предковую компоненту, выделяющую турано-монгольские породы (см. рисунок, б, фиолетовый цвет). Эта компонента почти полностью определяла якутскую породу и присутствовала в значительном количестве в остальных турано-монгольских животных (см. рисунок, в), особенно в китайских, японских и корейских породах. Ближайшей к якутской по фракции турано-монгольского скота (>90 %) породой оказалась японская порода мишима, которая никогда не смешивалась с европейскими тауринами и разводится изолированно в чистоте на острове Мишима в Японии (см. Прил. 1). В остальных породах фракция турано-монгольского скота была ниже 75 %. Таким образом, несмотря на активное смешение с коммерческими породами, древний предковый генетический компонент турано-монгольского скота все еще присутствует во многих разводимых в Азии породах.

Большинство исследователей считают, что КРС произошел от вымершего дикого тура (*Bos primigenius*) в ходе двух независимых событий доместикизации: одно из них случилось на Ближнем Востоке около 8000–10000 лет до н. э. и привело к возникновению безгорбого тауринного скота (*Bos taurus*), другое – в Южной Азии примерно в 6000–8000 лет до н. э., в результате чего появился горбатый индицинный скот зебу (*Bos indicus*) (Bradley, Magee, 2006; Bollongino et al., 2012). Однако Ларсон и Бюргер (Larson, Burger, 2013) отмечают, что характер ветвления филогенетических деревьев мтДНК и Y-хромосомной



Thoroughbredness and genetic relations of modern Turano-Mongolian breeds.

a – Dendrogram based on 18,250 single-nucleotide polymorphisms (SNPs), built by the neighbour-joining method. The dendrogram is rooted by the yak (*Bos grunniens* (*)) and the banteng (*Bos javanicus* (**)). Purple color marks Turano-Mongolian cattle; blue, taurine breeds; red, indicine cattle; green, African breeds; gray, taurine-indicine hybrid cattle. **b** – Clustering of samples by ADMIXTURE for K=2 to 5 based on ancestral allele frequencies. **c** – The proportion of the purple (Turano-Mongolian) generics for K = 5 (by the ADMIXTURE method) in different cattle breeds.

ДНК, на котором основана гипотеза о существовании двух центров доместикиации, тоже мог сформироваться в результате целого ряда сценариев, включая географическую изоляцию популяций, генетический дрейф или гибридизацию. По мнению этих авторов, необходимы дополнительные генетические сведения, прежде чем мы сможем исключить возможность того, что индицинный скот произошел в результате гибридизации предков тауринного скота с морфологически различающимися популяциями диких туров в Южной Азии.

Текущие данные по мтДНК свидетельствуют о том, что европейский домашний скот произошел от ближневосточных разновидностей *Bos taurus* (Bradley, Magee, 2006). Происхождение африканских *Bos taurus* все еще обсуждается (Bradley, Magee, 2006), но тесная связь гаплогруппы T1 с гаплогруппами T2 и T3 позволяет думать, что она также возникла на Ближнем Востоке (Achilli et al., 2008). Ранее было установлено, что геном якутской породы содержит гаплогруппу T, а именно ее уникальный вариант T4, который характерен только для турано-монгольских пород (Kantanen et al., 2009). Наличие T4 митохондриальной гаплогруппы у вагу, ханву (Mannen et al., 2004) и якутского скота (Kantanen et al., 2009) позволило предположить, что все турано-монгольские породы могут являться потомками тауринного скота, независимо доместичированного в Азии (Mannen et al., 2004; Lai et al., 2006). Однако более поздние исследования показывают, что гаплогруппа T4, вероятно, произошла от гаплогруппы T3 (Achilli et al., 2009).

Недавно нами было проведено полногеномное генотипирование представителей 18 пород КРС, разводимых в России, и осуществлено их сравнение с ранее генотипированными 135 мировыми породами КРС (Yurchenko et al., 2018b). Полученные результаты анализа филогении и общих гаплотипов выявили близкое родство бурятской и особенно якутской пород с другими азиатскими турано-монгольскими породами (вагу, ханву, монгольский скот), что может означать их раннее отделение от остальной части тауринного генофонда и, возможно, независимую доместикиацию в Азии. Zhang H. с коллегами (Zhang H. et al., 2013), проанализировав найденную в Северо-Восточном Китае в районе Харбина нижнюю челюсть КРС, датируемую 10600 годами до н.э., предположили, что древние люди могли экспериментировать с содержанием диких животных в неволе. Сравнение между мтДНК из нижней челюсти и митогеномами современных видов КРС показало, что древняя мтДНК принадлежит к новой и уникальной гаплогруппе типа C. Тем не менее ряд авторов считает, что такие утверждения преждевременны (Lu et al., 2017). По их мнению, найденная челюсть принадлежит ныне вымершей восточноазиатской форме *Bos primigenius*, которая не внесла генетического вклада в возникший позднее домашний скот.

Таким образом, существуют два возможных сценария доместикиации турано-монгольского скота: 1) домашний скот был независимо одомашнен коренным населением в Восточной Азии от диких туров (*Bos primigenius*); 2) тауринный домашний скот был одомашнен на Ближнем Востоке и затем завезен в Восточную Азию, а наблюдаемые различия являются результатом локальной адаптации

и/или гибридизации. Существующих зооархеологических и генетических данных недостаточно, чтобы сделать однозначный вывод о доместикиации турано-монгольских пород на территории современного Китая.

Гены-кандидаты адаптации в геномах турано-монгольских пород

Далее мы сосредоточимся на анализе потенциальных генов-кандидатов, участвующих в формировании генетической адаптации к экстремальным условиям среды у турано-монгольских пород КРС, в том числе по данным полногеномного секвенирования (см. таблицу). По сравнению с данными полногеномного генотипирования ОНП, результаты полногеномного секвенирования дают большую статистическую мощность при выявлении следов отбора и лучшее разрешение для локализации потенциальных генов-кандидатов и генетических вариантов, непосредственно влияющих на адаптацию, поскольку они не привязаны к аллелям, размещенным на чипах, которые нередко представлены только в популяциях, использованных для создания чипа (Boitard et al., 2016).

Гены устойчивости к холоду

Полногеномное генотипирование (более 100 тысяч ОНП) позволило выявить уникальные следы отбора в геноме якутской породы, которые могут быть непосредственно связаны с адаптацией к холодному климату. Представляет интерес обнаружение следов селекции в районе гена *RETREG1* (Yurchenko, 2018a). У человека белок RETREG1 участвует в восприятии нейронами сигналов боли и холода (Islam et al., 2018). Мутации в этом гене у людей вызывают наследственную невропатию, сопровождающуюся неспособностью ощущать боль и температуру окружающей среды (Kurth et al., 2009). Рибосомальный ген *RPL7* в районе селекции у якутской породы показывает различную экспрессию у устойчивых и чувствительных к замораживанию лягушек (Wu S. et al., 2008). Следы селекции были зафиксированы у якутского скота также в районе гена *HDAC3*, белок которого стимулирует термогенез в бурой жировой ткани путем активации энхансеров, и гена *TNKS*, участвующего в энергообмене и формировании жировой ткани у мышей (Yeh et al., 2009).

Данные полногеномного секвенирования животных якутской породы позволили выявить в ее геноме 1442 гена, которые содержали более пяти несинонимичных ОНП (Weldenegodguad et al., 2019). Были найдены следы отбора в ряде генов (*DNAJC9*, *SOC33*, *TRPC7*, *SLC8A1*, *GLP1R*, *PKLR* и *TCF7L2*), которые, вероятно, связаны с адаптацией к холоду у коренного населения Сибири (Cardona et al., 2014). Причем ген *SLC8A1*, белковый продукт которого участвует в ответе клетки на окислительный стресс, вероятно, подвергался отбору не только у якутского скота и коренного населения Сибири, но также у местных якутских лошадей (Librado et al., 2015). Хронический холодовой стресс увеличивал экспрессию мРНК гена *SOC33* в гипоталамусе и периферических мононуклеарных клетках крови у крыс и хорьков (Reynés et al., 2017). Три гена (*PFKM*, *ADAM17* и *SIRPA*), подвергавшихся селекции у якутского скота, оказались ассоциированы с устойчивостью к заболеваниям (Weldenegodguad et al., 2019). Так,

Candidate adaptation genes in the genomes of Turano-Mongolian cattle breeds

Breed(s)	Method	No. animals	Candidate genes	Reference
Cold resistance genes				
Yakut	Genotyping the GGP HD150K array	26	<i>RETREG1, RPL7, HDAC3, TNKS</i>	Yurchenko et al., 2018a
	Whole genome resequencing	5	<i>DNAJC9, SOCS3, TRPC7, SLC8A1, GLP1R, PKLR, TCF7L2, PFKM, ADAM17, SIRPA</i>	Weldenegodguad et al., 2019
Yanbian	Whole genome resequencing	9	<i>CD36, FGF5</i>	Shen et al., 2020
Immune response genes				
Yakut	Genotyping on the BovineSNP50 array	40	<i>CSK, GZMB, PML, SEMA7A</i>	Iso-Touru et al., 2016
Kalmyk	Genotyping on the BovineSNP50 array	22	<i>IL10, IL19, IL20, PIGR, FCAMR, IL24</i>	Iso-Touru et al., 2016
Yakut	Sequencing of the white blood cell transcriptome	3	<i>CCL@, CHST@, CXCR@, GAS@, GZM@, IGFBP@, NCR@</i>	Pokharel et al., 2019
Hanwoo	Whole genome resequencing	12	<i>RCN2</i>	Lee T. et al., 2013
	Genotyping on the BovineHD array	217	<i>CD14, CD28, RFX5, TNFAIP8L2, TMEM173, IL17D, TGFB1, NFKBIA</i>	Porto-Neto et al., 2014
Wagyu, Leiqiong, Nanyang, Luxi, Yunnan, Qinchuan, Yanbian	Whole genome resequencing	57	<i>BOLA-DQA2, AUH, CXCL14, IL1RL2, EPB42, A2M, BLA-DQB, HSPA9, IFNA16, IL15, IL2, PROCR, SP3, VAMP7, TLR4, EGLN2, SOX5, CD59, GPR50, TAS2R16, NFIB, FZD10, KIF2B, ROBO1</i>	Mei et al., 2019
Yunnan humped	Sequencing of the transcriptome of liver and spleen cells	5	<i>C1QB, CD55, MASP2, C4BPA, MAVS, NOD2, CD46, C2, SERPING1, SERPINE1, TIRAP, TLR2, TLR6</i>	Chen Y. et al., 2019
Wagyu × Fuzhou	Genotyping on the BovineHD array	364	<i>TLR9, TAFA1, GPX8, IL5, PRDM9, GRIK2</i>	Wang Z. et al., 2019
Highland adaptation genes				
Tibetan	Whole genome resequencing	20	<i>EGLN1, EGLN2, HIF3a</i>	Wu D.D. et al., 2018
		9	<i>COPS5, IL1A, IL1B, MMP3, EGLN1, RYR2, SDHD</i>	Chen N. et al., 2018a
	Genotyping on the BovineHD array	15	<i>LETM1, TXNRD2, STUB1</i>	Zhang Y. et al., 2020

белок ADAM17 регулирует восприятие болевых стимулов, в том числе и холода (Quarta et al., 2019).

Сравнительный анализ данных полногеномного секвенирования китайской турано-монгольской породы Yanbian и африканской тауриной породы N'Dama показал наличие у животных обеих пород следов отбора в гене *CD36* (Shen et al., 2020). Белок CD36 играет важную роль в мембранном транспорте жирных кислот в сердце, скелетной мускулатуре и жировой ткани (Glatz et al., 2010). Экспрессия CD36 увеличивается при холодовом воздействии, что повышает поглощение бурой жировой тканью триглицерид-богатых липопротеинов (Bartelt et al., 2011). У голодающих мышей, нокаутных по гену *CD36*, вскоре после воздействия холода температура тела резко снижалась, причем эта гипотермия сопровождалась заметным снижением как уровня глюкозы в крови, так и запасов триацилглицеринов в бурой жировой ткани и гликогена в скелетной мускулатуре (Putri et al., 2015). Известно, что у животных породы Yanbian экспрессия гена *CD36* положительно коррелирует с содержанием внутримышечного жира (мраморностью) (Jeong et al., 2012). По-видимому, именно обширные запасы жира способствуют резистент-

ности к холоду у животных. Эти же авторы выявили достоверный сигнал в гене *FGF5* по данным поиска районов отбора у породы Yanbian (Shen et al., 2020). Белок FGF5 регулирует рост волосяного фолликула и длину волоса у кошки, собаки и человека (Higgins et al., 2014). Порода Yanbian характеризуется длинным и густым волосяным покровом, который помогает ей адаптироваться к зимним температурам до -37°C .

Гены иммунного ответа

Одна из первых работ по поиску следов селекции у двух турано-монгольских пород – якутской и калмыцкой – была выполнена путем генотипирования ОНП маркеров на чипе Illumina BovineSNP50 (Iso-Touru et al., 2016). У калмыцкой породы и четырех других пород авторы нашли следы селекции в районе 4116037–4616037 п. н. на хромосоме 16, который содержит шесть генов иммунной системы (*IL10, IL19, IL20, PIGR, FCAMR* и *IL24*). У турано-монгольской якутской и тауриновой серой украинской породы следы селекции были выявлены на хромосоме 21 в районе 33802673–35302673 п. н., который содержит четыре гена иммунной системы (*CSK, GZMB, PML* и *SEMA7A*).

Секвенирование транскриптома крови показало, что у животных якутской породы по сравнению с голштинской повышена экспрессия 89 генов (Pokharel et al., 2019). К числу семейств, в которых повышена экспрессия двух и более генов, относятся хемокины (*CCL4*, *CCL5*), углеводные сульфотрансферазы (*CHST1*, *CHST12*), хемокиновые рецепторы (*CX3CR1*, *CXCR6*), блокирующие рост специфические белки (*GAS6*, *GAS7*), гранзимы (*GZMB*, *GZMM*, *GZMH*), белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста (*IGFBP4*, *IGFBP7*), а также рецепторы естественной цитотоксичности (*NCR1*, *NCR3*). Так, у якутского скота авторы выявили повышение экспрессии четырех транскриптов гранзимов и перфорина. Гранзимы являются сериновыми протеазами, которые используются цитотоксическими лимфоцитами для уничтожения злокачественных и зараженных вирусом клеток. Гранзимы транспортируются в цитоплазму клетки-мишени перфорином 1 (PRF1), после чего они расщепляют специфические белки и запускают апоптоз (Johnson et al., 2003). Полученные данные свидетельствуют о наличии очень сильной опосредованной гранзимами иммунной реакции у якутского скота.

Полногеномное секвенирование представителей породы ханву позволило выявить протяженный район гомозиготности вблизи гена *RCN2* (Lee T. et al., 2013). По мнению авторов, именно отбор по гену *RCN2* привел к формированию у ханву устойчивости к вирусу папилломы КРС. Другие авторы использовали данные полногеномного секвенирования для поиска породоспецифических генов у ханву путем анализа прочтений, которые не выровнялись на референсный геном (Caetano-Anolles et al., 2018). Оказалось, что значительное число белковых доменов этих генов ассоциировано с функцией иммуноглобулинов и они потенциально могут взаимодействовать с доменами других белков иммунной системы.

Генотипирование животных породы ханву примерно по 680 тысячам ОНП позволило найти следы отбора в локусах, содержащих целый ряд генов иммунной системы, например *CD14*, *CD28*, *RFX5*, *TNFAIP8L2*, *TMEM173*, *IL17D*, *TGFB1* и *NFKB1A* (Porto-Neto et al., 2014). Белок, кодируемый геном *CD14*, является поверхностным антигеном, который экспрессируется преимущественно на моноцитах/макрофагах и участвует в формировании врожденного иммунитета на бактериальные липополисахариды (Tsukamoto et al., 2018). Рецептор *CD28* связывается с токсинами стафилококков и стрептококков и запускает выделение цитокинов и Т-клеточный иммунный ответ (Kaempfer et al., 2013). Интерлейкин-17D (*IL17D*) стимулирует инфильтрацию нейтрофилов, естественных киллеров и моноцитов в ответ на инфекцию цитомегаловируса у мышей (Seelige et al., 2018). Транскрипционный фактор *RFX5* опосредует экспрессию генов *MHC-II* и, таким образом, играет значительную роль в адаптивном иммунном ответе (Garvie et al., 2007). Белок *TNFAIP8L2* считается репрессором врожденного и адаптивного иммунитета и участвует в поддержании иммунного гомеостаза (Niture et al., 2019). Белок *STING*, кодируемый геном *TMEM173*, входит в состав белкового комплекса, который распознает нуклеиновые кислоты вирусов и бактерий в цитозоле и активирует транскрипцию интерферонов первого типа

(Motwani et al., 2019). Экспрессия мРНК *NFKB1A* в линии клеток почки свиньи изменялась при инфицировании вирусом ящура (Zhang T. et al., 2018).

Анализ регионов с вариацией по числу копий ДНК (CNV) по данным полногеномного секвенирования животных, представляющих шесть аборигенных китайских пород скота (Leiqiong, Nanyang, Luxi, Yunnan, Qinchuan, Yanbian) и две интернациональные специализированные мясные породы (вагу, красный ангус), позволил выявить 11 486 CNV регионов, покрывающих 52.04 млн п. н. (1.96 %) от референсного генома (Mei et al., 2019). У китайского скота авторами были идентифицированы многочисленные локализованные в CNV регионах гены, которые связаны с иммунным ответом. Так, ген *BOLA-DQA2* может быть критическим фактором в резистентности к маститу у молочного скота (Hou et al., 2012). CNV в этом гене ассоциирована с иммунным ответом у яка (Zhang X. et al., 2016). Сообщалось, что гены *AUH*, *CXCL14*, *IL1RL2* и *EPB42* влияют на толерантность к паразитам у различных пород скота (Mustafa et al., 2018). Ряд генов, в том числе *A2M*, *BLA-DQB*, *HSPA9*, *IFNA16*, *IL15*, *IL2*, *PROCR*, *SP3*, *VAMP7* и *TLR4*, связаны, по данным многочисленных исследований, с иммунным ответом (Mei et al., 2016; Randhawa et al., 2016). Несколько генов иммунной системы активируются в ответ на внешнее воздействие, например *EGLN2* (Wu D.D. et al., 2018), *SOX5* (Liu, Bickhart, 2012), *CD59* (Chan et al., 2010), *GPR50*, *TAS2R16* (Gautier et al., 2016), *NFIB* (Zhao et al., 2017), а также *FZD10*, *KIF2B* и *ROBO1* (Ai et al., 2015).

Сравнение путем секвенирования РНК дифференциально экспрессирующихся генов в печени и селезенке показало, что экспрессия некоторых генов, связанных с иммунной функцией (*CIQB*, *CD55*, *MASP2*, *C4BPA*, *MAVS*, *NOD2* и *CD46*), была повышена у животных породы Yunnan humped по сравнению с голштинами, в то время как экспрессия других генов (*C2*, *SERPING1*, *SERPINE1*, *TIRAP*, *TLR2* и *TLR6*) была понижена (Chen Y. et al., 2019). Ген *CIQB* кодирует В-цепь компонента комплемента 1q, участвуя в формировании врожденного иммунитета, а также считается одним из хабов реакции организма на инфицирование *Mycobacterium tuberculosis* (Sambarey et al., 2017). Ген *CD46* кодирует белок, который является компонентом системы комплемента и может служить в качестве рецептора для вируса кори, герпес-вируса человека 6-го типа и бактерии *Neisseria* (Yamamoto et al., 2013). Другой белок комплемента, *CD55*, ассоциирован с малярией и аутоиммунными заболеваниями (Dho et al., 2018). Компонент комплемента *C2* участвует в очищении тканей от апоптотических клеток, и генетические варианты этого гена ассоциированы с красной волчанкой (Chen H.H. et al., 2015). Ген *MASP2* кодирует белок, который относится к семейству сериновых пептидаз S1. В исследовании (Kasaptoentalib et al., 2017) мыши с нокаутом по этому гену чаще гибли, по сравнению с контролем, при пневмококковом менингите. Белок *C4BPA* входит в состав мультимерного белка *C4BP*, контролирующего активацию комплемента по классическому пути. *C4BP* связывается некоторыми патогенами, в частности *Streptococcus pyogenes*, что обеспечивает этим бактериям выживание в организме хозяина (Ermer, Blom, 2016). Белок *MAVS* необходим для активи-

вации транскрипционных факторов, которые регулируют экспрессию бета-интерферона и, таким образом, запускают реакции противовирусного иммунитета (Belgnaoui et al., 2011). Ген *NOD2* экспрессируется преимущественно в лейкоцитах. Его белковый продукт участвует в иммунном ответе на бактериальные липополисахариды путем распознавания мурамилдипептида и активации белка NFkB (Kuss-Duerkop, Keestra-Gounder, 2020). У человека ОНП маркеры в гене *SERPINE1* ассоциированы с повышенной смертностью от сепсиса (Shi et al., 2015). Толл-подобный рецептор TLR6 образует гетеродимерный комплекс с TLR2, который распознаёт целый ряд патоген-связанных молекулярных структур. ОНП маркеры в генах *TLR2* и *TLR6* ассоциированы с чувствительностью КРС к *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*, а также к туберкулезу и филляриозу у человека (Mukherjee et al., 2019).

Генотипирование на чипах высокой плотности гибридов вагу с породой Fuzhou позволило идентифицировать следы отбора в ряде генов (*TLR9*, *TAF1*, *GPX8*, *IL5*, *PRDM9* и *GRIK2*), ассоциированных с иммунной функцией (Wang Z. et al., 2019). Внутриклеточный толл-подобный рецептор TLR9 обычно распознает патогены, проникающие внутрь клетки (Mukherjee et al., 2019). ОНП маркеры в гене *TLR9* у человека ассоциированы с иммунным ответом при туберкулезе (Bharti et al., 2014). Ген *TAF1* кодирует небольшой, сходный с хемокинами белок, который экспрессируется преимущественно в определенных областях мозга и функционирует в качестве регулятора иммунных и нервных клеток (нейрокина) (Tom Tang et al., 2004). Цитокин IL5 является фактором роста и дифференцировки В-клеток и эозинофилов (Takatsu, 2011).

Гены адаптации к высокогорью

Как полагают, як обитает на Тибетском плато на протяжении миллионов лет и за это время приобрел многочисленные адаптации к условиям высокогорья, например увеличенный размер легких и сердца. В отличие от яка, домашний тауринный скот появился на Тибетском плато вместе с людьми всего несколько тысяч лет назад. Быстрой адаптации тибетского скота к условиям высокогорья, вероятно, способствовала интрогрессия генов сигнального пути ответа на гипоксию (например, *EGLN1*, *EGLN2* и *HIF3a*) (Wu D.D. et al., 2018). Эти же авторы показали, что тибетский скот, имеющий гаплотип *EGLN1* от яка, тоже имеет сниженную концентрацию гемоглобина и число эритроцитов в крови, что расценивается как адаптивный признак.

Другая группа исследователей на основании данных полногеномного секвенирования установила, что в среднем 1.22 % генома тибетского скота произошли в результате интрогрессии от яка примерно две тысячи лет назад (Chen N. et al., 2018a). Анализ списка интродуцированных генов выявил достоверное обогащение тремя терминами генной онтологии: сенсорное восприятие запаха (GO:0007608), трансмембранный транспорт L-орнитина (GO:1903352), а также процессинг антигена и презентация пептидных или полисахаридных антигенов с помощью белков главного комплекса гистосовместимости класса II (GO:0002504). Поиск по базе данных KEGG показал, что наибольшая группа интродуцированных

генов была вовлечена в реакцию «трансплантат против хозяина». В геноме тибетского скота в районах интрогрессии было найдено несколько генов, которые могли участвовать в адаптации к гипоксии. К ним относятся гены метаболического пути индуцируемого гипоксией фактора – *COPS5*, *IL1A*, *IL1B*, *MMP3* и *EGLN1*, которые неоднократно были идентифицированы в качестве мишеней для отбора на адаптацию к высокогорью у жителей Анд, Тибета и у яка (Bigham et al., 2010; Qiu et al., 2012). Два гена, *RYR2* и *SDHD*, участвуют в регуляции гомеостаза кальция, который опосредует реакцию на гипоксию (Wang M.S. et al., 2015).

Сравнительный анализ районов CNV у высокогорного тибетского скота и равнинного монгольского (Menggu) по данным полногеномного генотипирования на биочипе Illumina BovineHD Genotyping BeadChip позволил идентифицировать три потенциальных гена-кандидата (*LETM1*, *TXNRD2* и *STUB1*) адаптации к гипоксии (Zhang Y. et al., 2020). Ген *LETM1* кодирует белок, встроенный во внутреннюю мембрану митохондрий, который играет существенную роль в поддержании нормальной морфологии этих органелл и жизнеспособности клеток (Li Y. et al., 2019). Опосредованная аденовирусом сверхэкспрессия гена *LETM1* может приводить к снижению выработки АТФ, потребления кислорода и массы митохондрий, а также к некротической гибели клеток HeLa (Piao et al., 2009). В геноме тибетского скота было выявлено пониженное число копий гена *LETM1*, что может способствовать адаптации этих животных к гипоксии путем сохранения нормальной морфологии и жизнедеятельности митохондрий. Ген *TXNRD2* кодирует митохондриальную тиоредоксин-редуктазу типа 2. У мышей со специфическим нокаутом этого гена в сердце наблюдаются дегенерация митохондрий и стабилизация фактора HIF-1 альфа (Kiermayer et al., 2015). Белок STUB1 представляет собой E3 убиквитинлигазу и играет существенную роль в убиквитинировании и деградации фактора HIF-1 альфа (Ferreira et al., 2013).

Закключение

Проведенный нами анализ литературы позволяет сделать следующие выводы:

- турано-монгольским породам свойственна высокая адаптация к экстремальным климатическим условиям и паразитам, обусловленная селекцией в районах генов иммунного ответа и терморегуляции;
- несмотря на активное смешение с коммерческими породами, древний предковый генетический компонент турано-монгольского скота все еще присутствует во многих разводимых в Азии породах КРС, а якутский скот остался, по-видимому, единственным чистокровным носителем этой компоненты;
- имеющиеся в настоящее время данные литературы не позволяют отдать предпочтение одному из двух возможных сценариев происхождения турано-монгольских пород – в результате доместикировки дикого тура на территории Восточной Азии или вследствие миграции тауринной протопопуляции из Ближнего Востока;
- в результате высокопроизводительного генотипирования и секвенирования геномов и транскриптомов представителей турано-монгольских пород в последнее

время были найдены перспективные гены-кандидаты, участвующие в адаптации к факторам внешней среды.

Дальнейшие исследования в этой области должны быть направлены на: 1) накопление генетических и палеогенетических данных, которые позволят сделать окончательный вывод о происхождении турано-монгольской группы пород; 2) создание референсного турано-монгольского генома и его независимой аннотации для детального сравнения турано-монгольских пород, поскольку значительные отличия от существующего референсного генома (герефорда) могут приводить к невыявлению генетических различий, характерных только для турано-монгольских пород в сильно дивергированных участках их геномов; 3) определение роли высокочастотных замен, характерных для турано-монгольских пород, и их введение в селекционно-племенную работу коммерческих пород путем генного редактирования.

Список литературы / References

- Генджиева О.Б., Сулимова Г.Е. Анализ взаимоотношений между породами крупного рогатого скота турано-монгольской группы на основе ДНК-полиморфизма. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2012;2:14-16.
- [Gendzhieva O.B., Sulimova G.E. The analysis of mutual relations between breeds of horned cattle of the Turano-Mongolian group on the basis of DNA polymorphism. *Aktual'nyye Voprosy Veterinarnoy Biologii = Actual Questions of Veterinary Biology*. 2012;2:14-16. (in Russian)]
- Дунин И.М., Данкверт А.Г. (ред.). Справочник пород и типов сельскохозяйственных животных, разводимых в Российской Федерации. М.: ВНИИплем, 2013.
- [Dunin I.M., Dankvert A.G. (Eds.) Breeds and Types of Farm Animals in the Russian Federation. Moscow: All-Russia Research Institute of Animal Breeding, 2013. (in Russian)]
- Лазебная И.В., Перчун А.В., Лхасаранов Б.Б., Лазебный О.Е., Столповский Ю.А. Генетическая изменчивость бурятской и алтайской пород крупного рогатого скота, оцененная на основе анализа полиморфизма генов *GHI*, *GHR* и *PRL*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(6):734-741. DOI 10.18699/VJ18.417.
- [Lazebnaya I.V., Perchun A.V., Lhasaranov B.B., Lazebny O.E., Stolpovskiy Yu.A. Analysis of *GHI*, *GHR* and *PRL* gene polymorphisms for estimation of the genetic diversity of Buryat and Altai cattle breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(6):734-741. DOI 10.18699/VJ18.417.]
- Моисеева И.Г., Уханов С.В., Столповский Ю.А., Сулимова Г.Е., Каштанов С.Н. Генофонды сельскохозяйственных животных. Генетические ресурсы животноводства России. М.: Наука, 2006.
- [Moiseeva I.G., Ukanov S.V., Stolpovsky Yu.A., Sulimova G.E., Kashtanov S.N. Gene Pools of Farm Animals. Moscow: Nauka Publ., 2006. (in Russian)]
- Achilli A., Bonfiglio S., Olivieri A., Malusà A., Pala M., Hooshiar Kashani B., Perego U.A., Ajmone-Marsan P., Liotta L., Semino O., Bandelt H.J., Ferretti L., Torroni A. The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome. *PLoS One*. 2009; 4(6):e5753. DOI 10.1371/journal.pone.0005753.
- Achilli A., Olivieri A., Pellecchia M., Ubaldi C., Colli L., Al-Zahery N., Accetturo M., Pala M., Hooshiar Kashani B., Perego U.A., Battaglia V., Fornarino S., Kalamati J., Houshmand M., Negrini R., Semino O., Richards M., Macaulay V., Ferretti L., Bandelt H.J., Ajmone-Marsan P., Torroni A. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Curr. Biol.* 2008;18(4):R157-158. DOI 10.1016/j.cub.2008.01.019.
- Ai H., Fang X., Yang B., Huang Z., Chen H., Mao L., Zhang F., Zhang L., Cui L., He W., Yang J., Yao X., Zhou L., Han L., Li J., Sun S., Xie X., Lai B., Su Y., Lu Y., Yang H., Huang T., Deng W., Nielsen R., Ren J., Huang L. Adaptation and possible ancient interspecies introgression in pigs identified by whole-genome sequencing. *Nat. Genet.* 2015;47(3):217-225. DOI 10.1038/ng.3199.
- Alexander D.H., Lange K. Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12:246. DOI 10.1186/1471-2105-12-246.
- Bartelt A., Bruns O.T., Reimer R., Hohenberg H., Ittrich H., Peldschus K., Kaul M.G., Tromsdorf U.I., Weller H., Waurisch C., Eychemüller A., Gordts P.L., Rinninger F., Bruegelmann K., Freund B., Nielsen P., Merkel M., Heeren J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* 2011;17(2):200-205. DOI 10.1038/nm.2297.
- Belgnaoui S.M., Paz S., Hiscott J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr. Opin. Immunol.* 2011;23(5):564-572. DOI 10.1016/j.coi.2011.08.001.
- Bharti D., Kumar A., Mahla R.S., Kumar S., Ingle H., Shankar H., Joshi B., Raut A.A., Kumar H. The role of TLR9 polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Immunogenetics*. 2014; 66(12):675-681. DOI 10.1007/s00251-014-0806-1.
- Bigham A., Bauchet M., Pinto D., Mao X., Akey J.M., Mei R., Scherer S.W., Julian C.G., Wilson M.J., López Herráez D., Brutsaert T., Parra E.J., Moore L.G., Shriver M.D. Identifying signatures of natural selection in Tibetan and Andean populations using dense genome scan data. *PLoS Genet.* 2010;6(9):e1001116. DOI 10.1371/journal.pgen.1001116.
- Boitard S., Boussaha M., Capitan A., Rocha D., Servin B. Uncovering adaptation from sequence data: lessons from genome resequencing of four cattle breeds. *Genetics*. 2016;203(1):433-450. DOI 10.1534/genetics.115.181594.
- Bollongino R., Burger J., Powell A., Mashkour M., Vigne J.D., Thomas M.G. Modern taurine cattle descended from small number of near-eastern founders. *Mol. Biol. Evol.* 2012;29(9):2101-2104. DOI 10.1093/molbev/mss092.
- Bradley D.G., Magee D.A. Genetics and the origins of domestic cattle. In: Zeder M.A., Bradley D.G., Emshwiller E., Smith B.D. (Eds.). Documenting Domestication: New Genetic and Archaeological Paradigms. Berkeley: Univ. of California Press, 2006;317-328.
- Caetano-Anolles K., Kim K., Kwak W., Sung S., Kim H., Choi B.H., Lim D. Genome sequencing and protein domain annotations of Korean Hanwoo cattle identify Hanwoo-specific immunity-related and other novel genes. *BMC Genet.* 2018;19(1):37. DOI 10.1186/s12863-018-0623-x.
- Cai X., Chen H., Wang S., Xue K., Lei C. Polymorphisms of two Y chromosome microsatellites in Chinese cattle. *Genet. Sel. Evol.* 2006;38(5):525-534.
- Cardona A., Pagani L., Antao T., Lawson D.J., Eichstaedt C.A., Yngvadottir B., Shwe M.T., Wee J., Romero I.G., Raj S., Metspalu M., Vilems R., Willerslev E., Tyler-Smith C., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Kivisild T. Genome-wide analysis of cold adaptation in indigenous Siberian populations. *PLoS One*. 2014;9(5):e98076. DOI 10.1371/journal.pone.0098076.
- Chan E.K., Nagaraj S.H., Reverter A. The evolution of tropical adaptation: comparing taurine and zebu cattle. *Anim. Genet.* 2010;41(5): 467-477. DOI 10.1111/j.1365-2052.2010.02053.x.
- Chen H.H., Tsai L.J., Lee K.R., Chen Y.M., Hung W.T., Chen D.Y. Genetic association of complement component 2 polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 2015;86(2): 122-133. DOI 10.1111/tan.12602.
- Chen N., Cai Y., Chen Q., Li R., Wang K., Huang Y., Hu S., Huang S., Zhang H., Zheng Z., Song W., Ma Z., Ma Y., Dang R., Zhang Z., Xu L., Jia Y., Liu S., Yue X., Deng W., Zhang X., Sun Z., Lan X., Han J., Chen H., Bradley D.G., Jiang Y., Lei C. Whole-genome resequencing reveals world-wide ancestry and adaptive introgression events of domesticated cattle in East Asia. *Nat. Commun.* 2018a; 9(1):2337. DOI 10.1038/s41467-018-04737-0.
- Chen N., Huang J., Zulfiqar A., Li R., Xi Y., Zhang M., Dang R., Lan X., Chen H., Ma Y., Lei C. Population structure and ancestry of

- Qinchuan cattle. *Anim. Genet.* 2018b;49(3):246-248. DOI 10.1111/age.12658.
- Chen Y., Zeng B., Shi P., Xiao H., Chen S. Comparative analysis of the liver and spleen transcriptomes between Holstein and Yunnan humped cattle. *Animals (Basel)*. 2019;9(8):527. DOI 10.3390/ani9080527.
- Choy Y.H., Seo J.H., Park B., Lee S., Choi J., Jung K., Kong H. Studies on genetic diversity and phylogenetic relationships of Chikso (Korea native brindle cattle) using the microsatellite marker. *J. Life Sci.* 2015;25:624-630. DOI 10.5352/JLS.2015.25.6.624.
- Decker J.E., McKay S.D., Rolf M.M., Kim J., Molina Alcalá A., Sonstegard T.S., Hanotte O., Götherström A., Seabury C.M., Praharañi L., Babar M.E., Correia de Almeida Regitano L., Yildiz M.A., Heaton M.P., Liu W.S., Lei C.Z., Reecy J.M., Saif-Ur-Rehman M., Schnabel R.D., Taylor J.F. Worldwide patterns of ancestry, divergence, and admixture in domesticated cattle. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004254. DOI 10.1371/journal.pgen.1004254.
- Dho S.H., Lim J.C., Kim L.K. Beyond the role of CD55 as a complement component. *Immune Netw.* 2018;18(1):e11. DOI 10.4110/in.2018.18.e11.
- Dmitriev N.G., Ernst L.K. (Eds.). *Animal Genetics Resources of the USSR*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1989. Available at <http://www.fao.org/3/ah759e/ah759e00.htm>. Retrieved at October 2, 2019.
- Ermert D., Blom A.M. C4b-binding protein: the good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol. Lett.* 2016;169:82-92. DOI 10.1016/j.imlet.2015.11.014.
- Felici M., Koolmees P.A., Theunissen B., European Cattle Genetic Diversity Consortium, Lenstra J.A. On the breeds of cattle – historic and current classifications. *Diversity*. 2011;3:660-692. DOI 10.3390/d3040660.
- Ferreira J.V., Fôfo H., Bejarano E., Bento C.F., Ramalho J.S., Girão H., Pereira P. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. 2013;9(9):1349-1366. DOI 10.4161/auto.25190.
- Gao Y., Gautier M., Ding X., Zhang H., Wang Y., Wang X., Faruque M.O., Li J., Ye S., Gou X., Han J., Lenstra J.A., Zhang Y. Species composition and environmental adaptation of indigenous Chinese cattle. *Sci. Rep.* 2017;7(1):16196. DOI 10.1038/s41598-017-16438-7.
- Garvie C.W., Stagno J.R., Reid S., Singh A., Harrington E., Boss J.M. Characterization of the RFX complex and the RFX5(L66A) mutant: implications for the regulation of MHC class II gene expression. *Biochemistry*. 2007;46(6):1597-1611.
- Gautier M., Moazami-Goudarzi K., Levéziel H., Parinello H., Grohs C., Rialle S., Kowalczyk R., Flori L. Deciphering the wisent demographic and adaptive histories from individual whole-genome sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33(11):2801-2814. DOI 10.1093/molbev/msw144.
- Glatz J.F., Luiken J.J., Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol. Rev.* 2010;90(1):367-417. DOI 10.1152/physrev.00003.2009.
- Gotoh T., Nishimura T., Kuchida K., Mannen H. The Japanese Wagyu beef industry: current situation and future prospects – a review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2018;31(7):933-950. DOI 10.5713/ajas.18.0333.
- Higgins C.A., Petukhova L., Harel S., Ho Y.Y., Drill E., Shapiro L., Wajid M., Christiano A.M. FGF5 is a crucial regulator of hair length in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(29):10648-10653. DOI 10.1073/pnas.1402862111.
- Hou Q., Huang J., Ju Z., Li Q., Li L., Wang C., Sun T., Wang L., Hou M., Hang S., Zhong J. Identification of splice variants, targeted microRNAs and functional single nucleotide polymorphisms of the *BOLA-DQA2* gene in dairy cattle. *DNA Cell Biol.* 2012;31(5):739-744. DOI 10.1089/dna.2011.1402.
- Huai Q., Zhiyong J., Zhijie C. A survey of cattle production in China. *World Review Animal. FAO*. 1993;76:12-18.
- Islam F., Gopalan V., Lam A.K. *RETREG1 (FAM134B)*: a new player in human diseases: 15 years after the discovery in cancer. *J. Cell. Physiol.* 2018;233(6):4479-4489. DOI 10.1002/jcp.26384.
- Iso-Touru T., Tapio M., Vilkki J., Kiseleva T., Ammosov I., Ivanova Z., Popov R., Ozerov M., Kantanen J. Genetic diversity and genomic signatures of selection among cattle breeds from Siberia, eastern and northern Europe. *Anim. Genet.* 2016;47(6):647-657. DOI 10.1111/age.12473.
- Jeong J., Kwon E.G., Im S.K., Seo K.S., Baik M. Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in longissimus dorsi muscle of Korean cattle steers. *J. Anim. Sci.* 2012;90(6):2044-2053. DOI 10.2527/jas.2011-4753.
- Jo C., Cho S.H., Chang J., Nam K.C. Keys to production and processing of Hanwoo beef: a perspective of tradition and science. *Anim. Front.* 2012;2(4):32-38. DOI 10.2527/af.2012-0060.
- Johnson H., Scorrano L., Korsmeyer S.J., Ley T.J. Cell death induced by granzyme C. *Blood*. 2003;101(8):3093-3101.
- Kaempfer R., Arad G., Levy R., Hillman D., Nasie I., Rotfogel Z. CD28: direct and critical receptor for superantigen toxins. *Toxins (Basel)*. 2013;5(9):1531-1542. DOI 10.3390/toxins5091531.
- Kantanen J., Edwards C.J., Bradley D.G., Viinalass H., Thessler S., Ivanova Z., Kiselyova T., Cinkulov M., Popov R., Stojanović S., Ammosov I., Vilkki J. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity*. 2009;103(5):404-415. DOI 10.1038/hdy.2009.68.
- Kantanen J., Lovendahl P., Strandberg E., Eythorsdottir E., Li M.H., Kettunen-Praebel A., Berg P., Meuwissen T. Utilization of farm animal genetic resources in a changing agro-ecological environment in the Nordic countries. *Front. Genet.* 2015;6:52. DOI 10.3389/fgene.2015.00052.
- Kasanmoentalib E.S., Valls Seron M., Ferwerda B., Tanck M.W., Zwinderman A.H., Baas F., van der Ende A., Schwaebler W.J., Brouwer M.C., van de Beek D. Mannose-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *J. Neuroinflammation*. 2017;14(1):2. DOI 10.1186/s12974-016-0770-9.
- Kawahara-Miki R., Tsuda K., Shiwa Y., Arai-Kichise Y., Matsumoto T., Kanesaki Y., Oda S., Ebihara S., Yajima S., Yoshikawa H., Kono T. Whole-genome resequencing shows numerous genes with nonsynonymous SNPs in the Japanese native cattle Kuchinoshima-Ushi. *BMC Genom.* 2011;12:103. DOI 10.1186/1471-2164-12-103.
- Kiermayer C., Northrup E., Schrewe A., Walch A., de Angelis M.H., Schoensiegel F., Zischka H., Prehn C., Adamski J., Bekereldjian R., Ivandic B., Kupatt C., Brielmeier M. Heart-specific knockout of the mitochondrial thioredoxin reductase (*Txnrd2*) induces metabolic and contractile dysfunction in the aging myocardium. *J. Am. Heart Assoc.* 2015;4(7):e002153. DOI 10.1161/JAHA.115.002153.
- Kurth I., Pamminer T., Hennings J.C., Soehendra D., Huebner A.K., Rothier A., Baets J., Senderek J., Topaloglu H., Farrell S.A., Nürnberg G., Nürnberg P., De Jonghe P., Gal A., Kaether C., Timmerman V., Hübner C.A. Mutations in *FAM134B*, encoding a newly identified Golgi protein, cause severe sensory and autonomic neuropathy. *Nat. Genet.* 2009;41(11):1179-1181. DOI 10.1038/ng.464.
- Kuss-Duerkop S.K., Keestra-Gounder A.M. NOD1 and NOD2 activation by diverse stimuli: a possible role for sensing pathogen-induced endoplasmic reticulum stress. *Infect. Immun.* 2020;88:e00898-19. DOI 10.1128/IAI.00898-19.
- Lai S.J., Liu Y.P., Liu Y.X., Li X.W., Yao Y.G. Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2006;38(1):146-154.
- Larson G., Burger J. A population genetics view of animal domestication. *Trends Genet.* 2013;29(4):197-205. DOI 10.1016/j.tig.2013.01.003.
- Lee S.H., Park B.H., Sharma A., Dang C.G., Lee S.S., Choi T.J., Choy Y.H., Kim H.C., Jeon K.J., Kim S.D., Yeon S.H., Park S.B., Kang H.S. Hanwoo cattle: origin, domestication, breeding strategies and genomic selection. *J. Anim. Sci. Technol.* 2014;56:2. DOI 10.1186/2055-0391-56-2.

- Lee T., Cho S., Seo K.S., Chang J., Kim H., Yoon D. Genetic variants and signatures of selective sweep of Hanwoo population (Korean native cattle). *BMB Rep.* 2013;46(7):346-351.
- Li M.H., Kantanen J. Genetic structure of Eurasian cattle (*Bos taurus*) based on microsatellites: clarification for their breed classification. *Anim. Genet.* 2010;41(2):150-158. DOI 10.1111/j.1365-2052.2009.01980.x.
- Li M.H., Tapio I., Vilkki J., Ivanova Z., Kiselyova T., Marzanov N., Cinkulov M., Stojanovic S., Ammosov I., Popov R., Kantanen J. The genetic structure of cattle populations (*Bos taurus*) in northern Eurasia and the neighbouring Near Eastern regions: implications for breeding strategies and conservation. *Mol. Ecol.* 2007;16(18):3839-3853.
- Li Y., Tran Q., Shrestha R., Piao L., Park S., Park J., Park J. LETM1 is required for mitochondrial homeostasis and cellular viability (review). *Mol. Med. Rep.* 2019;19(5):3367-3375. DOI 10.3892/mmr.2019.10041.
- Librado P., Der Sarkissian C., Ermini L., Schubert M., Jónsson H., Albrechtsen A., Fumagalli M., Yang M.A., Gamba C., Seguin-Orlando A., Mortensen C.D., Petersen B., Hoover C.A., Lorente-Galdos B., Nedoluzhko A., Boulygina E., Tsygankova S., Neuditschko M., Jagannathan V., Thèves C., Alfarhan A.H., Alquraishi S.A., Al-Rasheid K.A., Sicheritz-Ponten T., Popov R., Grigoriev S., Alekseev A.N., Rubin E.M., McCue M., Rieder S., Leeb T., Tikhonov A., Crubézy E., Slatkin M., Marques-Bonet T., Nielsen R., Wilberslev E., Kantanen J., Prokhortchouk E., Orlando L. Tracking the origins of Yakutian horses and the genetic basis for their fast adaptation to subarctic environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(50):E6889-E6897. DOI 10.1073/pnas.1513696112.
- Liu G.E., Bickhart D.M. Copy number variation in the cattle genome. *Funct. Integr. Genomics.* 2012;12(4):609-624. DOI 10.1007/s10142-012-0289-9.
- Lu P., Brunson K., Yuan J., Li Z. Zooarchaeological and genetic evidence for the origins of domestic cattle in ancient China. *Asian Perspect.* 2017;56:92-120. DOI 10.1353/asi.2017.0003.
- Mannen H., Kohno M., Nagata Y., Tsuji S., Bradley D.G., Yeo J.S., Nyamsamba D., Zagdsuren Y., Yokohama M., Nomura K., Amano T. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004; 32(2):539-544.
- Mei C., Junjvlieke Z., Raza S.H.A., Wang H., Cheng G., Zhao C., Zhu W., Zan L. Copy number variation detection in Chinese indigenous cattle by whole genome sequencing. *Genomics.* Available online 2019. Publ. 2020;112(1):831-836. DOI 10.1016/j.ygeno.2019.05.023.
- Mei C., Wang H., Zhu W., Wang H., Cheng G., Qu K., Guang X., Li A., Zhao C., Yang W., Wang C., Xin Y., Zan L. Whole-genome sequencing of the endangered bovine species Gayal (*Bos frontalis*) provides new insights into its genetic features. *Sci. Rep.* 2016;6:19787. DOI 10.1038/srep19787.
- Motwani M., Pesiridis S., Fitzgerald K.A. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2019; 20(11):657-674. DOI 10.1038/s41576-019-0151-1.
- Mukherjee S., Huda S., Sinha Babu S.P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: a review. *Scand. J. Immunol.* 2019;90(1):e12771. DOI 10.1111/sji.12771.
- Mustafa H., Khan W., Kuthu Z., Eui-Soo K., Ajmal A., Javed K., Pasha T., Ali A., Javed M.T., Sonstegard T.S. Genome-wide survey of selection signatures in Pakistani cattle breeds. *Pak. Vet. J.* 2018;38(2):214-218. DOI 10.29261/pakvetj/2018.051.
- Niture S., Moore J., Kumar D. TNFAIP8: inflammation, immunity and human diseases. *J. Cell Immunol.* 2019;1(2):29-34.
- Pautasso M. Ten simple rules for writing a literature review. *PLoS Comput. Biol.* 2013;9(7):e1003149. DOI 10.1371/journal.pcbi.1003149.
- Peilieu C. Livestock Breeds of China (FAO Animal Production and Health Paper 46). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1984. Available at <http://www.fao.org/3/x6549e/x6549e00.pdf>. Retrieved on April 10, 2020.
- Piao L., Li Y., Kim S.J., Byun H.S., Huang S.M., Hwang S.K., Yang K.J., Park K.A., Won M., Hong J., Hur G.M., Seok J.H., Shong M., Cho M.H., Brazil D.P., Hemmings B.A., Park J. Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death. *Cancer Res.* 2009;69(8):3397-3404. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-3235.
- Pokharel K., Weldenegodguad M., Popov R., Honkatukia M., Huuki H., Lindeberg H., Peippo J., Reilas T., Zarovnyaev S., Kantanen J. Whole blood transcriptome analysis reveals footprints of cattle adaptation to sub-arctic conditions. *Anim. Genet.* 2019;50(3):217-227. DOI 10.1111/age.12783.
- Porter V., Alderson L., Hall S.J.G., Sponenberg D.P. (Eds.) Mason's World Encyclopedia of Livestock Breeds and Breeding. Wallingford, UK: CABI Publ., 2016.
- Porto-Neto L.R., Lee S.H., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., Lee H.K., Gibson J.P., Gondro C. Genome-wide detection of signatures of selection in Korean Hanwoo cattle. *Anim. Genet.* 2014;45(2):180-190. DOI 10.1111/age.12119.
- Putri M., Syamsunarno M.R., Iso T., Yamaguchi A., Hanaoka H., Sunaga H., Koitabashi N., Matsui H., Yamazaki C., Kameo S., Tsumima Y., Yokoyama T., Koyama H., Abumrad N.A., Kurabayashi M. CD36 is indispensable for thermogenesis under conditions of fasting and cold stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;457(4):520-525. DOI 10.1016/j.bbrc.2014.12.124.
- Qiu Q., Zhang G., Ma T., Qian W., Wang J., Ye Z., Cao C., Hu Q., Kim J., Larkin D.M., Auvil L., Capitano B., Ma J., Lewin H.A., Qian X., Lang Y., Zhou R., Wang L., Wang K., Xia J., Liao S., Pan S., Lu X., Hou H., Wang Y., Zang X., Yin Y., Ma H., Zhang J., Wang Z., Zhang Y., Zhang D., Yonezawa T., Hasegawa M., Zhong Y., Liu W., Zhang Y., Huang Z., Zhang S., Long R., Yang H., Wang J., Lenstra J.A., Cooper D.N., Wu Y., Wang J., Shi P., Wang J., Liu J. The yak genome and adaptation to life at high altitude. *Nat. Genet.* 2012; 44(8):946-949. DOI 10.1038/ng.2343.
- Quarta S., Mitrić M., Kalpachidou T., Mair N., Schiefermeier-Mach N., Andratsch M., Qi Y., Langeslag M., Malsch P., Rose-John S., Kress M. Impaired mechanical, heat, and cold nociception in a murine model of genetic TACE/ADAM17 knockdown. *FASEB J.* 2019; 33(3):4418-4431. DOI 10.1096/fj.201801901R.
- Randhawa I.A., Khatkar M.S., Thomson P.C., Raadsma H.W. A meta-analysis of selection signatures in cattle. *PLoS One.* 2016;11(4): e0153013. DOI 10.1371/journal.pone.0153013.
- Reynés B., Klein Hazebroek M., Garcia-Ruiz E., Keijer J., Oliver P., Palou A. Specific features of the hypothalamic leptin signaling response to cold exposure are reflected in peripheral blood mononuclear cells in rats and ferrets. *Front. Physiol.* 2017;8:581. DOI 10.3389/fphys.2017.00581.
- Sambarey A., Devaprasad A., Baloni P., Mishra M., Mohan A., Tyagi P., Singh A., Akshata J.S., Sultana R., Buggi S., Chandra N. Meta-analysis of host response networks identifies a common core in tuberculosis. *NPJ Syst. Biol. Appl.* 2017;3:4. DOI 10.1038/s41540-017-0005-4.
- Seelige R., Saddawi-Konefka R., Adams N.M., Picarda G., Sun J.C., Benedict C.A., Bui J.D. Interleukin-17D and Nrf2 mediate initial innate immune cell recruitment and restrict MCMV infection. *Sci. Rep.* 2018;8(1):13670. DOI 10.1038/s41598-018-32011-2.
- Sermiyagin A.A., Dotsev A.V., Gladys E.A., Traspov A.A., Denisova T.E., Kostyunina O.V., Reyher H., Wimmers K., Barbato M., Paronyan I.A., Plemayshov K.V., Sölkner J., Popov R.G., Brem G., Zinovieva N.A. Whole-genome SNP analysis elucidates the genetic structure of Russian cattle and its relationship with Eurasian taurine breeds. *Genet. Sel. Evol.* 2018;50(1):37. DOI 10.1186/s12711-018-0408-8.
- Shen J., Hanif Q., Cao Y., Yu Y., Lei C., Zhang G., Zhao Y. Whole genome scan and selection signatures for climate adaption in Yanbian cattle. *Front. Genet.* 2020;11:94. DOI 10.3389/fgene.2020.00094.
- Shi Q., Mu X., Hong L., Zheng S. *SERPINE1* rs1799768 polymorphism contributes to sepsis risk and mortality. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2015;16(4):1218-1224. DOI 10.1177/1470320315614714.

- Simonsen M., Mailund T., Pedersen C.N. Inference of large phylogenies using neighbour-joining. In: International Joint Conference on Bio-medical Engineering Systems and Technologies (BIOSTEC 2010), Valencia, Spain, 20–23 January 2010. Berlin; Heidelberg: Springer, 2010;334-344.
- Stranden I., Kantanen J., Russo I.M., Orozco-terWengel P., Bruford M.W., Climgen Consortium. Genomic selection strategies for breeding adaptation and production in dairy cattle under climate change. *Heredity (Edinb.)*. 2019;123(3):307-317. DOI 10.1038/s41437-019-0207-1.
- Sun W., Chen H., Lei C., Lei X., Zhang Y. Genetic variation in eight Chinese cattle breeds based on the analysis of microsatellite markers. *Genet. Sel. Evol.* 2008;40(6):6816-6892. DOI 10.1051/gse:2008027.
- Svishcheva G., Babayan O., Lkhasaranov B., Tsendsuren A., Abdurasulov A., Stolpovsky Y. Microsatellite diversity and phylogenetic relationships among East Eurasian *Bos taurus* breeds with an emphasis on rare and ancient local cattle. *Animals (Basel)*. 2020;10(9):1493. DOI 10.3390/ani10091493.
- Takatsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2011;87(8):463-485. DOI 10.2183/pjab.87.463.
- Tapio I., Tapio M., Li M.H., Popov R., Ivanova Z., Kantanen J. Estimation of relatedness among non-pedigreed Yakutian cryo-bank bulls using molecular data: implications for conservation and breed management. *Genet. Sel. Evol.* 2010;42:28. DOI 10.1186/1297-9686-42-28.
- Tom Tang Y., Emtage P., Funk W.D., Hu T., Arterburn M., Park E.E., Rupp F. TAFA: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. *Genomics*. 2004;83(4):727-734. DOI 10.1016/j.ygeno.2003.10.006.
- Tsuda K., Kawahara-Miki R., Sano S., Imai M., Noguchi T., Inayoshi Y., Kono T. Abundant sequence divergence in the native Japanese cattle Mishima-Ushi (*Bos taurus*) detected using whole-genome sequencing. *Genomics*. 2013;102(4):372-378. DOI 10.1016/j.ygeno.2013.08.002.
- Tsukamoto H., Takeuchi S., Kubota K., Kobayashi Y., Kozakai S., Ukai I., Shichiku A., Okubo M., Numasaki M., Kanemitsu Y., Matsumoto Y., Nochi T., Watanabe K., Aso H., Tomioka Y. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKK ϵ -IRF3 axis activation. *J. Biol. Chem.* 2018;293(26):10186-10201. DOI 10.1074/jbc.M117.796631.
- Wang M.S., Li Y., Peng M.S., Zhong L., Wang Z.J., Li Q.Y., Tu X.L., Dong Y., Zhu C.L., Wang L., Yang M.M., Wu S.F., Miao Y.W., Liu J.P., Irwin D.M., Wang W., Wu D.D., Zhang Y.P. Genomic analyses reveal potential independent adaptation to high altitude in Tibetan chickens. *Mol. Biol. Evol.* 2015;32(7):1880-1889. DOI 10.1093/molbev/msv071.
- Wang Z., Ma H., Xu L., Zhu B., Bordbar F., Chen Y., Zhang L., Gao X., Gao H., Zhang S., Xu L., Li J. Genome-wide scan identifies selection signatures in Chinese Wagyu cattle using a high-density SNP array. *Animals (Basel)*. 2019;9(6):pii:E296. DOI 10.3390/ani9060296.
- Weldenegodguad M., Popov R., Pokharel K., Ammosov I., Ming Y., Ivanova Z., Kantanen J. Whole-genome sequencing of three native cattle breeds originating from the northernmost cattle farming regions. *Front. Genet.* 2019;9:728. DOI 10.3389/fgene.2018.00728.
- Wu D.D., Ding X.D., Wang S., Wójcik J.M., Zhang Y., Tokarska M., Li Y., Wang M.S., Faruque O., Nielsen R., Zhang Q., Zhang Y.P. Pervasive introgression facilitated domestication and adaptation in the *Bos* species complex. *Nat. Ecol. Evol.* 2018;2(7):1139-1145. DOI 10.1038/s41559-018-0562-y.
- Wu S., De Croos J.N., Storey K.B. Cold acclimation-induced up-regulation of the ribosomal protein L7 gene in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Gene*. 2008;424(1-2):48-55. DOI 10.1016/j.gene.2008.07.023.
- Xia X., Qu K., Zhang G., Jia Y., Ma Z., Zhao X., Huang Y., Chen H., Huang B., Lei C. Comprehensive analysis of the mitochondrial DNA diversity in Chinese cattle. *Anim. Genet.* 2019;50(1):70-73. DOI 10.1111/age.12749.
- Xu Y., Jiang Y., Shi T., Cai H., Lan X., Zhao X., Plath M., Chen H. Whole-genome sequencing reveals mutational landscape underlying phenotypic differences between two widespread Chinese cattle breeds. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183921. DOI 10.1371/journal.pone.0183921.
- Yamamoto H., Fara A.F., Dasgupta P., Kemper C. CD46: the 'multi-tasker' of complement proteins. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2013;45(12):2808-2820. DOI 10.1016/j.biocel.2013.09.016.
- Yeh T.Y., Beiswenger K.K., Li P., Bolin K.E., Lee R.M., Tsao T.S., Murphy A.N., Hevener A.L., Chi N.W. Hypermetabolism, hyperphagia, and reduced adiposity in tankyrase-deficient mice. *Diabetes*. 2009;58(11):2476-2485. DOI 10.2337/db08-1781.
- Yurchenko A.A., Daetwyler H.D., Yudin N., Schnabel R.D., Vander Jagt C.J., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Taylor J.F., Larkin D.M. Scans for signatures of selection in Russian cattle breed genomes reveal new candidate genes for environmental adaptation and acclimation. *Sci. Rep.* 2018a;8(1):12984. DOI 10.1038/s41598-018-31304-w.
- Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemyshev K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity (Edinb.)*. 2018b;120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3.
- Zhang H., Pajmans J.L., Chang F., Wu X., Chen G., Lei C., Yang X., Wei Z., Bradley D.G., Orlando L., O'Connor T., Hofreiter M. Morphological and genetic evidence for early Holocene cattle management in northeastern China. *Nat. Commun.* 2013;4:2755. DOI 10.1038/ncomms3755.
- Zhang T., Chen H., Qi L., Zhang J., Wu R., Zhang Y., Sun Y. Transcript profiling identifies early response genes against FMDV infection in PK-15 cells. *Viruses*. 2018;10(7):364. DOI 10.3390/v10070364.
- Zhang W., Gao X., Zhang Y., Zhao Y., Zhang J., Jia Y., Zhu B., Xu L., Zhang L., Gao H., Li J., Chen Y. Genome-wide assessment of genetic diversity and population structure insights into admixture and introgression in Chinese indigenous cattle. *BMC Genet.* 2018;19:114. DOI 10.1186/s12863-018-0705-9.
- Zhang X., Wang K., Wang L., Yang Y., Ni Z., Xie X., Shao X., Han J., Wan D., Qiu Q. Genome-wide patterns of copy number variation in the Chinese yak genome. *BMC Genom.* 2016;17:379. DOI 10.1186/s12864-016-2702-6.
- Zhang Y., Hu Y., Wang X., Jiang Q., Zhao H., Wang J., Ju Z., Yang L., Gao Y., Wei X., Bai J., Zhou Y., Huang J. Population structure, and selection signatures underlying high-altitude adaptation inferred from genome-wide copy number variations in Chinese indigenous cattle. *Front. Genet.* 2020;10:1404. DOI 10.3389/fgene.2019.01404.
- Zhao Y.X., Yang J., Lv F.H., Hu X.J., Xie X.L., Zhang M., Li W.R., Liu M.J., Wang Y.T., Li J.Q., Liu Y.G., Ren Y.L., Wang F., Hehua E., Kantanen J., Arjen Lenstra J., Han J.L., Li M.H. Genomic reconstruction of the history of native sheep reveals the peopling patterns of nomads and the expansion of early pastoralism in East Asia. *Mol. Biol. Evol.* 2017;34(9):2380-2395. DOI 10.1093/molbev/msx181.

ORCID ID

N.S. Yudin orcid.org/0000-0002-1947-5554
D.M. Larkin orcid.org/0000-0001-7859-6201

Acknowledgements. This work was supported by the Russian Science Foundation, project 19-76-20026.

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

Received September 20, 2020. Revised November 18, 2020. Accepted November 20, 2020.

Original Russian text www.bionet.nsc.ru/vogis/

Monitoring for the genetic structure of Mezen breed of horses in terms of DNA microsatellites

N.V. Vdovina, I.B. Yuryeva ✉

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia
✉ arhsel@mail.ru

Abstract. Mezenskaya horse (Mezenka) is Russia's aboriginal breed. It is a domestic selection in the northern territories of Arkhangelsk region. The breed is perfectly adapted to the conditions of the Far North, and has a number of valuable economic and biological qualities. At present, it has a limited gene pool and is bred only in the Mezensky district, where one gene pool-breeding farm is operating and so is a number of basic farms, where selection and breeding activities take place with the breed. Due to a small population of Mezen horses, the challenge of preserving its intra-breed diversity is very urgent. To determine the degree of genetic variability in the Mezen population, the alleles-fond was monitored. A comparative analysis of the genetic structure of the breed was done on DNA microsatellites at time-intervals of 10 years (2000, 2010 and 2020). Crista samples of 198 horses were studied in specialized laboratories. It was established that the breed has wide genetic diversity in 17 loci of nuclear DNA. The population's alleles-fond includes from 128, 139, and 133 alleles respectively (with an average value of 7.53, 8.18, and 7.82 alleles per locus). The most common alleles are *AHT4O*, *AHT5N*, *ASB2K*, *ASB23S*, *CA425N*, *HMS1J*, *HMS1M*, *HMS2H*, *HMS3M*, *HMS7L*, *HTG4M*, *HTG6O*, *HTG7K*, *HTG7O* and *LEX3M*. Mezen horses revealed 6 rare, low-frequency (0.004–0.056) alleles not found in the horse populations of domestic selection. The average value of the polymorphic level (*Ae*) in the breed over the years is 4.16, 4.21 and 4.06, respectively. The highest polymorphism is found in locus *ASB17* (6.49–6.90–6.76); the lowest, in locus *HTG6* (1.71–1.66–1.67) and *HMS7* (1.77–1.95–1.77). A slight deficit of heterozygous genotypes (*Fis* = 0.003) was observed in Mezen horses in 2010. In 2000 and 2020, the observed heterozygosity (*Ho*) exceeds the expected value (*He*), which indicates the absence of intra-population inbreeding (*Fis* = –0.014 and –0.011, respectively). The results obtained testify to the effectiveness of breeding activities carried out to preserve, improve and maintain genetic diversity in the population.

Key words: Mezenskaya breed of horses; monitoring; genetic diversity; microsatellite DNA; allele; genotype.

For citation: Vdovina N.V., Yuryeva I.B. Monitoring for the genetic structure of Mezen breed of horses in terms of DNA microsatellites. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2): 202-207. DOI 10.18699/VJ21.024

Мониторинг генетической структуры мезенской породы лошадей по микросателлитам ДНК

Н.В. Вдовина, И.Б. Юрьева ✉

Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лавёрова Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия
✉ arhsel@mail.ru

Аннотация. Мезенская лошадь (мезенка) – аборигенная порода России. Была выведена методом народной селекции в северных районах Архангельской области. Порода прекрасно приспособлена к условиям Крайнего Севера и обладает рядом ценных хозяйственно-биологических качеств. В настоящее время имеет ограниченный генофонд и разводится в чистоте только в Мезенском районе, где функционируют одна генофондно-племенная ферма и ряд базовых хозяйств, в которых осуществляется селекционно-племенная работа с породой. В связи с малочисленностью популяции мезенских лошадей проблема сохранения ее внутривидового разнообразия очень актуальна. Для определения уровня генетической изменчивости в породе проведен мониторинг ее аллелофонда. Сравнительный анализ генетической структуры породы выполнен по микросателлитам ДНК с периодичностью в 10 лет (2000, 2010 и 2020 гг.). В специализированных лабораториях были исследованы образцы волос 198 лошадей. Установлено, что порода обладает широким генетическим разнообразием по 17 локусам ядерной ДНК. В исследуемые годы аллелофонд популяции включал 128, 139 и 133 аллеля соответственно (при среднем значении 7.53, 8.18 и 7.82 аллеля на локус). Наиболее распространенными в породе являются аллели *AHT4O*, *AHT5N*, *ASB2K*, *ASB23S*, *CA425N*, *HMS1J*, *HMS1M*, *HMS2H*, *HMS3M*, *HMS7L*, *HTG4M*, *HTG6O*, *HTG7K*, *HTG7O*, *LEX3M*. С малой частотой (0.004–0.056) у мезенок было обнаружено 6 редких аллелей, которые не выявлены в популяциях лошадей отечественной

селекции. Среднее значение уровня полиморфности (A_e) в породе по годам составляет 4.16, 4.21 и 4.06 соответственно. Наивысший его показатель приходится на локус *ASB17* (6.49–6.90–6.76), наименьший – на локусы *HTG6* (1.71–1.66–1.67) и *HMS7* (1.77–1.95–1.77). Незначительный дефицит гетерозиготных генотипов ($F_{is} = 0.003$) отмечен у мезенских лошадей в 2010 г. В 2000 и 2020 гг. наблюдаемая гетерозиготность (H_o) превышает величину ожидаемой (H_e), что указывает на отсутствие внутрипопуляционного инбридинга ($F_{is} = -0.014$ и -0.011 соответственно). Полученные результаты свидетельствуют об эффективности проводимых селекционных мероприятий по сохранению, совершенствованию и поддержанию генетического разнообразия в популяции.

Ключевые слова: мезенская порода лошадей; мониторинг; генетическое разнообразие; микросателлиты ДНК; аллелофонд; генотип.

Introduction

Presently, considerable attention is paid to the preservation of biological diversity, as the “creative effort” of humans has brought many animal species onto the brink of extinction. Populations of local breeds that bear in their genome valuable qualities adapting them to the conditions of the area where they had been developed have reduced significantly. The main cause for the decline of populations and extinction of aboriginal breeds is their inability to compete with modern farm breeds and global breeds in terms of productivity (Fewson, 1979; Simon, Schulte-Coerne, 1979; Lehane Leigh, 1981; Avon Laurent, 1983; Minchev, Dzhurbineva, 1983). The depletion of genetic resources leads to dramatic changes in the gene pool and, above all, to reduction of genetic variability (Altukhov, 2004; Moiseeva et al., 2006; Gendzhieva, Sulimova, 2009; Stolpovskiy, Zakharov-Gezekhus, 2017).

Investigation of genetic characteristics of several local horse breeds in Russia demonstrates that at the present stage of their development these breeds have high levels of genetic diversity and allele pools characteristic of the breeds. For instance, 145 alleles for 17 microsatellite DNA loci were identified in the genotypes of horses of the Yakut breed, that is, 8.53 alleles per locus on the average (Kalinkova et al., 2015). The population of Kyrghyz horses has a vast set of alleles, 135 (Isakova et al., 2018). In Bashkir horses, 130 alleles, or 9.29 alleles per locus, were identified in 14 short tandem repeat (STR) loci (Kalinkova et al., 2016). The population of Trans-Baikal horses has high genetic diversity indices. With 116 alleles in 14 satellite DNA loci, the level of polymorphism (A_e) of the breed amounts to 5.29, and the observed heterozygosity (H_o) amounts to 0.786 (Kalashnikov et al., 2017a). A characteristic feature of aboriginal horse breeds is that their genotypes bear rare and unique alleles not found in farm breeds. Unique alleles were identified in the Buryat, Khakassian (Kalashnikov et al., 2010), Trans-Baikal (Kalashnikov et al., 2017a), Altai, Bashkir, Yakut (Khrabrova, 2015), and Tuvan (Chysima et al., 2017) horse breeds.

The Mezen horse (Mezenka) is one of the local Russian breeds. The area of its origin and present distribu-

tion is the Mezensky district, situated in the northeast of Arkhangelsk Oblast. The breed was developed by local inhabitants, and it was perfectly adapted to the harsh conditions of the Far North during its historical formation. The Mezen horse is easy to keep, feed, and manage. It shows good disease resistance, retains its nutritional status in winter, has universal working abilities, and can walk through deep snow and sticky clayey soil. In the 17–19 centuries, Mezen horses were widespread in the Arkhangelsk region. The mechanization of agriculture and termination of the state support of horse breeding in the second half of the 20th century led to a decline in the populations of native horse breeds in Russia, including the Mezen horse breed. By the early 1990s, the breed was preserved only in the Mezensky district.

At present, the population of Mezen horses has a limited gene pool; it is an intrabreeding population of small size (187 mares as of 01.01.2020). According to the classification of breeds by the degree of risk presented in the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) report of 2015, it is included in the “critical status” category (with less than 200 female animals) (FAO, 2015).

Activities on the restoration and preservation of the genetic diversity of the Mezen horse breed have been conducted since 1993. A specialized breeding farm has been operating in the region since 1994, and its main aim is to preserve the intrabreed diversity of the population. The stallions and the mares at the farm include representatives of the breed from various communities of the Mezensky district, characterized by a certain genetic pattern. Important stages of breeding are the exchange of breeding material among the farms raising Mezen horses and the identification of new genetic resources of the breed. The assessment of the genetic situation in the population conducted earlier on the base of polymorphic proteins and blood types revealed the presence of considerable intrabreed diversity (Khrabrova et al., 2005; Yuryeva et al., 2005). However, over the past twenty years, the number of farms and horses in the Mezensky district decreased significantly, and therefore breeding activities engage a small number of stallions and mares.

With the increasing likelihood of inbreeding, it may lead to the loss of individual genes and decrease in genetic variability in the breed.

The aim of this study was to monitor the genetic structure of the Mezen horse breed by microsatellite DNA loci and to assess the genetic diversity of the population.

Materials and methods

The material for the study comprised genetic certificates with test results for 17 microsatellite DNA loci from Mezen breed horses. Only data for the animals included in the breed at the beginning of 2000 (*n* = 62), 2010 (*n* = 163), and 2020 (*n* = 143) were processed. DNA samples obtained from the biological material of horses were genotyped at the Laboratory of Genetics of the All-Russia Research Institute of Horse Breeding and at the Molecular Certification Laboratory of the Gordiz company in 2007–2019. DNA was isolated from hair follicles with Diatom™ DNA Prep, ExtraGene™ DNA Prep (both from Isogen Laboratory, Moscow), and CoRDIS SPRINT kits (Gordiz, Moscow).

The samples were analyzed by PCR with multiplex kits for genotyping horses from the Stock Marks and CoRDIS Reindeer companies for 17 microsatellite loci: *VHL20*, *HTG4*, *AHT4*, *HMS7*, *HTG6*, *AHT5*, *HMS6*, *ASB23*, *ASB2*, *HTG10*, *HTG7*, *HMS3*, *HMS2*, *ASB17*, *LEX3*, *HMS1*, and *CA425* (van de Goor et al., 2010). PCR was carried out in a 2720 Thermal Cycler. The amplicates were resolved by capillary electrophoresis in an ABI 3130 automatic genetic analyzer (Applied Biosystems). The results were identified using a standard DNA profile and data from international comparison tests (Horse Comparison Tests) (van de Goor et al., 2010).

The genetic analysis of the population was performed as in (Khrabrova et al., 2011). The following indicators were calculated: frequencies of alleles and genotypes, polymorphism level (*Ae*), expected (*He*) and observed (*Ho*) heterozygosity levels, and fixation index (*Fis*). Statistical analysis was conducted on a PENTIUM-MMX-166 PC with Excel 7.0 software.

Results and discussion

The time variation of the Mezen horse genetic structure traced by 17 microsatellite DNA loci demonstrates its broad allelic diversity. In 2000, 128 alleles were identified in the Mezen horses. The horses included in this research were born in six communities of the Mezen district, and they had a certain set of alleles in their genotypes. A more than twofold increase in the number of examined horses and expansion of their range of origin to 11 communities permitted us to identify 139 alleles in 2010. The new alleles were identified with frequencies of occurrence from 0.003 to 0.031. In 2020, 133 alleles

Table 1. Alleles identified in Mezen breed horses (*n* = 165)

Locus	Alleles
<i>AHT4</i>	H, I, J, K, L*, N*, O, P*
<i>AHT5</i>	H*, I*, J, K, L*, M*, N, O, Q*
<i>ASB2</i>	B*, I*, K, M, N, O, P*, Q, U**
<i>ASB17</i>	F, G*, H*, I*, K, L*, M*, N, O, P, Q*, R, S*, T*, X**, Y*
<i>ASB23</i>	G*, I, J, K, L, N**, M, Q*, R*, S, U
<i>CA425</i>	I*, J, K*, L, M, N, O*
<i>HMS1</i>	I, J, K*, L, M, N*
<i>HMS2</i>	H, I, J, K, L, M*, O, R*, Y**
<i>HMS3</i>	I, M, N*, O*, P, Q*, R
<i>HMS6</i>	K, L, M, N, O, P
<i>HMS7</i>	J*, L, M, N, O, Q*
<i>HTG4</i>	K, L, M, N, O, P*, Q*
<i>HTG6</i>	G*, I, J, O, P*
<i>HTG7</i>	K, M, N, O
<i>HTG10</i>	I, K, L*, M, N*, O, P*, Q*, R, S, T*
<i>VHL20</i>	I, J*, M, N, O, P*, Q*, R, S
<i>LEX3</i>	F*, H*, I*, K*, L, M, N, O, P, R**, S**

* Alleles rare in the breed: frequencies below 0.05.

** Unique alleles.

were identified in the examined horses. The number of alleles decreased over the past decade due to the disappearance of rare (*p* < 0.05) variants from the population: *AHT4L* and *AHT4N*, *ASB23Q* and *ASB23R*, *CA425O*, *HMS2Y*, *HMS3N*, and *HTG6P*. At the same time, in 2020, two new alleles (*HTG6G* and *HTG10T*) were discovered; they were absent from the horses examined in the first two rounds of the study. The alleles identified in the Mezen breed are shown in Table 1.

As for the loci, the minimum number of alleles was detected at *HTG6* and *HTG7* (4 alleles in each throughout the years of the study), the maximum number was at the *ASB17* locus (13 alleles in 2000 and 16 alleles in each of 2010 and 2020). The numbers of identified alleles per locus averaged over each year were 7.53, 8.18, and 7.82, respectively.

The commonest alleles in the breed are *AHT4O*, *AHT5N*, *ASB2K*, *ASB23S*, *CA425N*, *HMS1J*, *HMS1M*, *HMS2H*, *HMS3M*, *HMS3R*, *HTG4M*, *HTG7K*, *HTG7O*, *LEX3M*, and *VHL20N*. The frequencies of their occurrence range from 0.258 to 0.569. More than 70 % in the structure of their loci is made up by the *HMS7L* and *HTG6O* alleles. The frequencies of rare alleles in the

Table 2. Genetic and population characteristics of the Mezen breed of horses in terms of DNA microsatellites, 17 loci, by years

Indicator	Year 2000	Year 2010	Year 2020
Studied population (<i>n</i>)	62	163	143
Polymorphism level (<i>Ae</i>)	4.16	4.21	4.06
Observed heterozygosity (<i>Ho</i>)	0.734	0.729	0.728
Expected heterozygosity (<i>He</i>)	0.724	0.731	0.720
Fixation index (<i>Fis</i>)	-0.014	0.003	-0.011

population vary from 0.003 to 0.048. Low frequencies (0.003–0.041) are characteristic of six unique alleles found in the Mezen genotype that had not been detected in other domestic horse breeds (van de Goor et al., 2010). In all the analyzed years, the allele pool of Mezen horses contained unique alleles *ASB17X* and *LEX3S*. In 2000 and 2010, the *HMS2Y* allele was detected, and in 2010 and 2020, alleles *ASB2U*, *ASB23N*, and *LEX3R*.

Comparative analysis of the genetic structure of Mezen horses over the time span of the study revealed significant ($p < 0.001$) differences in the frequency of occurrence of individual allelic variants. New alleles appeared at several loci; as a result, allele frequencies increased or decreased. In particular, alleles *AHT5J*, *ASB17K*, *CA425I*, *CA425M*, *HMS1L*, *HMS6K*, and *HTG10O*, identified in 2000 at frequencies 0.121–0.213, were 1.2 times less frequent in the population in 2010 and 1.5 to 2.2 times less frequent in 2020. Inversely, alleles *AHT5K*, *ASB2M*, *ASB17R*, *ASB23I*, *CA425L*, *CA425N*, *HMS1J*, *HMS3M*, and *HTG10I* at the second and the third steps of the study occurred at frequencies higher than at the first step by factors 1.1–1.2 and 1.3–1.5, respectively. Over twenty years, the frequencies of the typical *HTG7O* (38.0 to 49.0 %) and *HMS3M* (27.5 to 38.7 %) alleles increased significantly, while the frequencies of *HTG7K* and *LEX3M* decreased by 9.6 and 13.6 %, respectively.

A significant difference ($p < 0.05$) between the examined groups was also noted in the number of genotypes (allelic variants). In 2000, 278 variants were tested at 17 microsatellite DNA loci in the Mezen horses, the numbers of which in the loci varied from 6 (*HTG6*) to 30 (*ASB17*). By 2010, the number of genotypes increased to 387. The number of genotypes identified in 2020 was 345. At the same time, the analyzed population lacked 44 variants present in the horses examined in 2000, but 111 new ones were discovered. The most significant increase over the past 20 years was noted in loci *HTG10* (from 20 to 29), *ASB17* (from 30 to 46), and *LEX3* (from 8 to 27).

The conducted genetic analysis of the population demonstrated that due to the wide genetic diversity in the population of the Mezen horses the level of polymorphism, characterizing the number of effective alleles, remained high throughout the study (Table 2).

The maximum number of effective alleles (*Ae*) over years was observed in the highly polymorphic locus *ASB17* (6.49, 6.90, and 6.76), in which homozygous genotypes constituted 11.3 to 16.7 %. In loci *HTG6* and *HMS7*, alleles O (0.742–0.754) and L (0.697–0.738), respectively, were predominant, thus accounting for their low polymorphism (1.66–1.95). Since the homozygous genotypes *HTG6OO* and *HMS7LL* dominate in these loci with frequencies above 50 %, their levels of observed heterozygosity (*Ho*) were low, 37.4 to 47.5 %, respectively. In other loci, the levels of polymorphism in 2000 varied from 2.53 (*LEX3*) to 5.43 (*HMS6*); in 2010, from 2.96 (*HTG7*) to 5.29 (*HMS6*); and in 2020, from 2.74 (*HTG7*) to 5.49 (*HMS2*); the observed heterozygosity varying from 57.1 to 88.7 %.

Generally, heterozygous genotypes prevailed in the population in 2000. This was proven by the value of observed heterozygosity (0.734), which was higher than the predicted level (0.724), and the negative value of the fixation index ($Fis = -0.014$). This indicator demonstrated the presence of genetic balance in the breed and the absence of intrapopulation inbreeding. A slightly reduced value of heterozygotes ($Fis = 0.003$) was observed in the Mezen horses in 2010. In this study, the actual heterozygosity at loci *ASB23* and *HTG7* corresponded to the predicted value, and at several loci (*HTG4*, *HMS7*, *HTG6*, *AHT5*, *ASB2*, *HMS3*, and *ASB17*), the predicted heterozygosity was higher than the observed one. By 2020, the genetic balance in the population was restored. This was confirmed by the negative values of fixation index at most loci and on the average over the breed ($Fis = -0.011$). The predominance of heterozygous genotypes proved the effectiveness of the breeding activities aimed at the preservation and maintenance of genetic diversity in the breed.

Molecular tracing of the time variation of the Mezen horse allele pool at DNA microsatellite loci shows that the breed, like other local horse breeds, has a high level of allelic diversity in most of the loci tested and a wide genetic variability. The population has its specific genetic profile, which differs from some other local breeds (the Altai, Bashkir, Buryat, Vyatka, Trans-Baikal, Pechora, Tuvan, Khakassian, and Yakut horse breeds) (Khrabrova et al., 2009; Kalashnikov et al., 2010; Khrabrova, 2016; Blokhina et al., 2018; Yuryeva et al., 2018). Thus, the genetic structure of the Mezen horse breed does not include the *AHT4L*, *AHT4P*, *ASB17Q*, *HMS7K*, or *HTG6G* alleles, which are found in the genotypes of the Trans-Baikal (Kalashnikov et al., 2017a), Kalmyk (Kalashnikov et al., 2017b), Yakut (Kalinkova et al., 2015), and Bashkir (Kalinkova et al., 2016) horse breeds. The *AHT5M*, *HTG7M*, and *HTG10L* alleles ($p < 0.05$), rare in the Mezen horse breed, are characteristic of the mentioned populations. Conversely, the *CA425L* allele, widespread in the Mezen breed (frequency 0.214), was designated as rare in the Yakut horse breed and was not detected in Bashkir horses. The *ASB23Q* and *HTG10T* alleles, which are present at low frequencies in the Mezen population, are observed only in the genetic structure of Bashkir horses, and the *ASB17Y* allele occurs in the Yakut horse breed. The *AHT5H*, *ASB17X*, *HMS2Y*, *HMS6J*, *LEX3R*, and *LEX3S* alleles were detected only in the Mezen horse breed.

At present, agricultural enterprises of the Mezensky district have stallions and mares with rare allelic variants of microsatellite DNA. Some of them have two to five rare alleles in their genotypes. The replication of these alleles through their carriers and identification of new genetic resources in the region will allow not only the preservation but also the expansion of genetic diversity in the small population of the Mezen horse breed.

Conclusion

Monitoring of the genetic structure of the Mezen horse breed revealed certain changes in the numbers of alleles and their combinations in the allele pool, as well as in the frequencies of their occurrence. The breed has a high level of allele variability and a certain genetic profile for DNA microsatellites, which is an important factor in maintaining the gene pool in a small population.

References

Altukhov Y.P. (Ed.). Dynamics of Gene Pools in Populations Exposed to Anthropogenic Effects. Moscow: Nauka Publ., 2004. (in Russian)

Avon Laurent. La conservation des ressources génétiques bovines en France: les causes d'amoinissement. *Ethnozootechnil.* 1983;32:144-185.

Blokhina N., Gotlib L., Orekhova T., Tsareva M. Genotyping and identity control for local breed horses. In: Proceedings of the

2nd All-Russia Research-to-Practice Conf. with international participation "Indigenous Horse Breeding in Russia: History, Present, Prospects", 22 June 2018. Arkhangelsk, 2018;43-47. (in Russian)

Chysyma R.B., Khrabrova L.A., Zaitsev A.M., Makarova E.Yu., Fedorov Yu.N., Ludu B.M. Genetic diversity in Tyva horses derived from polymorphism of blood systems and microsatellite DNA. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology.* 2017;52(4):679-685. DOI 10.15389/agrobiology.2017.4.679eng.

FAO. The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. B.D. Scherf, D. Pilling (Eds.). FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments, Rome, 2015. Available at <http://aqua.cultura.org/upload/files/pdf/library/fao/State%20of%20the%20Worlds%20Aquatic%20Genetic%20Resources.pdf>

Fewson D. Stellungnahme zur Bildung von Genreserver in der Tierzucht. *Zuchungskunde.* 1979;51(5):329-331.

Gendjjeva O.B., Sulimova G.E. Study of the genetic diversity of Kalmyk cattle by ISSR fingerprinting. *Zootekhnika = Zootechnics.* 2009;3:4-5. (in Russian)

Isakova Zh.T., Toktosunov B.I., Kipen V.N., Kalinkova L.V., Talibekova E.T., Altasheva N.M., Abdurasulov A.Kh. Genetic portrait of Kyrgyz horse. *Konevodstvo i Konny Sport = Horse Breeding and Equestrian Sports.* 2018;1:21-23. (in Russian)

Kalashnikov V.V., Kalinkova L.V., Zaitsev A.M., Brem G. Genetic structure of the Zabaikalskaya horse breed. *Konevodstvo i Konny Sport = Horse Breeding and Equestrian Sports.* 2017a;4:22-23. (in Russian)

Kalashnikov V.V., Kalinkova L.V., Zaitsev A.M., Brem G. Study of genetic variation in Kalmyk horses using DNA microsatellite markers. *Konevodstvo i Konny Sport = Horse Breeding and Equestrian Sports.* 2017b;5:20-21. (in Russian)

Kalashnikov V.V., Khrabrova L.A., Zaitsev A.M., Kalinkova L.V., Zaitseva M.A. Study of satellite DNA polymorphism in horses of stud farm and local breeds. *Doklady RASKhN = Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences.* 2010;6:48-50. (in Russian)

Kalinkova L.V., Gavrilicheva I.S., Zaitsev A.M., Zaitseva M.A., Osipov V.G., Ivanov R.V. Genetic characterization of Yakut horse. *Konevodstvo i Konny Sport = Horse Breeding and Equestrian Sports.* 2015;1:22-23. (in Russian)

Kalinkova L.V., Zaitsev A.M., Brem G., Kalashnikov V.V. Genetic portrait of Bashkir horse. *Konevodstvo i Konny Sport = Horse Breeding and Equestrian Sports.* 2016;6:5-7. (in Russian)

Khrabrova L. Characterization of Genetic Horse Breeding Resource in Russia. Saarbrücken: Lambert Acad. Publ., 2015.

Khrabrova L. Comparative analysis of the allele pool of local horse breeds by DNA markers. In: Proceedings of the 1st All-Russia Research-to-Practice Conf. with international participation "Aboriginal Horses Breeds: Role in Horse Breeding in the Russian Federation". Izhevsk, 2016;171-177. (in Russian)

Khrabrova L., Kalinkova L., Zaborskih E., Yuryeva I., Bobkova N. Molecular characterization of local horse breeds in Russia. In: Topical Issues in Zootechnics. Moscow, 2009;92-95. (in Russian)

Khrabrova L., Zaitsev A., Yuryeva I., Vdovina N. Guidelines for Genetic Monitoring of Local Breeds of Horses. Divovo, 2005. (in Russian)

Khrabrova L., Zaitsev A., Zaitseva M. Method of Genetic Diversity and Genotypic Concordance Evaluation in Horses of Stud Farm and Local Breeds. Divovo, 2011. (in Russian)

Lehane Leigh. Conserving animal genetic resources. *Rural Res.* 1981;111:14-18.

- Minchev M., Dzurbineva M. Problems with the preservation of the aboriginal sheep. In: Learn. Tr. HIGHER. Institute of Zootechnics and Veterinary Medicine Zootechnical Department. Stara Zagora, 1983;28:407-414. (in Bulgarian)
- Moiseeva I.G., Ukhanov S.V., Stolpovsky Yu.A., Sulimova G.E., Kashtanov S.N. Gene Pools of Farm Animals. Moscow: Nauka Publ., 2006. (in Russian)
- Simon D.I., Schulte-Coerne H. Verlust genetischer Alternativen in der Tierzucht – notwendige Konsequenzen. Zuchtungskunde. 1979;51(5):332-342.
- Stolpovskiy Yu., Zakharov-Gezekhus I. The problem of conservation of gene pools of domesticated animals. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(4):477-486. DOI 10.18699/VJ17.266. (in Russian)
- van de Goor L.H.P., Panneman H., van Haeringen W.A. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci. *Anim. Genetics*. 2010;41(2):122-127. DOI 10.1111/j.1365-2052.2009.01975.x.
- Yuryeva I.B., Svishcheva G.R., Vdovina N.V., Khrabrova L.A., Stolpovsky Yu.A. Genetic diversity of the Mezenskaya horse breed (*Eguus ferus caballus*) revealed by microsatellite DNA. *Genetika = Genetics*. 2018;54(13):64-69. DOI 10.1134/S0016675818130210. (in Russian)
- Yuryeva I., Vdovina N., Domozhirov V. Immunogenetic control in the Mezen horse population. *Zootekhniya = Zootechnics*. 2005; 8:8-10. (in Russian)

ORCID ID

N.V. Vdovina orcid.org/0000-0002-7070-6098

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of state assignment No. AAAA-A19-119030590059-0.

The authors are grateful to the staff of the All-Russia Research Institute of Horse Breeding, the Deputy Director of the Vavilov Institute of General Genetics, Doctor of Biological Sciences Yu.A. Stolpovskiy, and the leading specialist of the Gordiz Company O.V. Babayan.

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

Received July 21, 2020. Revised December 28, 2020. Accepted December 28, 2020.

Original Russian text www.bionet.nsc.ru/vogis/

Differential expression of 10 genes in the hypothalamus of two generations of rats selected for a reaction to humans

N.V. Klimova, I.V. Chadaeva , S.G. Shichevich, R.V. Kozhemyakina

Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 ichadaeva@bionet.nsc.ru

Abstract. Individual behavioral differences are due to an interaction of the genotype and the environment. Phenotypic manifestation of aggressive behavior depends on the coordinated expression of gene ensembles. Nonetheless, the identification of these genes and of combinations of their mutual influence on expression remains a difficult task. Using animal models of aggressive behavior (gray rats that were selected for a reaction to humans; tame and aggressive rat strains), we evaluated the expression of 10 genes potentially associated with aggressiveness according to the literature: *Cacna1b*, *Cacna2d3*, *Drd2*, *Egr1*, *Gad2*, *Gria2*, *Mapk1*, *Nos1*, *Pomc*, and *Syn1*. To identify the genes most important for the manifestation of aggressiveness, we analyzed the expression of these genes in two generations of rats: 88th and 90th. Assessment of gene expression levels was carried out by real-time PCR in the hypothalamus of tame and aggressive rats. This analysis confirmed that 4 out of the 10 genes differ in expression levels between aggressive rats and tame rats in both generations. Specifically, it was shown that the expression of the *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1*, and *Gad2* genes does not differ between the two generations (88th vs 90th) within each strain, but significantly differs between the strains: in the tame rats of both generations, the expression levels of these genes are significantly lower as compared to those in the aggressive rats. Therefore, these genes hold promise for further studies on behavioral characteristics. Thus, we confirmed polygenic causes of phenotypic manifestation of aggressive reactions. Key words: aggressive behavior; tame behavior; gene expression; hypothalamus; rats.

For citation: Klimova N.V., Chadaeva I.V., Shichevich S.G., Kozhemyakina R.V. Differential expression of 10 genes in the hypothalamus of two generations of rats selected for a reaction to humans. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):208-215. DOI 10.18699/VJ21.50-o

Дифференциальная экспрессия 10 генов, ассоциированных с агрессивным поведением, в гипоталамусе двух поколений крыс, селекционируемых по реакции на человека

Н.В. Климова, И.В. Чадаева , С.Г. Шихевич, Р.В. Кожемякина

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 ichadaeva@bionet.nsc.ru

Аннотация. Индивидуальные особенности поведения у особей одного вида обусловлены взаимодействием генотипа и социального опыта. Как у любого типа поведения, фенотипическое проявление паттернов агрессивного поведения зависит от согласованной экспрессии целых ансамблей генов. Однако идентификация этих генов и комбинаций их взаимного влияния на экспрессию остается сложной задачей. С целью выявления наиболее значимых для осуществления агрессивных реакций генов нами на модельных животных – серых крысах, селекционируемых по реакции на человека (линии ручных и агрессивных крыс), была проведена оценка уровня экспрессии выбранных на основе литературных данных десяти генов (*Cacna1b*, *Cacna2d3*, *Drd2*, *Egr1*, *Gad2*, *Gria2*, *Mapk1*, *Nos1*, *Pomc*, *Syn1*), которые ассоциированы с агрессивным поведением. Экспрессию генов оценивали методом ПЦР в реальном времени в образцах гипоталамуса ручных и агрессивных серых крыс двух разных поколений (88-е и 90-е). В результате проведенного анализа экспрессии генов в гипоталамусе крыс, селекционируемых на ручное и агрессивное поведение, было обнаружено, что четыре из десяти исследуемых генов достоверно различаются по уровню экспрессии между крысами агрессивной и ручной линий 88-го и 90-го поколений разведения. Кроме того, показано, что экспрессия генов *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1* и *Gad2* не изменяется между двумя поколениями крыс одной и той же линии, но достоверно различается между линиями: у крыс ручной линии обоих поколений эти гены экспрессируются достоверно ниже по сравнению с агрессивной. Гены *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1* и *Gad2* являются наиболее перспективными для дальнейших исследований поведенческих особенностей крыс, селекционируемых по реакции на человека. Данный результат подтверждает полигенную детерминацию фенотипического проявления агрессивных реакций на примере модельных животных.

Ключевые слова: агрессивное и ручное поведение; дифференциальная экспрессия генов; гипоталамус; крысы.

Introduction

Behavioral patterns in individuals of the same species are due to the interaction of a genotype and social experience (Lindfors, Tullberg, 2011; Anholt, Mackay, 2012; Kudryavtseva et al., 2014; Markel, 2016). At the same time, it is difficult to identify genes associated with a specific behavior type and combinations of their mutual influence on each other. Studies on aggressive behavior and its genetic causation (i. e., regulation of aggressive reactions) require experiments on model animals that differ in some aggressiveness parameter, so that it is possible to adequately assess the phenotypic manifestations of aggressiveness under the conditions that are set up and controlled by researchers (VanOortmerssen, Bakker, 1981; Kudryavtseva et al., 2014). Experimental studies on model animals will make it possible to identify orthologous genes associated with aggressive behavior in different species; these data are necessary for subsequent identification of evolutionary patterns in how aggressiveness is determined by genetic factors in animals.

It is known that the level of aggressiveness is inherited; genetic control of the phenotypic variation in the aggressiveness level in animal populations has been confirmed experimentally (VanOortmerssen, Bakker, 1981; Hudziak et al., 2003; Fairbanks et al., 2004; Saetre et al., 2006). Most of such studies are focused on one specific gene out of those associated with aggressive behavior, for example, studies on the differential expression of genes of the estrogen receptor (Cushing, 2016), serotonin receptor (Cervantes, Delville, 2009; Naumenko et al., 2009), dopamine receptor (Golden et al., 2019), *Maoa* (Chu et al., 2017), genes *Bdnf* (Ilchibaeva et al., 2015) and *Nos1* (Wultsch et al., 2007), and other well-known genes associated with aggressiveness.

On the other hand, many reviews on the genetics of aggressive behavior indicate polygenic causes of aggressive behavior in animals, i. e., phenotypic manifestation of individual aggressive reactions is controlled by simultaneous expression of many genes, namely, whole ensembles of genes (Craig, Halton, 2009; Anholt, Mackay, 2012; Pavlov et al., 2012; Kudryavtseva et al., 2014; Hoopfer, 2016; Markel, 2016).

In rats of tame and aggressive strains, the expression of gene groups in cerebral hemispheres of males and females has been investigated (Albert et al., 2012), but there are some difficulties with correct interpretation of the results because there are known effect of the ovulation cycle on all physiological processes of the female body. In another work, differentially expressed genes were revealed in hybrid animals of the 2nd generation, obtained by crossing tame and aggressive rats (Heyne et al., 2014). Undoubtedly, cerebral hemispheres play a leading role in the implementation of higher brain functions. Nonetheless, genetic control of aggressive behavioral reactions is primarily carried out by the hypothalamus: the central brain structure that controls emotions. Studies have shown that electrical stimulation of some areas of the hypothalamus leads to the manifestation of aggressive behavior (Kruk, 1991; Hrabovszky et al., 2005; Lin et al., 2011).

Therefore, in our work, we analyzed expression levels of 10 genes in the hypothalamus, those that, according to the literature, are associated with aggressive behavior. For this purpose, we used model animals, rats, while tracing the stability of gene expression in two generations of the studied rats.

Namely, we used males of two outbred strains of gray rats (*Rattus norvegicus*). The rats had been selected for elimination (tame or domesticated) and enhancement of aggressive-defensive reaction to humans (aggressive, respectively; Belyaev, Borodin, 1985; Plyusnina et al., 2007). In response to the presentation of the stimulus, i. e., a researcher's hand in a thick glove (this procedure is called the "glove test"), the rats of the tame strain reacted calmly, i. e., approached and sniffed the glove without performing any aggressive actions; on the contrary, the rats of the aggressive strain reacted violently by immediately attacking the stimulus. Tame and aggressive rats were taken from 88th and 90th generations of breeding. Studies of the tame and aggressive rats after 60–70 generations have shown differences in some behavioral reactions in the open field test, Morris water maze test, and elevated plus maze test as well as differences in morphometric parameters of the cranium and changes in fur coloration (Plyusnina et al., 2007; Kozhemyakina et al., 2016; Kozhemyakina, 2017).

Expression levels of 10 genes were analyzed:

- (1, 2) *Cacna1b* (calcium voltage-gated channel subunit alpha1B) and *Cacna2d3* (calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta3) encode subunits of high-threshold calcium channels that release neurotransmitters. Calcium channels play a critical part in the manifestation of aggressive behavior through synaptic transmission of neurotransmitters GABA and serotonin (Kim C. et al., 2009).
- (3) The *Drd2* gene (dopamine receptor D2) is the gene for dopamine receptor D2, which is involved in the processes of motivation and learning; changes in the expression of the *Drd2* gene cause various pathologies, including increased aggressiveness (Miczek et al., 2002; Kim V. et al., 2015).
- (4) The *Egr1* gene (early growth response 1) encodes a protein that activates the transcription of genes participating in cell division and differentiation. *Egr1* is a transcription factor that regulates the expression of several genes that are associated with long-term memory (Knapska, Kaczmarek, 2004). It is known that *Egr1* expression increases in response to stress (Knapska, Kaczmarek, 2004; Hodges et al., 2014), and, in addition, *Egr1* knockout male mice do not demonstrate aggressive behavior in the presence of other males (Topilko et al., 1998).
- (5) The *Gad2* gene (glutamate decarboxylase 2) encodes glutamate decarboxylase, which catalyzes the conversion of glutamate to GABA (a neurotransmitter that inhibits neuronal electrical impulses), and thus the *Gad2* gene takes part in the control of the emotional state of experimental animals, by regulating social, including aggressive, behavior (Stork et al., 2000). In particular, it has been reported that *Gad2* knockout mice have lower levels of aggressive-behavior indicators.
- (6) The *Gria2* gene (glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2) encodes a subunit of glutamate receptor: the most important participant of excitatory processes in the central nervous system. Blockage of this receptor in naive mice decreases aggressiveness in comparison with littermates having normally functioning glutamate receptors (Vekovischeva et al., 2004).
- (7) The *Mapk1* gene (mitogen-activated protein kinase 1) encodes a mitogen-activated protein kinase, which performs a complex function in cellular processes (e. g., control of

- gene transcription, metabolism, and proliferation) in central-nervous-system neurons. It was demonstrated that mice with a conditional knockout of this gene exhibit increased aggressiveness (Satoh et al., 2011).
- (8) The *Nos1* gene (nitric oxide synthase 1) encodes an enzyme, neuronal nitric oxide synthase, that catalyzes the synthesis of nitric oxide and is an important player in neurotransmission. Studies have shown that the role of the *Nos1* gene in aggressive behavior is based on the interaction of nitric oxide synthase with serotonin transporter, and this process decreases serotonin uptake (Nelson et al., 1995; Reif et al., 2009; Veroude et al., 2016) and leads to a decrease in aggressiveness (Kulikov et al., 2012).
- (9) The *Pomc* gene (proopiomelanocortin) is a gene of a prohormone, proopiomelanocortin, which is a precursor of adrenocorticotrophic hormone. Studies have revealed that melanocortin is associated with aggressive behavior (Værøy et al., 2018). In particular, in aggressive foxes, the level of expression of the *Pomc* gene is lower as compared to tame foxes (Gulevich et al., 2004).
- (10) The *Syn1* gene (synapsin I) encodes a phosphoprotein that regulates the release of neurotransmitters in synapses on the surface of synaptic vesicles. Research on rats and mice indicates a decrease in the expression of *Syn1* during chronic stress and early isolation (Elizalde et al., 2010; Park et al., 2014), which is usually accompanied by changes of behavior in general and aggressiveness in particular.

Materials and methods

Experimental animals. The number of experimental rats was determined and experiments on the rats were carried out in accordance with international European bioethical standards (Directive 2010/63/EU) and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals approved by the Ministry of Health of Russia (Appendix to decree No. 267 of June 19, 2003).

The work was performed on sexually mature males of the 88th and 90th generations of two outbred strains (tame and aggressive). The experiment involved 6 animals of the 88th ge-

neration (3 tame rats vs. 3 aggressive rats) and 12 animals from the 90th generation (6 tame rats vs. 6 aggressive rats). To exclude the influence of the photoperiod on the physiology and behavior of the experimental animals, we used rats born at the same time of the year. In accordance with the selection criterion (a reaction to humans in the glove test; Belyaev, Borodin, 1985; Plyusnina et al., 2007), the aggressive-defensive response in selected aggressive rats corresponded to a score of -3.5 points. For tame rats, the behavioral score in the glove test was +3.5 points, which is an indicator of strong domestication.

Isolation of total RNA and real-time PCR (RT-PCR). Hypothalamic samples were dissected postmortem, collected into liquid nitrogen, and stored at -70 °C until use. Total RNA was extracted from frozen tissue specimens using the TRIzol™ Reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer’s protocol. RNA quality was evaluated on an Invitrogen Qubit™ 2.0 fluorometer (Invitrogen/Life Technologies, USA). The RNA was purified using paramagnetic RNAClean XP beads (Beckman Coulter, USA) and dissolved in double-distilled water. To remove impurities of genomic DNA, the RNA was treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA). RNA quality was determined on Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa-Clara, CA, USA).

Complementary DNA (cDNA) was synthesized with kits from Syntol (Russia). The reaction included 1 µg of RNA, and all the procedures were carried out according to the manufacturer’s protocols. Oligonucleotide primers for RT-PCR were designed in the PrimerBLAST software (see the Table). Gene expression was assessed by RT-PCR using the CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA). After the PCR, for reactions with the intercalating dye EVAGreen, product specificity was assessed by melting-curve analysis. Each reaction was carried out in duplicate (technical replicates). Amplification efficiency was 90 to 110 % for each primer pair. Target genes’ expression values were normalized to *Rpl30* expression as a reference.

Statistical analysis. This analysis of the PCR results was performed by Student’s *t* test as well as factor analysis (multivariate exploratory techniques: factor analysis, varimax,

Primer sequences for RT-PCR (5'→3')

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Cacna1b</i>	CCCTGGTGGCATTGCAATC	AGTTTAGGCAGCCGCTTGAT
<i>Cacna2d3</i>	TAAGCTGCGACGATGAGACTG	TGACAGCTCCTTCGACCTCA
<i>Drd2</i>	CTGGAAGCCTCGAGCAGC	TCTGCCTCTCCAGATCGTCA
<i>Egr1</i>	AACAACCCTACGAGCACCTG	AAAGGGGTTCAGGCCACAAA
<i>Gad2</i>	GCTCATCGCATTCACGTCAG	GGCACTCACCAGGAAAGGAA
<i>Gria2</i>	GGACTACCGCAGAAGGAGTAG	AGGCCTTGTTCAATCAGTTTGTAGT
<i>Mapk1</i>	CAGGTTGTTCCTCAAACGCTG	GAGCCCTGTCTCTGACCAAT
<i>Nos1</i>	ACCCGACCTCAGAGACAAC	AAGCTTCTCCTGTCCGCAA
<i>Pomc</i>	CATCATCAAGAACGCGCACAA	TAAGCTAAGAGGCTGGAGGTCA
<i>Syn1</i>	TGCCAATGGTGGATTCTCCG	CAGCCCAATGACCAAACCTGC
<i>Rpl30</i>	ATGGTGGCTGCAAAGAAGAC	CAAAGCTGGACAGTTGTTGG

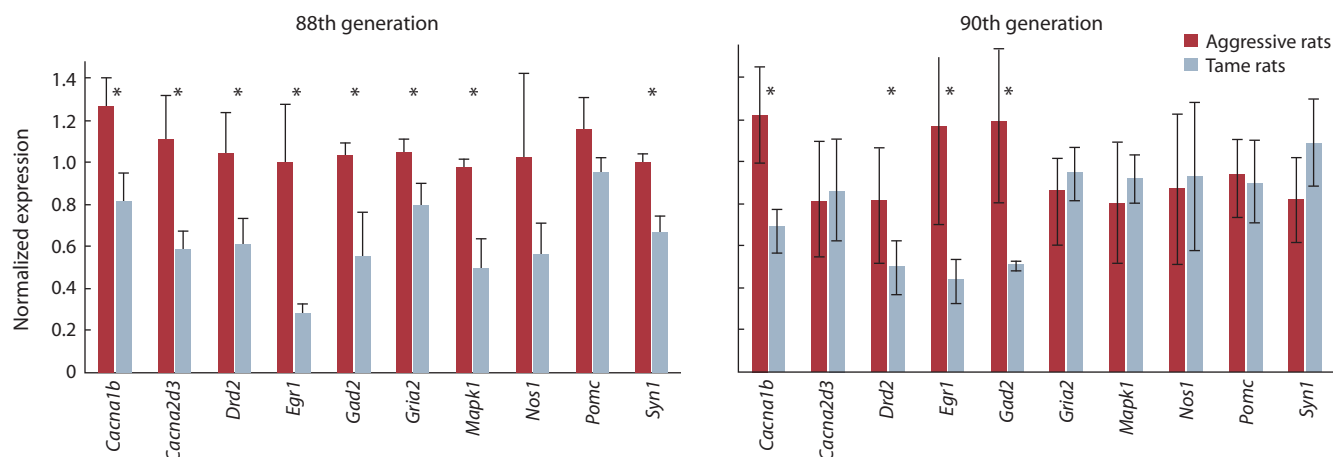


Fig. 1. Normalized *Cacna1b*, *Cacna2d3*, *Drd2*, *Egr1*, *Gad2*, *Gria2*, *Mapk1*, *Nos1*, *Pomc*, and *Syn1* mRNA levels in the hypothalamus of tame and aggressive rats of the 88th and 90th generations.

Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. The significance of the interstrain differences is indicated by an asterisk ($p < 0.05$).

and variance maximization). The statistical analyses were performed in Statistica 6.0. Results are presented as mean $\pm$ standard error of the mean, and data satisfying the condition $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

By RT-PCR verification in the hypothalamus of 88th generation rats, genes were identified that were differentially expressed between the aggressive strain and tame strain of rats. Thus, in aggressive rats, expression levels of genes *Cacna1b*, *Cacna2d3*, *Drd2*, *Egr1*, *Gad2*, *Gria2*, *Mapk1*, and *Syn1* were found to be significantly higher as compared to tame rats (Fig. 1; t test $p < 0.05$). The expression of genes *Nos1* and *Pomc* did not differ significantly between tame and aggressive rats of the 88th generation of the selection for the reaction to humans.

The expression of genes *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1*, and *Gad2* in the hypothalamus turned out to be significantly higher in aggressive 90th generation rats than in tame rats of the same generation (see Fig. 1; $p < 0.05$). On the contrary, in these animals, no significant interstrain differences were found in the expression of genes *Cacna2d3*, *Gria2*, *Mapk1*, *Nos1*, *Pomc*, and *Syn1*.

In the assay of mRNA levels of the same genes in the hypothalamic samples from rats of the 88th and 90th generations, it was found that the expression of *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1*, and *Gad2* is significantly lower in rats of the tame strain than in the aggressive strain, regardless of the generation. Therefore, these genes hold promise for further research as genes determining the behavioral phenotype of rats during the selection for the reaction to humans.

Additionally, in the factor analysis of the pooled data on gene expression in animals of the 88th and 90th generations, only two significant factors were identified (Fig. 2). The first factor significantly correlates ($p < 0.05$, Student's t test) with the expression of 4 genes (*Cacna1b*: linear correlation coefficient $r = 0.94$, *Drd2*: $r = 0.77$, *Egr1*: $r = 0.92$, and *Gad2*: $r = 0.85$) and explains the percentage of variance (32 %) in the experimental data that corresponds to the difference between aggressive and tame rats. The second factor significantly

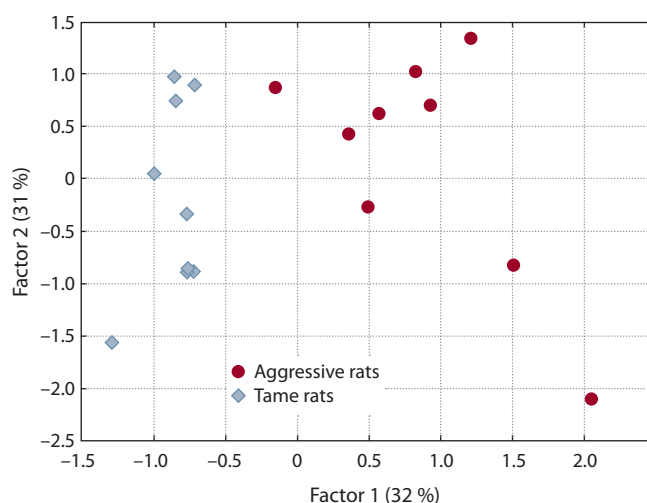


Fig. 2. Significant factors of genetic variability of the studied genes' expression in aggressive and tame rats, as revealed by the Varimax method with standard parameters of the Statistica 6.0 software.

correlates with the expression of 3 other genes (*Cacna2d3*: $r = 0.91$, *Gria2*: $r = 0.92$, and *Mapk1*: $r = 0.93$) and indicates intragroup variance (31 %) common between the aggressive and tame animals. The third factor accounts for 12 % of the variance but does not significantly correlate with the expression of any analyzed genes (data not shown).

Discussion

Here, in our analysis of RT-PCR data, between tame and aggressive rats (two generations: 88th and 90th generations of rats selected for a reaction to humans), we identified 4 differentially expressed genes (*Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1*, and *Gad2*) out of the 10 studied. Meanwhile, it was found that mRNA levels of these genes do not differ between the two generations within each strain.

The *Cacna1b* gene encodes the Cav2.2 protein, which is a subunit of high-threshold calcium channels that control the release of neurotransmitters from neurons. This subunit of the

calcium channel regulates the passage of calcium ions, thereby determining the properties of the channel. The *Cacna1b* gene is expressed weakly in the brain (Castiglioni et al., 2006), but the calcium channel subunit encoded by it plays an important role in the body's response to aversive stimuli (Bunda et al., 2019). Calcium channels promote a release of neurotransmitters at excitatory synapses, resulting in suppression of exploratory behavior on the one hand and novelty-induced anxiety-like behavior (Bunda et al., 2019) on the other. Nevertheless, as demonstrated in the 74th generation of rats selected for a reaction to humans, the exploratory behavior in the open field test is practically the same between tame and aggressive rats (Kozhemyakina et al., 2016). Accordingly, the higher expression of *Cacna1b* in aggressive rats than in tame rats is probably associated with differences in anxiety-like behavior under novel conditions, as confirmed by the work of Kozhemyakina et al. (2016). In particular, in rats selected for increased aggressiveness, total motor activity for 5 min of the behavioral test is significantly higher; this parameter reflects the level of anxiety.

Our results somewhat contradict a study conducted on knockout mice, where it was shown that in the absence of calcium channel subunits, the aggressiveness of experimental animals is significantly higher (Kim C. et al., 2009). This discrepancy can be explained by the fact that the functioning of calcium channels is not directly related to aggressive reactions of the animal but rather is related to these reactions indirectly through a release of neurotransmitters, which, depending on the action of the neurotransmitter, determines the behavioral responses of the animal. For instance, serotonin, according to numerous studies, affects aggressiveness (Raleigh et al., 1991; Olivier, 2010), whereas the data on the correlation between serotonin levels and aggression (de Boer, Koolhaas, 2005) are contradictory. A chronic and sustained serotonin release is positively associated with both normal aggression (territorial conflicts or the establishment of a social hierarchy) (Raleigh et al., 1991; Audero et al., 2013) and with the pathological aggression characteristic of psychiatric patients (Zamponi, 2016). Thus, our study supplements the international research data on the relation between the expression of *Cacna1b* (encoding the calcium channel subunit) and aggressive behavior.

The expression of the *Drd2* gene (dopamine D2 receptor) is associated with aggressive behavior, as uncovered in studies on rats (VanErp, Miczek, 2000) and on humans (Qadeer et al., 2017). Given that dopamine (an endogenous ligand [agonist] of D2 receptor), just as serotonin, is involved in the regulation of aggressive behavior, a change in *Drd2* expression leads to various pathologies, for example, to increased aggressiveness (VanErp, Miczek, 2000; Miczek et al., 2002; Kim V. et al., 2015; Golden et al., 2019). At the same time, an aggressive interaction stimulates dopaminergic and serotonergic activities in the limbic regions of the brain (Summers, Winberg, 2006). In other words, hypothalamic-neuron activation, leading to the release of dopamine, may in turn promote the excitation of those hypothalamic neurons that control the attack (Yamaguchi, Lin, 2018). In relation to our study, these literature data indicate that the increased level of *Drd2* expression in aggressive rats of both generations may actually be related to the phenotypic manifestation of aggressive reactions to humans.

The third differentially expressed gene in the rats selected for the reaction to humans, *Egr1*, encodes a transcription factor participating in the transcriptional activation of genes necessary for mitogenesis and cell differentiation. It is known that transcription factor *Egr1* regulates the expression of genes that control synaptic plasticity and learning and memory processes; these functions make *Egr1* an important object of research on the coherence of neural responses to various stimuli (Knapska, Kaczmarek, 2004). It has been reported that after exposure to stress, the expression of *Egr1* in rats increases in neocortical regions, including the hypothalamus (Watanabe et al., 1994; Cullinan et al., 1995).

The higher expression of the *Egr1* gene that we found in aggressive rats compared to tame rats can apparently be explained by the response to the stimulus (in the glove test, a human hand) that was employed for the artificial selection; in essence, this is a response to a stressor. Probably, in rats of the aggressive strain, the perception of the stimulus at the molecular level affects mechanisms of the genetic response to stress, in contrast to rats of the tame strain, which, as described above, react quite calmly not only to a human hand under the test conditions but also in general. Differential expression of *Egr1* between the rats with genetically acquired aggressive or nonaggressive behavior toward humans is, in our opinion, an interesting result that can be applied to further research.

Gad2 is another gene for which we demonstrated differential expression between tame and aggressive rats of both generations. This gene encodes glutamate decarboxylase (GAD), which catalyzes the conversion of glutamate to GABA, a neurotransmitter that inhibits neuronal impulses. It is known that GABA controls aggressive behavior (Takahashi, Miczek, 2014; Hansen et al., 2018). Studies on mice have shown that aggressive animals have lower GABA levels due to decreased GAD activity in several regions of the brain (olfactory bulb, striatum, and amygdala) as compared to nonaggressive animals (Simler et al., 1982; Clement et al., 1987; Guillot, Chapouthier, 1998). On the other hand, these data were not confirmed in a study on *Gad2* knockout mice, which have a reduced amount of GABA in the brain during postnatal development; however, such mutant males manifest reduced aggressiveness in the resident-intruder test (Stork et al., 2000). The effect of GABA depends on the area of the brain, the type of receptors, and the specific context of the situation causing the aggressive behavior (Takahashi, Miczek, 2014). In our work, the higher level of *Gad2* expression in aggressive rats than in tame rats most likely corresponds to a situation when an increase in GABA synthesis in hypothalamic neurons causes an aggressive reaction of the animals in the “glove test,” which was employed for the artificial selection.

Furthermore, the factor analysis when the data on gene expression in the 88th and 90th generations were combined allows us to conclude that the following. Although the artificial selection was carried out by means of two vectors – (1) from the wild type to aggressive behavior and (2) from wild type to tame behavior – the expression of the 10 studied genes is associated with two factors: the difference between tame and aggressive rats (i. e., factor “domestication” because the selection for tame behavior is a model of domestication) and some general change that is the same for these two groups of

animals (possibly the so-called laboratoryization effect, neutral drift, or something else). Meanwhile, the “domestication” factor is common between the rats of both generations but clearly distinguishes the animals by behavioral phenotype: tame or aggressive behavior (see Fig. 2). This result enables us to conclude that, indeed, the increased expression of genes *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1*, and *Gad2* determines aggressive behavior in the selected rats, while the decreased expression corresponds to tameness.

Thus, genes *Cacna1b*, *Drd2*, *Egr1*, and *Gad2*, for which we showed interstrain differential expression in both generations (88th and 90th) of the rats selected for the reaction to humans, are promising for further studies on characteristics of domestication and aggressive behavior in animals. In our work, it was revealed that the manifestation of an aggressive and nonaggressive reaction to humans in rats of the 88th and 90th generations (of artificial selection for this trait) is controlled not by one but by several genes. Moreover, the protein products of these genes differ both in function and in the neurotransmitter systems in which they participate.

Conclusion

Our expression analysis of 10 genes (by RT-PCR) in the hypothalamus of rats selected for a reaction to humans (tame and aggressive behavior) indicates that 4 genes are differentially expressed between tame and aggressive rats of both the 88th and 90th generation. Polygenic causes of the phenotypic manifestation of aggressive reactions were confirmed on model animals. Genes were identified that are most appealing for further research on the behavioral characteristics of rats selected for a response to humans.

References

- Albert F.W., Somel M., Carneiro M., Aximu-Petri A., Halbwax M., Thalmann O., Blanco-Aguilar J.A., Plyusnina I.Z., Trut L., Villa-fuerte R., Ferrand N., Kaiser S., Jensen P., Pääbo S. A comparison of brain gene expression levels in domesticated and wild animals. *PLoS Genet.* 2012;8(9):e1002962. DOI 10.1371/journal.pgen.1002962.
- Anholt R.R.H., Mackay T.F.C. Genetics of aggression. *Annu. Rev. Genet.* 2012;46:145-164. DOI 10.1146/annurev-genet-110711-155514.
- Audero E., Mlinar B., Baccini G., Skachokova Z.K., Corradetti R., Gross C. Suppression of serotonin neuron firing increases aggression in mice. *J. Neurosci.* 2013;33(20):8678-8688. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2067-12.2013.
- Belyaev D.K., Borodin P.M. The influence of stress on variation and its role in evolution. In: *Evolutionary Genetics*. Leningrad, 1985;35-39. (in Russian)
- Bunda A., LaCarubba B., Bertolino M., Akiki M., Bath K., Lopez-Soto J., Lipscombe D., Andrade A. *Cacna1b* alternative splicing impacts excitatory neurotransmission and is linked to behavioral responses to aversive stimuli. *Mol. Brain.* 2019;12(1):81. DOI 10.1186/s13041-019-0500-1.
- Castiglioni A.J., Raingo J., Lipscombe D. Alternative splicing in the C-terminus of CaV2.2 controls expression and gating of N-type calcium channels. *J. Physiol.* 2006;576(Pt.1):119-134. DOI 10.1111/jphysiol.2006.115030.
- Cervantes M., Delville Y. Serotonin 5-HT1A and 5-HT3 receptors in an impulsive-aggressive phenotype. *Behav. Neurosci.* 2009;123(3):589-598. DOI 10.1037/a0015333.
- Chu Q., Liang T., Fu L., Li H., Zhou B. Behavioural genetic differences between Chinese and European pigs. *J. Genet.* 2017;96(4):707-715. DOI 10.1007/s12041-017-0826-3.
- Clement J., Simler S., Ciesielski L., Mandel P., Cabib S., Puglisi-Allegra S. Age-dependent changes of brain GABA levels, turnover rates and shock-induced aggressive behavior in inbred strains of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1987;26(1):83-88. DOI 10.1016/0091-3057(87)90538-7.
- Craig I.W., Halton K.E. Genetics of human aggressive behavior. *Hum. Genet.* 2009;126:101-113. DOI 10.1007/s00439-009-0695-9.
- Cullinan W.E., Herman J.P., Battaglia D.F., Akil H., Watson S.J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience.* 1995;64:477-505. DOI 10.1016/0306-4522(94)00355-9.
- Cushing B.S. Estrogen receptor alpha distribution and expression in the social neural network of monogamous and polygynous *Peromyscus*. *PLoS One.* 2016;11(3):e0150373. DOI 10.1371/journal.pone.0150373.
- de Boer S.F., Koolhaas J.M. 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Europ. J. Pharmac.* 2005;526:125-139. DOI 10.1016/j.ejphar.2005.09.065.
- Elizalde N., Pastor P.M., Garcia-Garcia A.L., Serres F., Venzala E., Huar-te J., Ramirez M.J., Del Rio J., Sharp T., Tordera R.M. Regulation of markers of synaptic function in mouse models of depression: chronic mild stress and decreased expression of *VGLUT1*. *J. Neurochem.* 2010;114:1302-1314. DOI 10.1111/j.1471-4159.2010.06854.x.
- Fairbanks L.A., Newman T.K., Bailey J.N., Jorgensen M.J., Breidenthal S.E., Ophoff R.A., Comuzzie A.G., Martin L.J., Rogers J. Genetic contributions to social impulsivity and aggressiveness in vervet monkeys. *Biol. Psychiatry.* 2004;55:642-647. DOI 10.1016/j.biopsych.2003.12.005.
- Golden S.A., Jin M., Heins C., Venniro M., Michaelides M., Shaham Y. Nucleus accumbens *Drd1*-expressing neurons control aggression self-administration and aggression seeking in mice. *J. Neurosci.* 2019;39(13):2482-2496. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2409-18.2019.
- Guillot P.V., Chapouthier G. Intermale aggression, GAD activity in the olfactory bulbs and Y chromosome effect in seven inbred mouse strains. *Behav. Brain Res.* 1998;90(2):203-206. DOI 10.1016/S0166-4328(97)00110-1.
- Gulevich R.G., Oskina I.N., Shikhevich S.G., Fedorova E.V., Trut L.N. Effect of selection for behavior on pituitary-adrenal axis and pro-opiomelanocortin gene expression in silver foxes (*Vulpes vulpes*). *Physiol. Behav.* 2004;82(2-3):513-518. DOI 10.1016/j.physbeh.2004.04.062.
- Hansen C.C., Ljung H., Brodtkorb E., Reimers A. Mechanisms underlying aggressive behavior induced by antiepileptic drugs: focus on topiramate, levetiracetam, and perampanel. *Behav. Neurol.* 2018;2018:2064027. DOI 10.1155/2018/2064027.
- Heyne H.O., Lautenschlager S., Nelson R., Besnier F., Rotival M., Cagan A., Kozhemyakina R., Plyusnina I.Z., Trut L., Carlborg Ö., Petretto E., Kruglyak L., Pääbo S., Schöneberg T., Albert F.W. Genetic influences on brain gene expression in rats selected for tameness and aggression. *Genetics.* 2014;198:1277-1290. DOI 10.1534/genetics.114.168948.
- Hodges T.E., Green M.R., Simone J.J., McCormick C.M. Effects of social context on endocrine function and *Zif268* expression in response to an acute stressor in adolescent and adult rats. *Int. J. Develop. Neurosci.* 2014;35(1):25-34. DOI 10.1016/j.ijdevneu.2014.03.001.
- Hooper E.D. Neural control of aggression in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2016;38:109-118. DOI 10.1016/j.conb.2016.04.007.
- Hrabovszky E., Halasz J., Meelis W., Kruk M.R., Liposits Z., Haller J. Neurochemical characterization of hypothalamic neurons involved in attack behavior: glutamatergic dominance and co-expression of thyrotropin-releasing hormone in a subset of glutamatergic neurons. *Neuroscience.* 2005;133:657-666. DOI 10.1016/j.neuroscience.2005.03.042.
- Hudziak J.J., van Beijsterveldt C.E.M., Bartels M., Rietveld M.J.H., Rettew D.C., Derks E.M., Boomsma D.I. Individual differences in

- aggression: genetic analyses by age, gender, and informant in 3-, 7-, and 10-year-old Dutch twins. *Behav. Genet.* 2003;33:575-589. DOI 10.1023/a:1025782918793.
- Ilchibaeva T.V., Kondaurova E.M., Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Popova N.K., Naumenko V.S. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF) in genetically defined fear-induced aggression. *Behav. Brain Res.* 2015;1(290):45-50. DOI 10.1016/j.bbr.2015.04.041.
- Kim C., Jeon D., Kim Y.-H., Lee C.J., Kim H., Shin H.-S. Deletion of N-type Ca^{2+} channel $\text{Ca}_v2.2$ results in hyperaggressive behaviors in mice. *J. Biol. Chem.* 2009;284(5):2738-2745. DOI 10.1074/jbc.M807179200.
- Kim V., Zhang-James Y., Fernandez-Castillo N., Bakker M., Command B., Faraone S.V. Genetics of aggressive behavior: an overview. *Am. J. Med. Genet. Part B.* 2015;171B:3-43. DOI 10.1002/ajmg.b.32364.
- Knapka E., Kaczmarek L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: *Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK?* *Prog. Neurobiol.* 2004;74(4):183-211. DOI 10.1016/j.pneurobio.2004.05.007.
- Kozhemyakina R.V. Taming of grey rat. *Priroda = Nature.* 2017;6:70-78. (in Russian)
- Kozhemyakina R.V., Konoshenko M.Y., Sakharov D.G., Smagin D.A., Markel A.L. Comparative analysis of behavior in the open/field test in wild grey rats (*Rattus norvegicus*) and in grey rats subjected to prolonged selection for tame and aggressive behavior. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity.* 2016;66:92-102. DOI 10.7868/S0044467716010093. (in Russian)
- Kruk M.R. Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1991;15:527-538. DOI 10.1016/S0149-7634(05)80144-7.
- Kudryavtseva N.N., Markel A.L., Orlov Yu.L. Aggressive behavior: genetic and physiological mechanisms. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2014;18(4/3):1133-1155. (in Russian)
- Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Terenina E., Mormède P., Popova N.K. A pharmacological evidence of positive association between mouse intermale aggression and brain serotonin metabolism. *Behav. Brain Res.* 2012;233(1):113-119. DOI 10.1016/j.bbr.2012.04.031.
- Lin D., Boyle M.P., Dollar P., Lee H., Lein E.S., Perona P., Anderson D.J. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature.* 2011;470:221-226. DOI 10.1038/nature09736.
- Lindenfors P., Tullberg B.S. Evolutionary aspects of aggression: the importance of sexual selection. *Adv. Genet.* 2011;75:7-22. DOI 10.1016/B978-0-12-380858-5.00009-5.
- Markel A.L. Biosocial base of aggressiveness and aggressive behavior. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity.* 2016;66(6):1-12. DOI 10.7868/S0044467716060071. (in Russian)
- Miczek K.A., Fish E.W., de Bold J.F., de Almeida R.M. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and γ -aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology.* 2002;163:434-458. DOI 10.1007/s00213-002-1139-6.
- Naumenko V.S., Kozhemyakina R.V., Plyusnina I.Z., Popova N.K. Expression of serotonin transporter gene and startle response in rats with genetically determined fear-induced aggression. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2009;147(1):81-83. DOI 10.1007/s10517-009-0441-2.
- Nelson R.J., Demas G.E., Huang P.L., Fishman M.C., Dawson V.L., Dawson T.M., Snyder S.H. Behavioral abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature.* 1995;378(6555):383-386. DOI 10.1038/378383a0.
- Olivier B. Serotonin and aggression. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010;1036:382-392. DOI 10.1196/annals.1330.022.
- Park H.J., Kim S.K., Kang W.S., Chung J.H., Kim J.W. Increased activation of synapsin I and mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinase in the amygdala of maternal separation rats. *CNS Neurosci. Ther.* 2014;20(2):172-181. DOI 10.1111/cns.12202.
- Pavlov K.A., Chistiakov D.A., Chekhonin V.P. Genetic determinants of aggression and impulsivity in humans. *J. Appl. Genet.* 2012;53:61-82. DOI 10.1007/s13353-011-0069-6.
- Plyusnina I.S., Schepina O.A., Oskina I.N., Trut L.N. Some features of learning in the Morris water test in rats selected for responses to humans. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2008;38(5):511-516.
- Qadeer M.I., Amar A., Mann J.J., Hasnain S. Polymorphisms in dopaminergic system genes; association with criminal behavior and self-reported aggression in violent prison inmates from Pakistan. *PLoS One.* 2017;12(6):e0173571. DOI 10.1371/journal.pone.0173571.
- Ralegh M.J., McGuire M.T., Brammer G.L., Pollack D.B., Yuwiler A. Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys. *Brain Res.* 1991;559:181-190. DOI 10.1016/0006-8993(91)90001-C.
- Reif A., Jacob C.P., Rujescu D., Herterich S., Lang S., Gutknecht L., Baehne C.G., Strobel A., Freitag C.M., Giegling I., Romanos M., Hartmann A., Rosler M., Renner T.J., Fallgatter A.J., Retz W., Ehli A.C., Lesch K.P. Influence of functional variant of neuronal nitric oxide synthase on impulsive behaviors in humans. *Arch. Gen. Psych.* 2009;66(1):41-50. DOI 10.1001/archgenpsychiatry.2008.510.
- Saetre P., Strandberg E., Sundgren P.-E., Pettersson U., Jazin E., Bergström T.F. The genetic contribution to canine personality. *Genes Brain Behav.* 2006;5:240-248. DOI 10.1111/j.1601-183X.2005.00155.x.
- Satoh Y., Endo S., Nakata T., Kobayashi Y., Yamada K., Ikeda T., Takeuchi A., Hiramoto T., Watanabe Y., Kazama T. *ERK2* contributes to the control of social behaviors in mice. *J. Neurosci.* 2011;31(33):11953-11967. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2349-11.2011.
- Simler S., Puglisi-Allegra S., Mandel P. γ -Aminobutyric acid in brain areas of isolated aggressive or non-aggressive inbred strains of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1982;16:57-61. DOI 10.1016/0091-3057(82)90013-2.
- Stork O., Ji F.Y., Kaneko K., Stork S., Yoshinobu Y., Moriya T., Shibata S., Obata K. Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking *GAD65*. *Brain Res.* 2000;865(1):45-58. DOI 10.1016/S0006-8993(00)02206-X.
- Summers C.H., Winberg S. Interactions between the neural regulation of stress and aggression. *J. Experim. Biol.* 2006;209:4581-4589. DOI 10.1242/jeb.02565.
- Takahashi A., Miczek K.A. Neurogenetics of aggressive behavior: studies in rodents. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2014;17:3-44. DOI 10.1007/7854_2013_263.
- Topilko P., Schneider-Maunoury S., Levi G., Trembleau A., Gourdji D., Driancourt M.-A., Rao Ch.V., Charnay P. Multiple pituitary and ovarian defects in *Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)*-targeted mice. *Mol. Endocrinol.* 1998;12(1):107-122. DOI 10.1210/mend.12.1.0049.
- Van Erp A.M.M., Miczek K.A. Aggressive behavior, increased accumbal dopamine, and decreased cortical serotonin in rats. *J. Neurosci.* 2000;20(24):9320-9325. DOI 10.1523/JNEUROSCI.20-24-09320.2000.
- Van Oortmerssen G.A., Bakker T.C. Artificial selection for short and long attack latencies in wild *Mus musculus domesticus*. *Behav. Genet.* 1981;11(2):115-126. DOI 10.1007/bf01065622.
- Værøy H., Adori C., Legrand R., Lucas N., Breton J., Cottard C., do Rego J.C., Duparc C., Louiset E., Lefebvre H., Déchelotte P., Western E., Andersson S., Hökfelt T., Fetissov S.O. Autoantibodies reactive to adrenocorticotrophic hormone can alter cortisol secretion in both aggressive and nonaggressive humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(28):E6576-E6584. DOI 10.1073/pnas.1720008115.

- Vekovischeva O.Y., Aitta-aho T., Echenko O., Kankaanpää A., Sepälä T., Honkanen A., Sprengel R., Korpi E.R. Reduced aggression in AMPA-type glutamate receptor GluR-A subunit-deficient mice. *Genes Brain Behav.* 2004;3:253-265. DOI 10.1111/j.1601-1848.2004.00075.x.
- Veroude K., Zhang-James Y., Fernandez-Castillo N., Bakker M.J., Command B., Faraone S.V. Genetics of aggressive behavior: an overview. *Am. J. Med. Genet. Part B.* 2016;171B:3-43. DOI 10.1002/ajmg.b.32364.
- Watanabe Y., Stone E., McEwen B.C. Induction and habituation of c-Fos and *Zif/268* by acute and repeated stressors. *NeuroReport.* 1994;5:1321-1324. DOI 10.1097/00001756-199406270-00006.
- Wulsch T., Chourbaji S., Fritzen S., Kittel S., Grünblatt E., Gerlach M., Gutknecht L., Chizat F., Golfler G., Schmitt A., Gass P., Lesch K.-P., Reif A. Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals. *J. Neural. Transm. Suppl.* 2007;72: 69-85. DOI 10.1007/978-3-211-73574-9_10.
- Yamaguchi T., Lin D. Functions of medial hypothalamic and mesolimbic dopamine circuitries in aggression. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2018;24:104-112. DOI 10.1016/j.cobeha.2018.06.011.
- Zamponi G. Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016;15:19-34. DOI 10.1038/nrd.2015.5.

ORCID ID

I.V. Chadaeva orcid.org/0000-0002-2724-5441

Acknowledgements. The work was supported by Russian Foundation for Basic Research grant No. 18-34-00496 (to IVC), publicly funded project No. 0324-2019-0042 (for NVK), and publicly funded project AAAA-A17-117072710029-7 (for SGS and RVK). The authors are grateful to Dr. V.M. Efimov for the help with the statistical analysis.

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

Received March 25, 2020. Revised October 31, 2020. Accepted November 3, 2020. Published online February 11, 2021.

Original Russian text www.bionet.nsc.ru/vogis/

The role of the corticotropin-releasing hormone and its receptors in the regulation of stress response

E.V. Sukhareva

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
✉ evsukhareva@mail.ru

Abstract. Stress is an essential part of everyday life. The neuropeptide corticotropin-releasing hormone (CRH, also called CRF and corticoliberin) plays a key role in the integration of neuroendocrine, autonomic and behavioral responses to stress. The activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis) by neurons of the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN), the primary site of synthesis CRH, triggers stress reactions. In addition to the hypothalamus, CRH is widespread in extrahypothalamic brain structures, where it functions as a neuromodulator for coordination and interaction between the humoral and behavioral aspects of a stress response. The axons of neurons expressing CRH are directed to various structures of the brain, where the neuropeptide interacts with specific receptors (CRHR1, CRHR2) and can affect various mediator systems that work together to transmit signals to different brain regions to cause many reactions to stress. Moreover, the effect of stress on brain functions varies from behavioral adaptation to increased survival and increased risk of developing mental disorders. Disturbances of the CRH system regulation are directly related to such disorders: mental pathologies (depression, anxiety, addictions), deviations of neuroendocrinological functions, inflammation, as well as the onset and development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. In addition, the role of CRH as a regulator of the neurons structure in the areas of the developing and mature brain has been established. To date, studies have been conducted in which CRHR1 is a target for antidepressants, which are, in fact, antagonists of this receptor. In this regard, the study of the participation of the CRH system and its receptors in negative effects on hormone-dependent systems, as well as the possibility of preventing them, is a promising task of modern physiological genetics. In this review, attention will be paid to the role of CRH in the regulation of response to stress, as well as to the involvement of extrahypothalamic CRH in pathophysiology and the correction of mental disorders.

Key words: corticotropin-releasing factor; corticotropin-releasing factor receptors; stress; psychopathology; hypothalamus; extrahypothalamic brain structures.

For citation: Sukhareva E.V. The role of the corticotropin-releasing hormone and its receptors in the regulation of stress response. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):216-223. DOI 10.18699/VJ21.025

Роль кортикотропин-рилизинг гормона и его рецепторов в регуляции нейрофизиологических и поведенческих реакций на стресс

Е.В. Сухарева

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
✉ evsukhareva@mail.ru

Аннотация. Стресс является неотъемлемой частью повседневной жизни. Нейропептид кортикотропин-рилизинг гормон (CRH, также называемый CRF и кортиколиберином) играет ключевую роль в интеграции нейроэндокринных, вегетативных и поведенческих реакций на стресс. Активация гипоталамо-гипофизарной-надпочечниковой системы нейронами паравентрикулярного ядра гипоталамуса (PVN), основного места синтеза CRH, запускает стрессорную реакцию. Помимо гипоталамуса, CRH широко распространен во внегипоталамических структурах головного мозга, где он функционирует как нейромодулятор для координации и взаимодействия между гуморальными и поведенческими аспектами реакции на стресс. Аксоны нейронов, экспрессирующих CRH, направляются к различным структурам головного мозга, где нейропептид взаимодействует со специфическими рецепторами (CRHR1, CRHR2) и может оказывать влияние на различные медиаторные системы, которые действуют сообща для передачи сигналов в разные области мозга, чтобы вызвать множество реакций на стресс. При этом воздействие стресса на функции мозга варьирует от поведенческой адаптации до повышения выживаемости и увеличения риска развития психических расстройств. Нарушения в регуляции системы CRH непосредственно связаны со следующими расстройствами:

психическими патологиями (депрессией, тревожностью, зависимостями), отклонениями нейроэндокринологических функций, воспалением, а также с возникновением и развитием нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера. Кроме того, установлена роль CRH как регулятора структуры нейронов в областях развивающегося и зрелого мозга. На данный момент проведены исследования, в которых CRHR1 выступает мишенью для антидепрессантов, в качестве которых используются антагонисты этого рецептора. В связи с этим исследование участия системы CRH и его рецепторов в негативных эффектах на гормон-зависимые системы, а также возможности их предотвращения является перспективной задачей современной физиологической генетики. В настоящем обзоре внимание уделено роли CRH в регуляции реакции на стресс, а также участию внегипоталамического CRH в патофизиологии и коррекции психических расстройств.

Ключевые слова: кортикотропин-рилизинг фактор; рецепторы кортикотропин-рилизинг фактора; стресс; психопатологии; гипоталамус; внегипоталамические структуры головного мозга.

Corticotropin-releasing hormone system

The mammalian family of CRH peptides includes CRH, urocortin 1 (UCN1), urocortin 2 (UCN2), and urocortin 3 (UCN3) (Hauger et al., 2006). These 38–41 amino acid peptides are structurally related and have high (26–54 %) sequence identity (Dautzenberg, Hauger, 2002). These peptide hormones and their receptors are ubiquitous in mammalian tissues, playing a key role in stress-mediated effects. Although CRH was originally described as a regulator of the hypothalamic-pituitary-adrenal system (HPA), the peptide is widely expressed in brain regions as well as in peripheral tissues, including the heart, blood vessels, skin, lungs, spleen, pancreas, kidneys, liver, adipose tissue, gastrointestinal tract, testes, ovaries and placenta (Hauger et al., 2006). Urocortins expression in the brain is more limited than CRH expression and is found predominantly in the Edinger–Westphal nucleus, as well as in the supraoptic nucleus, pituitary gland, lateral superior olive, cardiovascular system, skeletal muscle, kidney, adipose tissue, digestive tract and genital glands (Waters et al., 2015).

The *Crh* gene is located on the long arm of chromosome 8 (8q13) and consists of a promoter sequence, one intron, and two exons. In humans, sheep, mice, and rats, the *Crh* gene promoter sequence has 97 % homology over the first 270 bp. The gene encodes an inactive pro-hormone of 196 amino acids (pro-CRH) (King, Nicholson, 2007).

Corticoliberin and urocortins act through two receptors, CRHR1 and CRHR2, which belong to the G_s -protein-coupled receptor family. These receptors are encoded by different genes, but they have 70 % identity at the amino acid level, and their main divergence is found in the ligand-binding domains, and, therefore, are responsible for their selectivity towards agonists (Dautzenberg, Hauger, 2002). CRH is a high affinity ligand for CRHR1 and binds poorly to CRHR2, for which other related CRH peptides, UCN2 and UCN3, have higher affinity. UCN1 has the same affinity for both CRHRs (Hauger et al., 2006). The amino acid sequences of the intracellular and transmembrane domains of CRHR have 80–85 % identity. CRHRs belong to the class B G-protein-coupled receptors (secretin-receptor family) (Markovic, Grammatopoulos, 2009), which bind polypeptide hormones. As a common feature of the family, they exhibit a variety of splicing variants that can contribute to tissue-specific differences in ligand binding to the receptor. Several variants of CRHR1 splicing (CRHR1 α and CRHR1 β) have been identified, but only one, CRHR1 α ,

has biological activity, and its expression predominates (Zmijewski, Slominski, 2010). In humans, CRHR2 exists in three variants of CRHR2 α splicing, β and γ (only two isoforms are found in mice), which differ in amino-terminal domain and tissue distribution. CRHR2 α is the most common splicing variant in the brain; CRHR2 β is found exclusively in peripheral tissues such as the retina, gonads, digestive tract, heart, skeletal muscle, lungs, and skin, while CRHR2 γ is found in the septum, hippocampus, amygdala, midbrain, frontal cortex, and limbic regions of the human brain, however function not defined (Hauger et al., 2006). In terms of the expression level and its distribution, CRHR1 is the main CRH receptor in the brain, while the representation of CRHR2 is limited (Henckens et al., 2016).

The CRH system also includes a corticotropin-releasing hormone binding protein (CRH-BP), which is expressed in peripheral tissues and the brain. Previously it was thought that it binds free CRH and CRH-associated ligands, which attenuates receptor activation, but now its physiological role seems more complex and is still being studied. For example, in the ventral tegmental area (VTA), the effects of CRHR2 activation are highly dependent on CRH-BP (Wang B. et al., 2007), and recent *in vitro* data suggest a role for CRH-BP in CRHR2 localization at the cell membrane (Slater et al., 2016).

Action mechanism of corticotropin-releasing hormone

Activated CRHR1 and CRHR2 primarily transmit signals through protein binding, which leads to the induction of the cAMP/PKA molecular cascade (Deussing, Chen, 2018). PKA phosphorylates a variety of substrate proteins, including CREB, which regulates the expression of various target genes in the nucleus. In parallel, cAMP activates the EPAC factor (exchange protein directly activated by cAMP), which, in turn, triggers the MAP kinase cascade, which ultimately leads to phosphorylation of ERK1/2 (Van Kolen et al., 2010). ERK1/2 activates various transcription factors including Nur77. However, both CRH receptors can activate any G_α -subunit, albeit with different activities: $G_s \geq G_o > G_{q/11} > G_{i1/2} > G_z$ (Deussing, Chen, 2018), thereby activating the phospholipase C (PLC) cascade and leading to activation of ERK1/2 and an increase in the intracellular concentration of Ca^{2+} (Grammatopoulos, Chrousos, 2002). G_s -protein binding also leads to intracellular Ca^{2+} mobilization (Gutknecht et

al., 2009). At the same time, the binding of receptors to the G_i -protein blocks the activity of adenylate cyclase (Deussing, Chen, 2018). Thus, depending on their localization and cellular context, CRH receptors can have multiple effects (Deussing, Chen, 2018).

After CRHR activation G-protein-coupled receptor kinases (GRKs), mainly, but also protein kinases A or C (PKA and PKC), rapidly phosphorylate receptors, desensitize and increase their affinity for β -arrestins (Deussing, Chen, 2018). These processes can also alter the receptor signaling pathways. β -arrestins act as adapter proteins that bind to proteins involved in receptor endocytosis, clathrin and β -adaptin, to initiate the internalization of CRHR1 and CRHR2 via clathrin-coated vesicles (Markovic et al., 2008). The receptors are then either dephosphorylated, resensitized, and reinserted into the plasma membrane, or (upon prolonged exposure to high concentrations of the agonist) are degraded in lysosomes, which leads to a decrease in the number of receptors (Kelly et al., 2008). Severe exposure to stress can influence these processes and contribute to the degradation of CRH receptors (Reyes et al., 2008). It is important to note that not all phosphorylated receptors are transferred to endosomes (internalized); some remain on the membrane (Deussing, Chen, 2018).

CRH binding to its receptors activates the ACTH release from pituitary corticotrophic neurons (Herman, Tasker, 2016). ACTH stimulates the synthesis and release of glucocorticoids from the adrenal cortex, cortisol in primates and corticosterone in rodents. The biological effects of glucocorticoids support adaptation to stress-induced needs by controlling energy metabolism (Herman et al., 2003). The adaptive function of the HPA depends on negative feedback mechanisms that bring the system to basal levels (Quax et al., 2013). It should be noted that the *Crh* gene promoter does not contain the classical glucocorticoid response element (GRE), but there is evidence that glucocorticoids can regulate the *Crh* expression through protein-protein interactions (Nicholson et al., 2004; Kalinina et al., 2016). An atypical GRE/AP-1 element is located in the -278/-249 region of the human *CRH* gene promoter, where a specific, high-affinity glucocorticoid receptor binding was found, which provides dexamethasone-dependent inhibition of *CRH* gene transcription through protein-protein interactions. Removal of this region reduced glucocorticoid-dependent repression of the *CRH* gene promoter activity (Aguilera, Liu, 2012). Also, glucocorticoids have negative regulation of cAMP-stimulated activity of the *CRH* gene promoter, but not basal activity, which suggests that the glucocorticoids effect depends on the interaction with the CRE-associated transcription complex.

CRH and its receptors expression, participation in the stress response

CRH plays an important role in the regulation of the HPA, the main stress response system. CRH is synthesized in the neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), which are innervated from both the limbic and brainstem centers, allowing them to respond to both physical and psychological stressors (Lightman, 2008). Three main groups of neurons were described in this core:

- (1) Anterior and medial-dorsal parvocellular CRH neurons, whose axons are directed to the portal vessels of the external zone of the median eminence. Neurons in this area are classified as parvocellular due to their small size compared to large neurons. CRH neurons in this region co-express arginine-vasopressin (AVP), enkephalins, cholecystokines, and angiotensin I;
- (2) Dorsolateral magnocellular vasopressinergic and oxytocinergic neurons, whose axons are directed to the posterior pituitary gland through the inner zone of the median eminence. These neurons release peptides into the peripheral circulation. Oxytocinergic neurons, but not vasopressinergic ones, also express CRH and respond to osmotic and non-osmotic stressors;
- (3) Autonomic CRH neurons in the dorsal, medial-ventral and lateral parts of the PVN, with projections onto the brainstem and spinal cord. Neurons in this area express CRH and other neuropeptides and involved in the regulation and sympathoadrenal system (Aguilera, Liu, 2012).

In addition to PVN, CRH mRNA and protein are found in other brain areas, including limbic and other structures associated with stress responses, such as the nucleus of the end streak bed (BNST), the central nucleus of the amygdala (CeA), the locus coeruleus of the brainstem (LC), cerebral cortex, hippocampus, cerebellum, Barrington's nucleus (Bar), spinal cord segments with projections from the midbrain and pons (Kono et al., 2016). However, the functions of CRH-secreting neurons differ significantly depending on the region in which they are located. For example, neurons of the inferior olive (IO) expressing CRH send axons to the cerebellum and play an important role in the induction of synaptic plasticity of the dendritic synapses of Purkinje cells (Andres et al., 2013). IO electrical stimulation increases the amount of CRH in the cerebellum, demonstrating the physiological effect of endogenous CRH in the cerebellum (Tian, Bishop, 2003). CRH neurons in the cerebral cortex are interneurons and can modulate the activity of pyramidal neurons (Gallopín et al., 2006). In the BNST, CRH neurons are involved in recovery induced by stress (Erb, Stewart, 1999) and alcoholism (Pleil et al., 2015). At an early age, a short-term increase in CRH expression in the forebrain causes long-term anxiogenic and desperate behavioral changes in mice (Kolber et al., 2010). In CeA CRH may also be associated with stress-induced anxiety (Regev et al., 2012), and in the basolateral amygdala CRH may alter the process of memory consolidation under stress (Roozendaal et al., 2002). In Bar CRH neurons send projections to the lumbosacral spinal cord and directly (Studený, Vizzard, 2005) or indirectly (Sasaki, Sato, 2013) control the urinary reflex.

CRH is also present in other nerve structures, such as chromaffin cells in the adrenal medulla and sympathetic ganglia of the autonomic nervous system, as well as in non-neuronal peripheral organs such as the ovaries, testes, intestines, heart, lungs, and spleen (Stengel, Taché, 2010). Within the spleen, *Crh* mRNA is localized specifically in T-lymphocytes.

Glucocorticoids are the main element in the regulation of CRH expression in the hypothalamus by the type of negative feedback, which is mediated by the hormones activation by

glucocorticoid receptors (GRs). GRs are widely expressed in the medial parvocellular part of the PVN and are co-localized with CRH, which promotes rapid inhibition of CRH neurons through non-genomic signaling. This mechanism is the key to limiting the duration of glucocorticoid secretion after acute stress, since genomic feedback will not be fast enough for timely termination of HPA system activation (Herman, Tasker, 2016). Dexamethasone (a synthetic glucocorticoid) reduces the cAMP-stimulated CRH level by more than 50 % in AtT20 cells (a mouse pituitary tumor cell line that produces proopiomelanocortin (POMC)) (Abou-Seif et al., 2012). Negative feedback from glucocorticoids is a critical characteristic of HPA system, which is lost in ACTH-secreting adenomas (Perez-Castro et al., 2012) and in some patients with depression (Reul, Holsboer, 2002), creating an excess of glucocorticoids. GRs leads to both inhibition of ACTH release and repression of *Pomc* transcription. Removal of the *Crh* gene blocks both basal and stress-induced release of ACTH, which indicates the obligatory CRH involvement in the HPA activation (Muglia et al., 2000). The chronic effect of noise as a stressor increases the *Crh* mRNA level in the hypothalamus, while reducing the *Gr* mRNA level in the hippocampus. Both acute and chronic effects of noise increase the *Crhr1* mRNA level in the hypothalamus, but decrease it in the hippocampus. These data show that the involvement of CRH and GR in noise stress responses is different and depends on the brain area (Eraslan et al., 2015).

Disturbances in the parvocellular area of the PVN reduce the manifestation of anxiety in a new environment. Optogenetic inhibition of CRH expression in PVN neurons reduces stress-induced grooming and improve spatial orientation and learning after stress, while stimulation induces grooming and reduces exploratory behavior (Fuzesi et al., 2016). These data confirm that CRH PVN neurons may be involved in the coordination of behavioral as well as neuroendocrine responses to stress.

Extrahypothalamic CRH: organizing and integrating stress response

CRH controls the stress response by acting on the LC neurons, the adrenal medulla, and the peripheral sympathetic nervous system. CRH plays a key role in coordinating the peripheral stress response systems and the central norepinephrine release in response to stress. It is believed that the influence of CRH on norepinephrine release, mainly in the LC, underlies the emotional basis of the stress response (Valentino, Van Bockstaele, 2008).

Glucocorticoids, as mentioned earlier, through negative feedback inhibit the release of CRH and ACTH in the hypothalamus and pituitary gland, respectively. However, in extrahypothalamic brain structures, the glucocorticoids action stimulates rather than inhibits CRH synthesis (Kovacs, 2013). Pathologies such as anxiety and affective disorders caused by an increased glucocorticoids level and disorders in the functioning of the brain neurotransmitter systems may be due to an increased CRH expression in CeA and BNST (Donner et al., 2016). Thus, the dexamethasone introduction in the neonatal period of development leads to an increase in the *Crh* expression in the brainstem in the first hours after the

injection and to a complete restoration of the initial expression level by 6 hours, while the tyrosine hydroxylase gene expression (*Th*, a key enzyme in the norepinephrine synthesis) in this the same brain structure increased by 6 hours after dexamethasone administration, and the effect persisted 24 hours after exposure. However, preliminary administration of the CRHR antagonists – antalarmin and antisauvagin-30 before glucocorticoid therapy suppresses the increase of *Th* expression in the brainstem of neonatal rat pups caused by a single dexamethasone injection (Sukhareva et al., 2019). Based on this, it can be assumed that the use of these drugs can prevent the negative effects of hormone therapy in newborns in adulthood.

Unlike classical neurotransmitters, CRH and its related peptides act as neuroregulators: without affecting synaptic efficiency, they activate signaling processes in cells that facilitate or suppress the neurotransmitters action in certain neural networks. The CRH system is anatomically and functionally associated with monoaminergic systems, which, acting together, transmit stress signals by altering the biosynthetic activity of neurons in different brain regions, thereby inducing different responses to stress (Gallagher et al., 2008).

CRH released by extrahypothalamic brain structures directly contributes to behavioral anxiety, regardless of its effect on the pituitary gland and the sympathetic system, since an anxiety-like effect after intraventricular CRH administration persists in hypophysectomized rats (Inda et al., 2017). In rodents, increased CRH expression in the brain induces an anxiogenic behavioral phenotype (Van Gaalen et al., 2002), while suppression of CRH expression has an anxiolytic effect in basal and stress-induced anxiety (Henckens et al., 2016). CRH levels are elevated in the brains of people suffering from stress-related mental illnesses such as major depressive disorder and post-traumatic stress disorder (PTSD) (Rasmusson, Pineles, 2018) and, in some cases, normalize after treatment with antidepressants (Inda et al., 2017).

The CRH anxiogenic effects are associated with the CRHR1 receptor activation. CRHR1 blockade in rodents prevented the CRH-induced anxiogenic phenotype (Zorrilla et al., 2002), and in mice lacking *Crhr1*, the manifestation of anxiety behavior decreased (Muller et al., 2003). These results have awakened interest in the role of CRHR1 hyperactivation in stress-related psychopathology, and also opened up the possibility of using CRHR1 antagonists as potential next-generation anxiolytics and antidepressants.

In contrast to CRHR1, the role of CRHR2 activation in the manifestation of anxiety and depression is less clear, and there are two theories trying to explain the CRHR2 involvement in the CRH behavioral effects. The most common hypothesis – CRHR2 activation is responsible for providing physiological and psychological homeostasis and counteracts the initial effects of CRHR1 activation, which induce stress response and anxiety-like behavior (Bale, Vale, 2004). This assumption is based on data obtained in *Crhr2* knockout mice, which have an increased release of corticosterone under stress, an anxiogenic phenotype (Bale et al., 2000), and an increase in recovery time after stress (Issler et al., 2014). Similar manifestations were noted in mice that lacked all three

urocortins (UCN1–UCN3), the primary ligands for CRHR2 (Neufeld-Cohen et al., 2010). An alternative hypothesis for the role of CRHR2 – CRHR1 and CRHR2 are responsible for opposite types of stress-related behavior. CRHR1 mediates active defensive behavior (caused by controlled stress), while CRHR2 mediates passive coping behavior and depression-like reactions (such as learned helplessness caused by uncontrolled stress) (Maier, Watkins, 2005). This hypothesis is based on the necessity of CRHR2 signaling in the dorsal raphe nuclei for sensitization of serotonergic neurons and the development of a depressive-like phenotype that occurs under conditions of unavoidable stress. However, there are a number of results that do not agree with these theories (Janssen, Kozicz, 2013). This contradiction may be due to the erroneous determination of the CRH and related peptides contribution and their receptors to the observed effects due to their partially overlapping distribution patterns, not the absolute specificity of receptor activation: high concentrations of the ligand act on both receptors types, and receptor antagonists do not have specificity (Zorrilla et al., 2013).

Different types of stressors require different physiological responses in order to deal with them optimally. Not only the nature, but also the intensity and duration of the stressor influences the required neuronal response (Joels, Baram, 2009). Since the CRH system acts immediately, exerting its neuromodulatory effect on target neurons within a few seconds after its release (Gallagher et al., 2008), it is worth noting the rapid effects of CRH receptor signaling, either in the presence or absence of chronic stress.

There is a lot of data indicating that in the case of long-term exposure, CRH has effects that are fundamentally different from acute ones (Maras, Baram, 2012), and these effects are associated with a depressive rather than anxiety phenotype (Regev et al., 2011). Long-term CRH exposure and CRHR1 activation impair the neuroplasticity processes in the hippocampus. The initially activating CRH effects *in vitro* with long-term exposure to CRH are replaced by a decrease in excitatory postsynaptic potentials, which blocks short- and long-term synaptic plasticity, as well as actin polymerization. CRH destabilizes and thus thins dendritic spines, which leads to a decrease of excitatory synapses which ready for potentiation (Chen et al., 2013). These effects are mediated by local CRHR1-induced activation of NMDA receptors.

In terms of behavior, long-term CRHR1 activation as a consequence of chronic stress is associated with impaired potentiation response in the hippocampus. Mice lacking CRHR1 in forebrain neurons show no negative effects of chronic stress on learning and memory (Wang X. et al., 2011), and CRHR1 antagonist administration to wild-type rodents immediately after exposure to a stressor restores long-term potentiation (LTP) and integrity dendritic structure (Ivy et al., 2010). Thus, in contrast to the positive effects of short-term exposure to basal CRH levels, the peptide exposure under severe stress, when the hormone level is increased, leads to the loss of synapses for a longer period (Chen et al., 2012). Consistent with this, memory impairments are common in people with post-traumatic stress disorder (PTSD) (Brewin et al., 2007), and repeated injection of the selective CRHR1

antagonist prevents this cognitive impairment and the associated decrease in the excitability of hippocampal neurons in a mouse model of PTSD (Philbert et al., 2013). Differences in the manifestations of short-term and long-term CRH exposure emphasize the importance of carefully studying the effects of CRHR signaling over a long period of time (hours, days) and the importance of the mechanisms behind their constancy over time. Factors such as age, gender, and genetics, often in conjunction with life events, are the main determinants of the effects observed after the CRH system activation (Koenig et al., 2011).

Differential expression of receptors and their ligands in the brain reflect the different actions that CRH has at the CNS level. The results show a more complex modulating role for the CRH system than the conventional wisdom, where CRHR1 causes anxiety and CRHR2 mediates recovery after stress. While CRH-mediated activation of CRHR1 increases basal and stress-induced anxiety in many brain areas, including BLA, BNST, and PAG, a more complex picture is observed for other brain regions. For example, in the globus pallidus, CRHR1 activation is associated with anxiolytic effects, whereas the potential anxiogenic effects of CRHR1 activation in CeA appear to depend on the strength and duration of stress (Henry et al., 2006). The same is observed in NAc. In addition, the effects of CRHR2 activation appear to be dynamic and highly dependent on the amount of endogenous ligand and prior exposure.

It is known that repeated daily subthreshold activation of CRH receptors in the BNST induces a state similar to chronic anxiety. BNST neurons are largely projected onto neurons in the dorsal raphe nuclei (DR), the main source of serotonin in the brain. Repetitive CRHR activation in BNST, caused anxiety, increases the genes expression of the serotonergic system in DR, including *Tph2* (a gene of a key serotonin synthesis enzyme) and *Slc6a4* (a gene encoding a serotonin transporter (SERT)) (Donner et al., 2020). CRH overexpression in BNST neurons selectively decreases the CRHR2 expression within the dorsomedial DR and increases the manifestation of emotional memory (Sink et al., 2013). Conversely, serotonergic projections from DR to CRH neurons in BNST promote the development of anxiety through 5-HT_{2C} receptors activation (Marcinkiewicz et al., 2016). Direct CRH neurons activation in the nucleus ovale of the BNST induces the anxiety that occurs after chronic stress. Thus, CRH neurons in the nucleus oval of the BNST and serotonergic neurons in DRD appear to have reciprocal connections that play a role in the control of emotional behavior, including defensive behavioral responses similar to anxiety.

Conclusion

The effects of stress on brain function are diverse. These include behavioral adaptation, and increased survival, as well as an increased risk of developing mental disorders associated with stress. Based on the presented data, the activity of the hypothalamic and extrahypothalamic CRH systems is capable of determining the stress response. Disturbance in the CRH system functioning is associated with the occurrence of addictions, anxiety, post-traumatic stress syndrome,

and major depressive disorder. Prevention of such negative consequences is the most important scientific-practical task. The CRH involvement in the formation mechanisms of such a variety of pathologies, reflecting the stress effects on brain functioning, suggests that the extrahypothalamic CRH system may be a potential molecular target for preventing the negative consequences of stress with a high therapeutic potential, because chronic elevated CRH concentrations have been found in the cerebrospinal fluid of patients with mood disorders, depression, and post-traumatic stress disorder.

References

- Abou-Seif C., Shipman K., Allars M., Norris M., Chen Y., Smith R., Nicholson R. Tissue specific epigenetic differences in CRH gene expression. *Front. Biosci.* 2012;17:713-725. DOI 10.2741/3953.
- Aguilera G., Liu Y. The molecular physiology of CRH neurons. *Front. Neuroendocrin.* 2012;33:67-84. DOI 10.1016/j.yfrne.2011.08.002.
- Andres A., Regev L., Phi L., Seese R., Chen Y., Gall C., Baram T. NMDA receptor activation and calpain contribute to disruption of dendritic spines by the stress neuropeptide CRH. *J. Neurosci.* 2013; 33(43):16945-16960. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1445-13.2013.
- Bale T., Contarino A., Smith G., Chan R., Gold L., Sawchenko P., Koob G., Vale W., Lee K. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat. Genet.* 2000;24:410-414. DOI 10.1038/74263.
- Bale T., Vale W. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu. Rev. Pharmacol.* 2004;44:525-557. DOI 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410.
- Brewin C., Kleiner E., Vasterling J., Field A. Memory for emotionally neutral information in posttraumatic stress disorder: a meta-analytic investigation. *J. Abnorm. Psychol.* 2007;116:448-463. DOI 10.1037/0021-843X.116.3.448.
- Chen Y., Andres A., Frotscher M., Baram T. Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system. *Front. Cell. Neurosci.* 2012;6:13. DOI 10.3389/fncel.2012.00013.
- Chen Y., Kramár E., Chen L., Babayan A., Andres A., Gall C., Lynch G., Baram T. Impairment of synaptic plasticity by the stress mediator CRH involves selective destruction of thin dendritic spines via RhoA signaling. *Mol. Psychiatry.* 2013;18:485-496. DOI 10.1038/mp.2012.17.
- Dautzenberg F., Hauger R. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002;23: 71-77. DOI 10.1016/s0165-6147(02)01946-6.
- Deussing J., Chen A. The corticotropin-releasing factor family: physiology of the stress response. *Physiol. Rev.* 2018;98(4):2225-2286. DOI 10.1152/physrev.00042.2017.
- Donner N., Davies S., Fitz S., Kienzle D., Shekhar A., Lowry C. Crh receptor priming in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) induces *tpst2* gene expression in the dorsomedial dorsal raphe nucleus and chronic anxiety. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2020;96:109730. DOI 10.1016/j.pnpbp.2019.109730.
- Donner N., Siebler P., Johnson D., Villarreal M., Mani S., Matti A., Lowry C. Serotonergic systems in the balance: CRHR1 and CRHR2 differentially control stress-induced serotonin synthesis. *Psychoneuroendocrinology.* 2016;63:178-190. DOI 10.1016/j.psyneuen.2015.09.024.
- Eraslan E., Akyazi İ., Ergül-Ekiz E., Matur E. Noise stress-induced changes in mRNA levels of corticotropin-releasing hormone family molecules and glucocorticoid receptors in the rat brain. *Folia Biol.* 2015;61(2):66-73.
- Erb S., Stewart J. A role for the bed nucleus of the stria terminalis, but not the amygdala, in the effects of corticotropin-releasing factor on stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *J. Neurosci.* 1999; 19(20):RC35. DOI 10.1523/JNEUROSCI.19-20-j0006.1999.
- Fuzesi T., Daviu N., Wamsteeker Cusulin J., Bonin R., Bains J. Hypothalamic CRH neurons orchestrate complex behaviours after stress. *Nat. Commun.* 2016;7:11937. DOI 10.1038/ncomms11937.
- Gallagher J., Orozco-Cabal L., Liu J., Shinnick-Gallagher P. Synaptic physiology of central CRH system. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;583: 215-225. DOI 10.1016/j.ejphar.2007.11.075.
- Gallopín T., Geoffroy H., Rossier J., Lamboloz B. Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb. Cortex.* 2006;16(10):1440-1452. DOI 10.1093/cercor/bhj081.
- Grammatopoulos D., Chrousos G. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002;13:436-444. DOI 10.1016/s1043-2760(02)00670-7.
- Gutknecht E., Van der Linden I., Van Kolen K., Verhoeven K., Vauquelin G., Dautzenberg F.M. Molecular mechanisms of corticotropin-releasing factor receptor-induced calcium signaling. *Mol. Pharmacol.* 2009;75:648-657. DOI 10.1124/mol.108.050427.
- Hauger R., Risbrough V., Brauns O., Dautzenberg F. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2006;5:453-479. DOI 10.2174/187152706777950684.
- Henckens M., Deussing J., Chen A. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 2016;17:636-651. DOI 10.1038/nrn.2016.94.
- Henry B., Vale W., Markou A. The effect of lateral septum corticotropin-releasing factor receptor 2 activation on anxiety is modulated by stress. *J. Neurosci.* 2006;26:9142-9152. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1494-06.2006.
- Herman J., Figueiredo H., Mueller N., Ulrich-Lai Y., Ostrander M.M., Choi D., Cullinan W. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrin.* 2003;24:151-180. DOI 10.1016/j.yfrne.2003.07.001.
- Herman J., Tasker J. Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Front. Endocrinol.* 2016;7:137. DOI 10.3389/fendo.2016.00137.
- Inda C., Armando N., Dos Santos Claro P., Silberstein S. Endocrinology and the brain: corticotropin-releasing hormone signaling. *Endocr. Connect.* 2017;6(6):R99-R120. DOI 10.1530/EC-17-0111.
- Issler O., Carter R., Paul E., Kelly P., Olverman H., Neufeld-Cohen A., Kuperman Y., Lowry C., Seckl J., Chen A., Jamieson P. Increased anxiety in corticotropin-releasing factor type 2 receptor-null mice requires recent acute stress exposure and is associated with dysregulated serotonergic activity in limbic brain areas. *Biol. Mood Anxiety Disord.* 2014;4:1. DOI 10.1186/2045-5380-4-1.
- Ivy A., Rex C., Chen Y., Dubé C., Maras P., Grigoriadis D., Gall C., Lynch G., Baram T. Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early-life stress involve excessive activation of CRH receptors. *J. Neurosci.* 2010;30(39):13005-13015. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1784-10.2010.
- Janssen D., Kozicz T. Is it really a matter of simple dualism? Corticotropin-releasing factor receptors in body and mental health. *Front. Endocrinol.* 2013;4:28. DOI 10.3389/fendo.2013.00028.
- Joels M., Baram T. The neuro-symphony of stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10:459-466. DOI 10.1038/nrn2632.
- Kalinina T.S., Sukhareva E.V., Dygalo N.N. Canonical and noncanonical mechanisms of glucocorticoid stress hormone action. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk = Advances in Physiological Sciences.* 2016;47(3):59-69. (in Russian)
- Kelly E., Bailey C., Henderson G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br. J. Pharmacol.* 2008;153:379-388. DOI 10.1038/sj.bjp.0707604.
- King B., Nicholson R. Advances in understanding corticotrophin-releasing hormone gene expression. *Front. Biosci.* 2007;12:581-590. DOI 10.2741/2084.

- Koenig J., Walker C., Romeo R., Lupien S. Effects of stress across the lifespan. *Stress*. 2011;14:475-480. DOI 10.3109/10253890.2011.604879.
- Kolber B., Boyle M., Wiczorek L., Kelley C., Onwuzurike C., Nettles S., Vogt S., Muglia L. Transient early-life forebrain corticotropin-releasing hormone elevation causes long-lasting anxiogenic and despair-like changes in mice. *J. Neurosci.* 2010;30(7):2571-2581. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4470-09.2010.
- Kono J., Konno K., Talukder A., Fuse T., Abe M., Uchida K., Horio S., Sakimura K., Watanabe M., Itoi K. Distribution of corticotropin-releasing factor neurons in the mouse brain: a study using corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein knock-in mouse. *Brain Struct. Funct.* Available online 2016, 16 Sept. Publ. 2017;222(4):1705-1732. DOI 10.1007/s00429-016-1303-0.
- Kovacs K. CRH: the link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *J. Chem. Neuroanat.* 2013;54:25-33. DOI 10.1016/j.jchemneu.2013.05.003.
- Lightman S. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J. Neuroendocrinol.* 2008;20:880-884. DOI 10.1111/j.1365-2826.2008.01711.x.
- Maier S., Watkins L. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005;29:829-841. DOI 10.1016/j.neubiorev.2005.03.021.
- Maras P., Baram T. Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends Neurosci.* 2012;35:315-324. DOI 10.1016/j.tins.2012.01.005.
- Marcinkiewicz C., Mazzone C., D'Agostino G., Halladay L., Hardaway J., DiBerto J., Navarro M., Burnham N., Cristiano C., Dorrier C., Tipton G., Ramakrishnan C., Kozicz T., Deisseroth K., Thiele T., McElligott Z., Holmes A., Heisler L., Kash T. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. *Nature*. 2016;537(7618):97-101. DOI 10.1038/nature19318.
- Markovic D., Grammatopoulos D. Focus on the splicing of secretin GPCRs transmembrane-domain 7. *Trends Biochem. Sci.* 2009;34:443-452. DOI 10.1016/j.tibs.2009.06.002.
- Markovic D., Punna A., Lehnert H., Grammatopoulos D. Intracellular mechanisms regulating corticotropin-releasing hormone receptor-2 β endocytosis and interaction with extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol. Endocrinol.* 2008;22:689-706. DOI 10.1210/me.2007-0136.
- Muglia L., Bethin K., Jacobson L., Vogt S., Majzoub J. Pituitary-adrenal axis regulation in CRH-deficient mice. *Endocr. Res.* 2000;26:1057-1066. DOI 10.3109/07435800009048638.
- Muller M., Zimmermann S., Sillaber I., Hagemeyer T., Deussing J., Timpl P., Kormann M., Droste S., Kühn R., Reul J., Holsboer F., Würst W. Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat. Neurosci.* 2003;6:1100-1107. DOI 10.1038/nn1123.
- Neufeld-Cohen A., Tsoory M., Evans A., Getselter D., Gil S., Lowry C., Vale W., Chen A. A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107:19020-19025. DOI 10.1073/pnas.1013761107.
- Nicholson R., King B., Smith R. Complex regulatory interactions control CRH gene expression. *Front. Biosci.* 2004;9:32-39. DOI 10.2741/1204.
- Perez-Castro C., Renner U., Haedo M., Stalla G., Arzt E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol. Rev.* 2012;92:1-38. DOI 10.1152/physrev.00003.2011.
- Philbert J., Belzung C., Griebel G. The CRF1 receptor antagonist SSR125543 prevents stress-induced cognitive deficit associated with hippocampal dysfunction: comparison with paroxetine and D-cycloserine. *Psychopharmacol.* 2013;228:97-107. DOI 10.1007/s00213-013-3020-1.
- Pleil K., Rinker J., Lowery-Gionta E., Mazzone C., McCall N., Kendra A., Olson D., Lowell B., Grant K., Thiele T., Kash T. NPY signaling inhibits extended amygdala CRF neurons to suppress binge alcohol drinking. *Nat. Neurosci.* 2015;18(4):545-552. DOI 10.1038/nn.3972.
- Quax R., Manenschijn L., Koper J., Hazes J., Lamberts S., van Rossum E., Feelders R. Glucocorticoid sensitivity in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2013;9:670-686. DOI 10.1038/nrendo.2013.183.
- Rasmusson A., Pineles S. Neurotransmitter, peptide, and steroid hormone abnormalities in PTSD: biological endophenotypes relevant to treatment. *Curr. Psychiatry Rep.* 2018;20(7):52. DOI 10.1007/s11920-018-0908-9.
- Regev L., Neufeld-Cohen A., Tsoory M., Kuperman Y., Getselter D., Gil S., Chen A. Prolonged and site-specific over-expression of corticotropin-releasing factor reveals differential roles for extended amygdala nuclei in emotional regulation. *Mol. Psychiatry*. 2011;16:714-728. DOI 10.1038/mp.2010.64.
- Regev L., Tsoory M., Gil S., Chen A. Site-specific genetic manipulation of amygdala corticotropin-releasing factor reveals its imperative role in mediating behavioral response to challenge. *Biol. Psychiatry*. 2012;71(4):317-326. DOI 10.1016/j.biopsych.2011.05.036.
- Reul J., Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2002;2:23-33. DOI 10.1016/s1471-4892(01)00117-5.
- Reyes B., Valentino R., Van Bockstaele E. Stress-induced intracellular trafficking of corticotropin-releasing factor receptors in rat locus coeruleus neurons. *Endocrinology*. 2008;149:122-130. DOI 10.1210/en.2007-0705.
- Roosendaal B., Brunson K., Holloway B., McGaugh J., Baram T. Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;99(21):13908-13913. DOI 10.1073/pnas.212504599.
- Sasaki M., Sato H. Polysynaptic connections between Barrington's nucleus and sacral preganglionic neurons. *Neurosci. Res.* 2013;75(2):150-156. DOI 10.1016/j.neures.2012.11.008.
- Sink K., Walker D., Freeman S., Flandreau E., Ressler K., Davis M. Effects of continuously enhanced corticotropin releasing factor expression within the bed nucleus of the stria terminalis on conditioned and unconditioned anxiety. *Mol. Psychiatry*. 2013;18(3):308-319. DOI 10.1038/mp.2011.188.
- Slater P., Cerda C., Pereira L., Andres M., Gysling K. CRF binding protein facilitates the presence of CRF type 2 α receptor on the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113:4075-4080. DOI 10.1073/pnas.1523745113.
- Stengel A., Taché Y. Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. *Exp. Biol. Med.* 2010;235(10):1168-1178. DOI 10.1258/ebm.2010.009347.
- Studený S., Vizzard M. Corticotropin-releasing factor (CRF) expression in postnatal and adult rat sacral parasympathetic nucleus (SPN). *Cell Tissue Res.* 2005;322(3):339-352. DOI 10.1007/s00441-005-0014-2.
- Sukhareva E.V., Lanshakov D., Kalinina T., Bulygina V., Dygalo N. Extrahypothalamic CRH and its receptors change tyrosine hydroxylase expression after neonatal dexamethasone treatment. *Eur. Neuropharmacol.* 2019;29(6):301-302. DOI 10.1016/j.euroneuro.2019.09.438.
- Tian J., Bishop G. Frequency-dependent expression of corticotropin releasing factor in the rat's cerebellum. *Neuroscience*. 2003;121(2):363-377. DOI 10.1016/s0306-4522(03)00493-7.
- Valentino R., Van Bockstaele E. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;583:194-203. DOI 10.1016/j.ejphar.2007.11.062.
- Van Gaalen M., Stenzel-Poore M., Holsboer F., Steckler T. Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour. *Eur. J. Neurosci.* 2002;15:2007-2015. DOI 10.1046/j.1460-9568.2002.02040.x.

- Van Kolen K., Dautzenberg F., Verstraeten K., Royaux I., De Hoogt R., Gutknecht E., Peeters P. Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology*. 2010;58:135-144. DOI 10.1016/j.neuropharm.2009.06.022.
- Wang B., You Z., Rice K., Wise R. Stress-induced relapse to cocaine seeking: roles for the CRF2 receptor and CRF-binding protein in the ventral tegmental area of the rat. *Psychopharmacol.* 2007;193:283-294. DOI 10.1007/s00213-007-0782-3.
- Wang X., Chen Y., Wolf M., Wagner K., Liebl C., Scharf S., Harbich D., Mayer B., Wurst W., Holsboer F., Deussing J., Baram T., Müller M., Schmidt M. Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling. *Neurobiol. Dis.* 2011;42:300-310. DOI 10.1016/j.nbd.2011.01.020.
- Waters R., Rivalan M., Bangasser D., Deussing J., Ising M., Wood S., Holsboer F., Summers C. Evidence for the role of corticotropin-releasing factor in major depressive disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015;58:63-78. DOI 10.1016/j.neubiorev.2015.07.011.
- Zmijewski M., Slominski A. Emerging role of alternative splicing of CRF1 receptor in CRF signaling. *Acta Biochim. Pol.* 2010;57:1-13.
- Zorrilla E., Roberts A., Rivier J., Koob G. Anxiolytic-like effects of antisauvagine-30 in mice are not mediated by CRF2 receptors. *PLoS One*. 2013;8:e63942. DOI 10.1016/j.yhbeh.2016.03.002.
- Zorrilla E., Valdez G., Nozulak J., Koob G., Markou A. Effects of antalarmin, a CRF type 1 receptor antagonist, on anxiety-like behavior and motor activation in the rat. *Brain Res.* 2002;952:188-199. DOI 10.1016/S0006-8993(02)03189-X.

ORCID ID

E.V. Sukhareva orcid.org/0000-0001-9263-9167

Acknowledgements. The research was funded by RFBR and the Government of the Novosibirsk Region according to the project No. 18-44-543013 and the budget project No. 0259-2021-0015.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Received June 9, 2020. Revised August 19, 2020. Accepted October 6, 2020.

Original Russian text www.bionet.nsc.ru/vogis/

Halophilic bacteria of salt lakes and saline soils of the Peri-Caspian lowland (Republic of Daghestan) and their biotechnological potential

E.A. Khalilova¹✉, S.T. Kotenko¹, E.A. Islammagomedova¹, A.A. Abakarova¹, N.A. Chernyh¹, D.A. Aliverdiyeva¹

¹ Precaspian Institute of Biological Resources of the Daghestan Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Makhachkala, Daghestan, Russia

² Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

✉ eslanda61@mail.ru

Abstract. The article presents the results of studying the biodiversity and biotechnological potential of halophilic microorganisms from the thermal highly mineralized Berikey Lake, the salty Lake Tarumovskoye and saline soils of the Peri-Caspian Lowland (Republic of Daghestan). Denitrifying halophilic bacteria of the genus *Halomonas* and *Virgibacillus* were identified using microbiological methods and 16S rRNA gene analysis. A new species *Halomonas* sp. G2 (MW386470) with a similarity of the nucleotide sequences of the 16S rRNA genes is 95 %. Strain G2 is an extreme halophile capable of growing in the range of 5–25 % NaCl (optimum 25 %) and forming a carotenoid pigment. Mesophil, 30–37 °C (optimum 30 °C); neutrophil, pH 6–8 (optimum 7.2–7.4). Strain G2 chemolithotroph; reduces nitrate or nitrite as electron donors; catalase-, amylase-, protease- and β -galactosidase-positive; lipase-, oxidase- and urease-negative. Not able to hydrolyze inositol, indole; produces lysine, gelatin, ectoine; uses citrate and sodium malate as a source of carbon and energy; does not produce ornithin, H₂S or acid from d-mannose, sucrose, glycerol, cellobiose, except for lactose and d-glucose. Susceptible to trimethoprim, ciprofloxacin, ofloxacin, kanamycin, vancomycin, rifampicin, cefuroxime, ampicillin, ceftazidime, fosfomycin, clarithromycin, cefepime, ceftazidime. The G+C content in DNA is 67.3 %. A distinctive characteristic of the isolate was the production of industrially significant hydrolytic enzymes such as amylase, protease, β -galactosidase, and oxidoreductase (catalase) at a NaCl concentration of 25 % in the medium. Habitat: saline soils on the territory of the Tersko-Kumskaya lowland (Republic of Daghestan, Russia). The rest of the halophilic isolates of *H. ventosae* G1 (MW386469), *H. elongata* G3 (MW386471), *V. salinarius* B2 (MW386472), and *V. salinarius* B3 (MW386473) had a high degree of similarity (100 %) with the type strains of *H. elongata* DSM 2581^T and *V. salinarius* DSM 18441^T; the content of G+C in DNA was 65.8, 66.5, 42.8 and 37.3 %, respectively. The strains had a high biotechnological potential at NaCl concentrations of 5 and 25 % in the medium. The data obtained expanded the understanding of the diversity and ecological significance of denitrifying bacteria in the functioning of arid ecosystems and make it possible to identify strains producing enzymes of industrial importance.

Key words: bacteria of the genus *Halomonas* and *Virgibacillus*; salt lakes; salt marshes soils; biotechnological potential.

For citation: Khalilova E.A., Kotenko S.T., Islammagomedova E.A., Abakarova A.A., Chernyh N.A., Aliverdiyeva D.A. Halophilic bacteria of salt lakes and saline soils of the Peri-Caspian lowland (Republic of Daghestan) and their biotechnological potential. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):224-233. DOI 10.18699/VJ21.026

Галофильные бактерии соленых озер и солончаковых почв Прикаспийской низменности (Республика Дагестан) и их биотехнологический потенциал

Э.А. Халилова¹✉, С.Т. Котенко¹, Э.А. Исламмагомедова¹, А.А. Абакарова¹, Н.А. Черных², Д.А. Аливердиева¹

¹ Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Махачкала, Республика Дагестан, Россия

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

✉ eslanda61@mail.ru

Аннотация. Приведены результаты изучения биоразнообразия и биотехнологического потенциала галофильных микроорганизмов из термального высокоминерализованного Берикейского озера, соленого Тарумовского озера и солончаковых почв Прикаспийской низменности (Республика Дагестан). С использованием

микробиологических методов и метода анализа генов 16S рРНК идентифицированы денитрифицирующие галофильные бактерии родов *Halomonas* и *Virgibacillus*. Выявлен новый вид *Halomonas* sp. G2 (MW386470) с 95 % уровнем сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Штамм G2 – экстремальный галофил, способный расти в диапазоне 5–25 % NaCl (оптимум 25 %) и образовывать каротиноидный пигмент. Мезофил (30–37 °C, оптимум 30 °C), нейтрофил (pH 6–8, оптимум 7.2–7.4). Хемолитотроф; редуцирует нитрат или нитрит в качестве доноров электронов; каталазо-, амилазо-, протеазо- и β-галактозидазоположительный; липазо-, оксидазо- и уреазоотрицательный. Не способен гидролизовать инозит, индол; продуцирует лизин, желатин, эктоин; в качестве источника углерода и энергии использует цитрат и малат натрия; не продуцирует орнитин, H₂S и кислоту из d-маннозы, сахарозы, глицерина, целлобиозы, кроме лактозы и d-глюкозы. Восприимчив к триметоприму, ципрофлоксацину, офлоксацину, канамицину, ванкомицину, рифампицину, цефуроксиму, ампициллину, цефтазидиму, фосфомицину, кларитромицину, цефепиму, цефаклору. Содержание G+C в ДНК 67.3 %. Отличительной характеристикой изолята являлось продуцирование промышленно значимых гидролитических ферментов, таких как амилаза, протеаза, β-галактозидаза и оксиредуктазы – каталазы при концентрации NaCl в среде 25 %. Местообитание: солончаковые почвы на территории Терско-Кумской низменности (Республика Дагестан, Россия). Остальные галофильные изоляты *H. ventosae* G1 (MW386469), *H. elongata* G3 (MW386471), *V. salinarius* B2 (MW386472) и *V. salinarius* B3 (MW386473) имели высокую степень сходства (100 %) с типовыми штаммами *H. elongata* DSM 2581^T и *V. salarius* DSM 18441^T; содержание G+C в ДНК составляло 65.8, 66.5, 42.8 и 37.3 % соответственно. Штаммы имели высокий биотехнологический потенциал при концентрации NaCl в среде 5 и 25 %. Полученные данные расширили представление о разнообразии и экологическом значении денитрифицирующих бактерий в функционировании засушливых экосистем и выявлении штаммов, продуцирующих ферменты промышленного значения. Ключевые слова: бактерии; род *Halomonas*; род *Virgibacillus*; соленые озера; почвы; солончаки; биотехнологический потенциал.

Introduction

The interest in extremophilic microorganisms is relatively high due to their biological uniqueness. A great contribution to the study of natural microbial communities was made by the school of Russian scientists (Zavarzin, 2004; Namsaraev et al., 2010; Bonch-Osmolovskaya, Atomi, 2015). Archaea and highly-specialized bacteria of the genera *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Micrococcus*, and *Pseudomonas* (Wang et al., 2019; Banciu et al., 2020; Begmatov et al., 2020) occupy a dominant place in ecological niches with a high salt content (solar salt works, oceans, seas, hypersaline lakes, saline soils, deserts, plants, saline products) and anthropogenic ecosystems with an increased level of mineralization.

The largest ecosystems on the planet are saline and hypersaline environments (Ghosh et al., 2019). Daghestan is a unique natural province of Russia that has a variety of natural landscapes due to the influence of tectonic processes, the erosive activity of flowing waters, transgressive and regressive dynamics of the Caspian Sea, and arid climate. There are a number of works on the study of microbial communities of various ecological niches of the region: lithotrophic sulfur-oxidizing representatives of sulfide sources, hydrocarbon-oxidizing bacteria of the geothermal source of the Kizlyar field (Chernousova et al., 2008; Gridneva et al., 2009; Khalilova et al., 2014).

The highly mineralized lakes of the Tersko-Kumskaya lowland with high salinity form conditions for the existence of halophilic bacteria. Microorganisms from extreme habitats are the producers of valuable industrially important enzymes, antibiotics; they can participate in soil biodegradation, and are highly resistant to contamination by foreign microflora (Corral et al., 2020).

The study considers the spatial distribution of halophilic microbial communities of halophyte plants, saline soils, and

highly mineralized lakes in arid regions of the Peri-Caspian Lowland (Khalilova et al., 2017, 2020). Chemoorgano-heterotrophic bacteria of the genera *Virgibacillus*, *Bacillus*, *Halomonas* and *Salimicrobium* from the phylum *Firmicutes* and *Proteobacteria* have proved to be the main components of the microbial flora of the Tersko-Kumskaya and Tersko-Sulakskaya provinces. A major correlation was revealed between isolated microbial communities and concentrations of chemicals Na, K, Ca, Mg, Cl, Cu, Sr, SO₄, Cl, and HCO₃, as one of the main regulators of microbiological activity in soils and lakes.

The aim of the paper is a molecular taxonomic study of isolated halophilic bacteria and their biotechnological potential.

Materials and methods

The objects of research are natural microbial communities of saline reservoirs and soils in the territory of the Peri-Caspian Lowland of the Republic of Daghestan (Khalilova et al., 2020) (Table 1). Samples were taken in July–September 2014.

Cultivation. For the cultivation of halophilic bacteria, a modified medium of the following composition (g/l) was used: bacto yeast extract – 10.00, Na₃C₆H₅O₇ · 5.5H₂O – 3.0, NaCl – 50, 100, 250, KCl – 2.0, MgSO₄ · 7H₂O – 20.0, glycerin – 4.0 (RF Pat. RU 2115722, 1998; RF Pat. RU 2323226, 2008). Bacto-peptone (Difco, Spain) – 5 g/l was used as a substrate; the pH of the medium was adjusted to 7.2–7.4 by 1N HCl or 4M KOH (Russia) using a Hanna Instrumentals pH 211 pH meter (Germany). The cultures were incubated in a Binder-115 microbiological incubator (USA) at an operating temperature of (30–37) ± 1 °C for 3–20 days.

Morphology of bacterial cells (cell morphology, motility, the presence of spore formation) was studied using

Table 1. Strains of halophilic bacteria and sources of sampling

No. of strain	Place of isolation	Source characteristic
G1	Tersko-Kumskaya lowland, Tarumovskoe Lake (44°23'28" N, 46°33'55" E)	Chloride-hydrocarbonate-sulphate-sodium water, mineralization 73.5 g/l, temperature 50–60 °C, pH 7.2–7.4 The concentration of dominant cations, mg/l: Na ⁺ – 23.0, Ca ²⁺ – 1.56, K ⁺ – 1.36, Mg ²⁺ – 0.1, Sr ²⁺ – 0.27, Li ⁺ – 0.08; anions: Cl [–] – 44.0, HCO ₃ ^{2–} – 1.1, SO ₄ ^{2–} – 0.12. In a minor amount – cations Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ and NH ₄ ⁺
G2	Tersko-Kumskaya lowland, soil, typical salt marshes (44°04'25" N, 46°32'10" E)	Soil – hydromorphic chloride-sulphate-sodium salinity; temperature – 1.5–3.5 °C, +30...+46 °C; pH 8.0–9.0
B2	Tersko-Kumskaya lowland, Berikey Lake (42°13'25" N, 48°04'38" E)	Chloride-hydrocarbonate-sulphate-sodium water, mineralization 76.5 g/l, temperature 55–60 °C, pH 6.4–6.5 Concentration of dominant cations, mg/l: Na ⁺ – 25.4, Ca ²⁺ – 2.5, K ⁺ – 0.59, B ⁺ – 0.33, Mg ²⁺ – 0.3, Sr ²⁺ – 0.26, Ba ⁺ – 0.23, Br ⁺ – 0.165, Li ⁺ – 0.11; anions: Cl [–] – 46.0, HCO ₃ ^{2–} – 1.35, SO ₄ ^{2–} – 0.24; acids: H ₃ BO ₃ – 0.33, H ₂ SiO ₃ – 0.15 g/l. In a minor amount – cations Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , As ³⁺ , Rb ⁺ , Cs ⁺ , Fe ²⁺ , NH ₄ ⁺ and anions SO ₄ ^{2–} , I [–]

a light microscope CX21 FS1 (Olympus, Japan) and the PowerShot A640 digital camera (Canon, Japan) at a working magnification of ×600.

Ecological and physiological characteristics of growth (temperature, pH, salinity). Effect of NaCl concentration (0, 5, 10, 15, 25 %, weight/volume) in an amount of 2 % of the medium volume for cell growth in liquid and solid media was determined at 30–37 °C in the Binder-115 incubator (USA). The growth was monitored at 24-hour intervals for 7 days by measuring turbidity using a Genesys-20 spectrophotometer (Thermo Spectronic, USA). The effect of temperature (30 and 37 °C) on the growth rate was determined by cultivation under the same conditions.

The use of growth substrates (assimilation of organic acids, the formation of acid from carbohydrates, reduction of nitrates to nitrites) was studied using standard methods (Gordon, Smith, 1953; Holt et al., 1997; Netrusov et al., 2005).

The use of electron acceptors. The ability to use nitrate as an electron acceptor was determined using the BD BBL Taxo Differentiation Discs Nitrate (Becton Dickinson and Company, Australia), in compliance with the manufacturer's instructions. The discs were impregnated with a solution containing 40 % potassium nitrate and 0.1 % sodium molybdate. The reduction of nitrate to nitrite was detected by the addition of sulfanilic acid and N,N-dimethyl- α -naphthylamine, which reacts with nitrite to form a red-colored substance-n-sulfobenzenazo- α -naphthylamine (positive result). In the absence of a change in color after the addition of reagents (negative result), zinc dust was added to determine the presence of unrecoverable nitrate or products other than nitrite.

Determination of enzymatic activity. Hydrolase-producing bacteria were screened for amylase, proteinase, β -galactosidase, lactase, lipase, urease, and oxidoreductases (catalases, oxidases) on dishes of starch, tributyrin, and gelatin agar, depending on the concentrations of NaCl.

Amylase activity – on the elective medium (1.0 % starch, 0.5 % peptone, 0.3 % yeast extract, 1.0 % NaCl). The isolates were incubated at 45 °C for 24–36 hours, tested with Lugol solution (10.0 g potassium iodide, 5 g iodine, 100 ml distilled water). Potential amylase producers were selected based on the ratio of the clearance zone diameter to the colony diameter. Protease was determined on media with agar and 10 % skimmed milk; β -galactosidase (lactase) – using indicator disks impregnated with a special reagent-ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (Conda, Spain); urease – using CLO test (Kimberly-Clark, USA); lipase – tested on dishes with 1 % tributyrin. Isolates showing clear zones of tributyrin hydrolysis were identified as lipase-producing bacteria.

Determination of oxidoreductases: catalase – using 3 % H₂O₂ as a substrate in the medium for 24–48 hours, oxidase – by Kovac's method (Steel, 1961). All screening tests for enzymatic activity were performed in three repetitions. The bacteria were incubated at 37 °C for seven days.

Antibiotic resistance (trimethoprim, ciprofloxacin, ofloxacin, kanamycin, vancomycin, rifampicin, cefuroxime, ampicillin, ceftazidime; fosfomycin, clarithromycin, cefepime, cefaclor) was determined by the intensity of bacterial growth on the basic agarized medium "B" in Petri dishes using standard disks "Indicator paper systems for identifying microorganisms" of NPO Microgen of Natsimbio Holding (Russia) with 10–30 μ g of antimicrobial agent (Baumann P., Baumann L., 1986).

G+C content and phylogenetic analysis. Genomic DNA was isolated according to Marmur (1961) and Thomas (Thomas et al., 1997) methods. The DNA nucleotide composition was determined by thermal denaturation (0.5 °C·min^{–1}) using a Cary-100 Bio UV-VIS spectrophotometer (Varian, Australia). The GC content in the composition of DNA – according to the method (Owen et al., 1969). *Escherichia coli* K-12 DNA (51.7 %) was used as the standard.

For phylogenetic analysis, the DNA was isolated from samples using the modified Birnboim–Doly alkaline DNA

method (Birnboim, Doly, 1979) and the Wizard technology of Promega (USA) (Bulygina et al., 2002). The concentration of the resulting DNA sample when using this method was 30–50 µg/ml. RNA in the resulting preparation is present in trace amounts (less than 1 %, according to the data of electrophoretic analysis, which are not presented).

For polymerase chain reaction (PCR) and further sequencing of PCR fragments of the 16S rRNA gene for each of the studied samples, universal primer systems were used to detect both eubacteria (11f-1492r) (Lane, 1991) and archaea (8fa-A915R) (Kolganova et al., 2002). The volume of the amplification mixture was 50 µl with the following composition: 1× buffer of BioTaq DNA polymerase (17 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM MgCl₂); 12.5 nmol of each dNTP, 50 ng of the DNA matrix; 5 pmol of the corresponding primers and 3 units of BioTaq DNA polymerase (Dialat LTD, Russia). The temperature-time profile of the PCR was as follows: the first cycle – 94 °C × 9 min, 55 °C × 1 min, 72 °C × 2 min; the next 30 cycles – 94 °C × 1 min, 55 °C × 1 min, 72 °C × 2 min; the final cycle – 72 °C × 7 min. The PCR products were analyzed by electrophoresis in 2 % agarose gel at an electric field strength of 6 V/cm. Isolation and purification of PCR products were carried out from low-melting agarose using a set of reagents by WizardPCRPreps (Promega, USA), according to the manufacturer's recommendations.

Sequencing of PCR products was carried out at the Center of “Bioengineering” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, by the method of (Sanger et al., 1977) using a set of BigDyeTerminatorv.3.1 reagents on the ABI PRISM 3730 genetic analyzer (Applied Biosystems, Inc., USA). Standard primers were used for sequencing (Camacho et al., 2009).

Analysis of 16S rRNA sequences. The primary analysis of the similarity of the nucleotide sequences of the 16S rRNA genes of the studied strains was performed using the BLAST program on the following web-site: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Van de Peer, De Wachter, 1994).

The 16S rRNA gene sequences of all studied strains are deposited in GenBank: G1 – MW386469, G2 – MW386470, G3 – MW386471, B2 – MW386472, B3 – MW386473.

Results and discussion

Strains of halophilic bacteria G1, G2, G3, B2 and B3, isolated from salt lakes and salt marshes of the Tersko-Kumskaya and Tersko-Sulakskaya lowlands, grew at a temperature of 30–37 °C and pH 6.4–7.4. The cultures showed steady growth in the agarized elective medium in the presence of 5–25 % NaCl with an optimum of 5, 10, 25 %, which indicated that they belonged to moderate and extreme halophiles following the known classification (Kushner, Kamekura, 1988).

The analysis of the 16S rRNA gene sequence allowed us to determine their phylogenetic position. The 16S rRNA gene sequences of the new halophilic strains were analyzed and compared with the 16S rRNA sequences of the validly described bacterial species. The analysis has shown that the new isolates belong to two genera of bacteria containing

Table 2. The percentage of similarity of the 16S rRNA gene of halophilic bacteria isolated from salt lakes and salt marshes of the Peri-Caspian Lowland with the most closely related species

No. of strain	Closest related species	Sequence similarity of 16S rRNA genes, %
G1	<i>Halomonas ventosae</i>	99.0
G2	<i>Halomonas</i> sp.	96.8
G3	<i>Halomonas elongata</i>	100
B2	<i>Virgibacillus salinarius</i>	100
B3	<i>Virgibacillus salinarius</i>	100

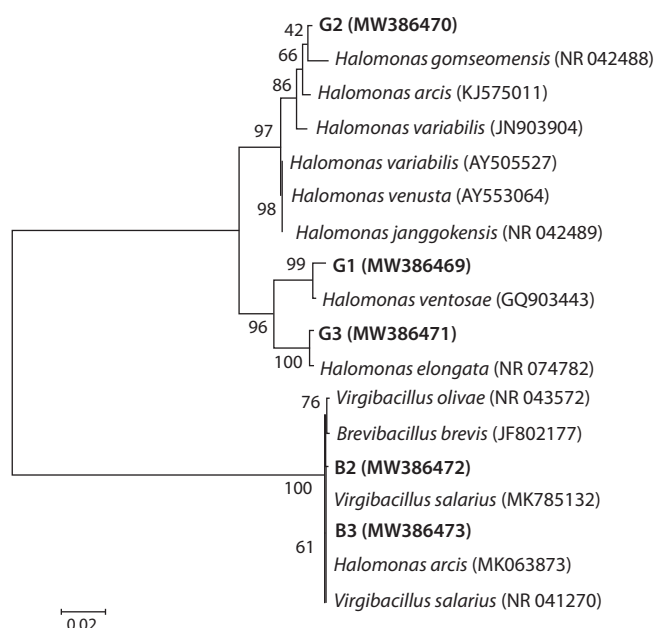


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed using the Maximum Likelihood method based on the Tamura–Nei model (Tamura, Nei, 1993) and MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

A total of 18 sequences with a minimum length of 1381 nucleotides were used. Bar corresponds to two substitutions per 100 nucleotides. The Bootstrap values (500 repeats) are shown next to the tree branches.

halophilic microorganisms *Halomonas* and *Virgibacillus* (Table 2, Fig. 1). Table 2 and Figure 1 demonstrate that the G2 strain represents a new species in the genus *Halomonas*. The *H. ventosae* G1 (MW386469) and *H. elongata* G3 (MW386471) strains seem to belong to the species *H. ventosae* and *H. elongata*, respectively, while the *V. salinarius* B2 (MW386472) and *V. salinarius* B3 (MW386473) strains belong to the group of species related to *V. salinarius*.

Characteristics of the *Halomonas* sp. G2 strain

The main object of further research is the strain *Halomonas* sp. G2. The GC content in the G2 strain DNA was 67.3 %.

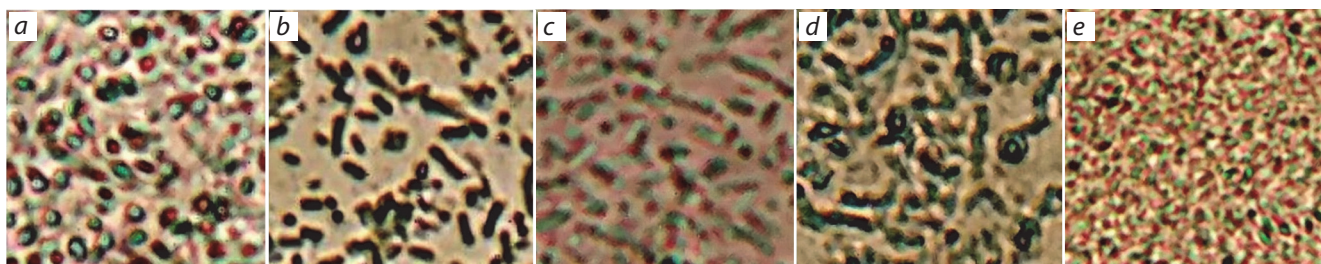


Fig. 2. Cell morphology of strains from water and soil samples: a – *V. salinarium* B2; b – *V. salinarium* B3; c – *H. elongata* G1; d – *Halomonas* sp. G2; e – *H. elongata* G3.

Light microscopy, magnification $\times 600$.

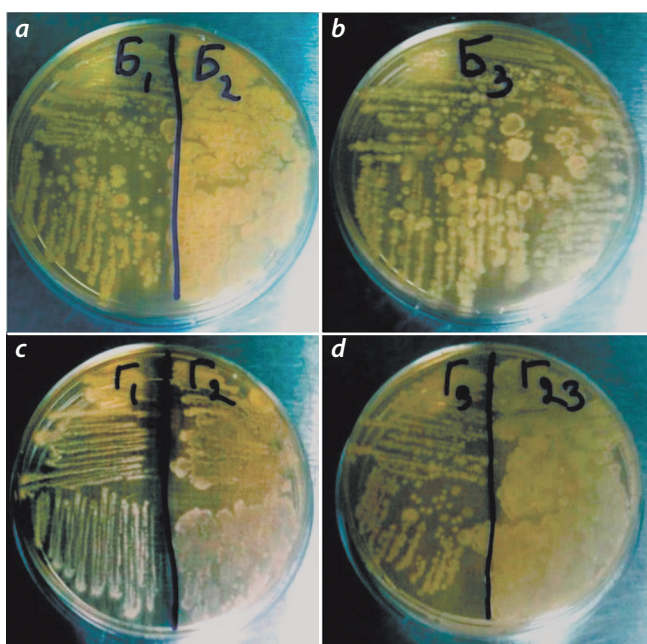


Fig. 3. Growth of isolated pure bacterial cultures on MPA: a – *V. salinarium* B2; b – *V. salinarium* B3; c – *H. elongata* G1, *Halomonas* sp. G2; d – *H. elongata* G3.

Morphology of cells and colonies. Rod-shaped, gram-negative, mobile bacillus of the size of $0.8\text{--}1.0 \times 1.5\text{--}3.0 \mu\text{m}$. The cells were observed singly, in pairs, or in short chains (Fig. 2, d). Cell mobility was ensured by one or two lateral flagella located on one side of the cell, forming endospores. On an elective solid medium, the strain formed an active growth of colonies of a round shape with a wavy edge, yellow and pale-yellow color with a gloss. With an increase in the concentration of NaCl in the culture medium, a bright carotenoid pigment appeared in the beige-colored colonies. On meat-peptone agar (MPA) – small colonies located close to each other in a chain, rounded shape with a wavy edge, turning into a solid growth; smooth, shiny, light beige with a pinkish tinge. In all variants, a smearing consistency was observed (Fig. 3, c).

Physiology of strain growth (temperature, pH, salinity). When determining the optimal growth parameters, the G2 strain was assigned to mesophiles (30 to 37°C , 30°C op-

timum) and moderate alkalophiles (pH $6\text{--}8$, $7.2\text{--}7.4$ optimum). As a representative of the genus *Halomonas*, it can grow in a wide range of NaCl concentrations from 10 to 25% with an optimum of 25% ; an extreme halophile.

The substrates and electron acceptors used. Oxygen ratio. The G2 strain is capable of denitrification by using nitrates as an electron acceptor, reducing them to nitrites.

The differentiating characteristics of the G2 strain are presented in Table 3. The strain had a positive reaction to lysine, gelatin, ectoine, lactose, and d-glucose; utilized citrate and Na malonate. Tests for β -galactosidase, amylase, protease, and catalase are positive; for oxidase, lipase, and urease – negative. Growth does not occur under anaerobic conditions.

Antibiotic sensitivity. The G2 culture differed in sensitivity to trimethoprim of the sulfanilamide group; fluoroquinolones of the 1st and 2nd generations (ciprofloxacin, ofloxacin, kanamycin); vancomycin of the macrolide group; rifamycins of the rifampin group; cefuroxime and ampicillin of the penicillin group; antibiotics of the 3rd generation cephalosporins of the macrolides (ceftazidime, fosfomycin and clarithromycin); antibiotics of the 4th generation cephalosporins (cefepime, cefaclor).

Characteristics of isolates G1, G3, B2, B3

Rod-shaped, mobile cells of strains G1, G3 have the following sizes: $0.6\text{--}0.8 \times 1.6\text{--}1.9 \mu\text{m}$ (G1), $0.7\text{--}1.0 \times 1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$ (G3) (see Fig. 2, c, e). Single cells and chains of them were observed. Mobility was provided by flagella located on one side of the cell. The cells of the B2 and B3 strains were mobile, in the form of rods, with sizes: $0.5\text{--}0.7 \times 1.0\text{--}2.5 \mu\text{m}$ (B2) and $0.2\text{--}0.7 \times 1.0\text{--}5.0 \mu\text{m}$ (B3); formed endospores. The biomass of isolated strains on the MPA medium is represented by a chain of colonies located one after another, differing in shape, color, size, pigment and morphology (see Fig. 3, a, b). On an elective agar medium with $5\text{--}25\%$ NaCl (G1, G3) and $5\text{--}10\%$ NaCl (B2, B3), the cultures formed colonies with lipochromic pigment.

The results of phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences indicated that the closest type strains (100%) for G1 and G3 are the type strain of *H. elongata* DSM 2581^T, and for B2 and B3 – *V. salinarium* DSM 18441^T. On the dendrogram, the cultures formed a common cluster with the typical strains, making it possible to classify isolated

Table 3. Comparative differentiating features of new strains of the genus *Halomonas* and the type strain of *H. elongata* DSM 2581^T

Phenotypic traits	<i>H. ventosae</i> G1 (MW386469)	<i>Halomonas</i> sp. G2 (MW386470)	<i>H. elongata</i> G3 (MW386471)	<i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T (Vreeland et al., 1980; Schwibbert et al., 2011; Kindzierski et al., 2017)
Reduction of NO ₃ to nitrites	+	+	+	+
Substrates:				
ectoine	+	+	+	+
gelatin	+	+	+	+
ornithine	+	–	+	+
lysine	+	+	+	+
sodium citrate	+	+	–	+
sodium malonate	+	+	+	n
sucrose	–	–	–	+
glycerol	–	–	–	+
d-mannose	–	–	–	+
cellobiose	–	–	–	+
lactose	–	+	–	+
d-glucose	+	+	+	+
Produces enzymes:				
oxidase	–	–	–	–
urease	–	–	–	+
lipase	+	–	–	n
β-galactosidase	+	+	+	+
catalase	+	+	+	+
amylase	+	+	+	–
protease	+	+	–	–
GC content (%) in genomic DNA	65.8	67.3	66.5	63.6

Note. "+" – positive; "–" – negative; "n" – not studied.

cultures as these species. Related cultures for G1 and G3 are *H. ventosae* GQ903443, *H. elongata* NR 074782; for B2 and B3 – *V. salarius* MK785132, *B. brevis* JF802177, *V. olivae* NR 043572, *H. arcis* MK063873, *V. salarius* NR 041270, which combined the typical features of moderate and extreme halophiles.

The distinctive characteristics differentiating the cultures of *H. ventosae* G1 and *H. elongata* G3 were: optimum growth at 5–25 % NaCl vs. 32 %; pH 7.2–7.4 vs. 7–9; no utilization of sucrose, glycerol, d-mannose, cellobiose, lactose, and production of urease, oxidase, and protease (except G3) at a concentration of 5–25 % NaCl in the medium (see Table 3). At the same time, such traits for *V. salarius* B2 and B3 strains in comparison with the typical *V. salarius* DSM 18441^T were: no need for d-mannose, the ability to produce amylase, protease, and β-galactosidase enzymes at a concentration of 5–10 % NaCl in the medium (Table 4).

Characteristics of genera *Halomonas* and *Virgibacillus*

Thus, based on phenotypic and genetic studies, we provide a brief description of the strain of the new species *Halomonas* sp. G2 and halophilic strains of *H. ventosa* G1, *H. elongata* G3, *V. salinarius* B2, *V. salinarius* B3.

Currently, the genus *Halomonas* includes 91 species, where *H. elongata* acts as the type species (<http://www.bacterio.cict.fr/h/halomonas.html>). The Halomonadaceae family was first described in 1988 by combining moderately halophilic and marine bacteria of the genera *Deleya* and *Halomonas* (Franzmann et al., 1988). Over the past three decades, many species have been assigned to the genus *Halomonas*, the domain *Bacteria*, the phylum *Proteobacteria*, the class *Gammaproteobacteria*, the order *Oceanospirillales*, and the family Halomonadaceae; however, at the time of writing, 7 species have been reclassified. Representatives of the genus – gram-negative, facultative anaerobes, aerobes, prototrophs, mesophiles, denitrifying, produce exopolysac-

Table 4. Comparative differentiating features of halophilic strains of *V. salarius* B2 and B3 with the typical *V. salarius* DSM 18441^T

Phenotypic traits	<i>V. salarius</i> B2 (MW386472)	<i>V. salarius</i> B3 (MW386473)	<i>V. salarius</i> DSM 18441 ^T (SA-Vb1 ^T = JCM 12946 ^T) (Hua et al., 2008)
H ₂ S	–	–	–
Reduction of NO ₃ to nitrites	+	+	–
Substrates:			
indole	–	–	–
esculin	n	n	+
lysine	–	+	+
sodium citrate	+	+	–
sodium malonate	–	–	–
d-mannose	–	–	+
d-glucose	+	+	+
gelatin	+	+	+
inositol	–	–	–
Produces enzymes:			
oxidase	–	–	+
lactose	–	–	n
urease	–	–	–
β-galactosidase	+	+	n
catalase	+	+	+
amylase	+	+	n
protease	+	+	n
GC content (%) in genomic DNA	42.8	37.3	37.3

Note. "+" – positive; "–" – negative; "n" – not studied.

charides; they mainly utilize oxygen, nitrate or nitrite as an electron acceptor; under conditions of saline stress, they synthesize ectoine, which protects cells from adverse environmental influences (Schwibbert et al., 2011).

The genus *Virgibacillus* was created as a result of the reclassification of *Bacillus pantothenicus*, *Virgibacillus pantothenicus* and, subsequently, established as a species of *Virgibacillus* (Heyndrickx et al., 1998; Heyrman et al., 2003). At the moment, the genus consists of 27 species, representatives of which are gram-positive, obligate aerobes or facultative anaerobes, moderate halophiles, chemotaxonomic; the main fatty acid is C_{15:0} (Lee et al., 2012).

Description of the strain of the new species *Halomonas* sp. G2. The G2 strain cells are encapsulated, motile, aerobic, gram-negative bacillus 0.8–1.0 × 1.5–3.0 μm; observed singly or in a chain of 2 to 4 interlocked cells. The G2 strain is an extreme halophile, capable of growing in the range of 10–25 % NaCl (25 % optimum) and forming a carotenoid pigment. On an elective solid medium with 25 % NaCl, it forms colonies of a round shape with a wavy edge, beige color with a gloss; forms areas of bright

carotenoid pigment. The strain grows on meat-peptone broth. The species is mesophile, the temperature range is 30–37 °C (30 °C optimum). Neutrophil, pH 6–8 (7.2–7.4 optimum). Denitrifying strain; chemolithotrophic; reduces nitrate or nitrite as electron donors; catalase-, amylase-, protease-, and β-galactosidase-positive; lipase-, oxidase-, and urease-negative. Unable to hydrolyze inositol, indole; produces lysine, gelatin, ectoine; uses sodium citrate and malate as a source of carbon and energy; does not produce ornithine; H₂S and acid from d-mannose, sucrose, glycerol, cellobiose, except lactose and d-glucose. Susceptible to trimethoprim, ciprofloxacin, ofloxacin, kanamycin, vancomycin, rifampicin, cefuroxime, ampicillin, ceftazidime, fosfomycin, clarithromycin, cefepime, cefaclor. The GC content in DNA is 67.3 %.

Based on its physiological, biochemical, and phylogenetic properties, the G2 strain represents a new species, called *Halomonas* sp. G2. A distinctive characteristic of the isolate is the production of hydrolytic enzymes protease, amylase, β-galactosidase, and oxy-reductase-catalase at a concentration of 25 % NaCl in the medium.

Habitat: soil (typical saltmarsh) on the territory of the Tersko-Kumskaya lowland (Republic of Daghestan, Russia).

Description of the strains *Halomonas ventosae* G1 (MW386469), and *Halomonas elongata* G3 (MW386471). *Halomonas* G1 and G3 strains are aerobes, gram-negative, denitrifying; mesophiles, prototrophs, chemolithotrophs, and extreme halophiles (5 to 25 % NaCl). Unable to hydrolyze inositol; produce lysine, ornithine, gelatin, ectoine; reduce nitrate or nitrite as electron donors; utilize citrate (excluding G3) and sodium malonate as a source of carbon and energy; do not produce H₂S and acid from d-mannose, sucrose, glycerol, cellobiose, except for d-glucose. The GC content in the DNA for G1 and G3 are 65.8 and 66.5 %, respectively. On the basis of phenotypic and genotypic characteristics, isolated bacteria are classified as *H. ventosae* G1 (MW386469), and *H. elongata* G3 (MW386471).

Habitat: saline soils (Tarumovsky district, Kochubey biosphere station) and Lake Tarumovskoe on the territory of the Tersko-Kumskaya lowland (Republic of Daghestan, Russia). The type strain of *H. elongata* DSM 2581^T was isolated from equipment for extraction of salt from brine (Netherlands Antilles, southern island of Bonaire).

Description of *V. salinarius* B2 (MW386472) and B3 (MW386473) strains. The strains are gram-positive; mesophiles, neutrophils, chemolithotrophs, moderate halophiles (optimum 5, 10 % NaCl). The cultures are unable to hydrolyze inositol, sodium malonate; they do not produce lysine (except for B3), indole, H₂S and acid from d-mannose, sucrose, except for d-glucose, reduce nitrate to nitrite and are capable of utilizing the polypeptide substrate gelatin and sodium citrate as a carbon source. The GC content in the DNA of strains B2 and B3 was 42.8 and 37.3 %, respectively. Based on the phenotypic and genotypic characteristics, the isolated cultures have been classified as *V. salinarius* B2 (MW386472) and *V. salinarius* B3 (MW386473) strains.

Habitat: waters of technogenic, highly mineralized Berikey Lake (Derbent region, Republic of Daghestan, Russia). The type strain *Virgibacillus salarius* DSM 18441^T isolated from the salt crust of the Gharsah Salt Lake in Shatt al Gharsah (Sahara) in Tunisia (Hua et al., 2008).

Biotechnological potential of halophilic microorganisms

Halophilic bacteria are increasingly being studied for their biotechnological potential for the production of biochemically active and resistant enzymes to alkaline pH, high temperature and salt concentration (Di Donato et al., 2019; Liu et al., 2019). These multifaceted properties are useful for a variety of industries (Delgado-Garcia et al., 2012), such as fermented food, textiles, pharmaceuticals, cosmetics, and leather production (De Lourdes Moreno et al., 2013). Most producers of extracellular hydrolytic enzymes lipase, amylase, protease, inulinase, xylanase, cellulase, DNase, and pectinase are halophilic bacteria, including strains of the genera *Halomonas* and *Virgibacillus* (Cira-Chávez et al., 2018; Liu et al., 2019; Kaitouni et al., 2020; Varrella et al., 2020).

Isolation of natural strains in these studies made it possible to discover a new species *Halomonas* sp. G2 (MW386470) and new strains *Halomonas* G1 (MW386469) and G3 (MW386471), *Virgibacillus* B2 (MW386472) and B3 (MW386473), capable of producing hydrolytic enzymes (amylase, protease, lactase, lipase, urease, β-galactosidase) and oxidoreductase (catalase, oxidase).

Conclusion

The study confirms the biotechnological and scientific importance of halophilic denitrifying bacteria inhabiting the extremophilic ecological niches of the Peri-Caspian Lowland in the Republic of Daghestan. The strains of bacteria of the genera *Halomonas* and *Virgibacillus* isolated proved to be not strictly confined to the salt lakes and soils of the Peri-Caspian Lowland (Republic of Daghestan, Russia), having a wide distribution area, including the ecological niches of Bonaire Island (Netherlands Antilles) and Tunisia. Isolation and study of natural strains have revealed a new species *Halomonas* sp. G2 that complement the collection of the already known strains – producers of industrially useful enzymes such as amylase, protease, lactase, lipase, urease, β-galactosidase, catalase, and oxidase.

References

- Banciu H.L., Enach M., Rodriguez R.M., Oren A., Ventosa A. Ecology and physiology of halophilic microorganisms – Thematic issue based on papers presented at Halophiles 2019 – 12th International Conference on Halophilic Microorganisms, Cluj-Napoca, Romania, 24–28 June, 2019. *FEMS Microbiol. Lett.* 2020;366(23):1-4. DOI 10.1093/femsle/fnz250.
- Baumann P., Baumann L. The marine gram-negative Eubacteria. In: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G. (Eds.). *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.* Berlin: Springer-Verlag, 1986;2:1302-1331.
- Begmatov Sh.A., Selitskaya O.V., Vasileva L.V., Berestovskaja Yu.Yu., Manucharova N.A., Drenova N.V. Morphophysiological features of some cultivable bacteria from saline soils of the Aral Sea region. *Eur. J. Soil Sci.* 2020;53(1):90-96. DOI 10.1134/S1064229320010044.
- Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7(6):1513-1523.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Atomi H. Editorial overview: Extremophiles: from extreme environments to highly stable catalysts. *Curr. Opin. Microbiol.* 2015;25:88-96.
- Bulygina E.S., Kuznetsov B.B., Marusina A.I., Kravchenko I.K., Bykova S.A., Kolganova T.V., Galchenko V.F. Study of nucleotide sequences of *nifH* genes in methanotrophic bacteria. *Mikrobiologiya = Microbiology.* 2002;71(4):425-432.
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform.* 2009;10(421):1-9. DOI 10.1186/1471-2105-10-421.
- Chernousova E.Yu., Akimov V.N., Gridneva E.V., Dubinina G.A., Grabovich M.Yu. Phylogenetic *in situ/ex situ* analysis of a sulfur mat microbial community from a thermal sulfide spring in the North Caucasus. *Mikrobiologiya = Microbiology.* 2008;77(2):219-223. DOI 10.1134/S002626170802015X.
- Cira-Chávez L.A., Guevara-Luna J., Soto-Padilla M.Y., Román-Ponce B., Vásquez-Murrieta M.S., Estrada-Alvarado M.I. Kinetics of halophilic enzymes. In: Rajendran L., Fernandez C. (Eds.). *Ki-*

- netics of Enzymatic Synthesis. *IntOpen*, 2018;1-25. DOI 10.5772/intechopen.81100.
- Corral P., Amoozegar M.A., Ventosa A. Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine. *Marine Drugs*. 2020;18:2-33. DOI 10.3390/md18010033.
- Delgado-García M., Valdivia-Urdiales B., Aguilar-Gonzalez C.N., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez-Herrera R. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *J. Sci. Food Agric*. 2012;92(13):2575-2580. DOI 10.1002/jsfa.5860.
- De Lourdes Moreno M., Pérez D., García M.T., Mellado E. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*. 2013;3(1):38-51. DOI 10.3390/life3010038.
- Di Donato P., Buono A., Poli A., Finore I., Abbamondi R.G., Nicolaus B., Lama L. Exploring marine environments for the identification of extremophiles and their enzymes for sustainable and green bioprocesses. *Sustainability*. 2019;11:149-169. DOI 10.3390/su11010149.
- Franzmann P.D., Wehmeyer U., Stackebrandt E. *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst. Appl. Microbiol*. 1988;11:16-19.
- Ghosh S., Kumar S., Kumar Khare S. Microbial diversity of saline habitats: an overview of biotechnological applications. In: Giri B., Varma A. (Eds.). *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions* (Ser. Soil Biology, 56). Cham: Springer, 2019;65-92. DOI 10.1007/978-3-030-18975-4_4.
- Gordon R.E., Smith M.M. Rapidly growing, acid fast bacteria. I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *J. Bacteriol*. 1953;66(1):41-48.
- Gridneva E.V., Grabovich M.Yu., Dubinina G.A., Chernousova E.Yu., Akimov V.N. Ecophysiology of lithotrophic sulfur-oxidizing *Sphaerotilus* species from sulfide springs in the Northern Caucasus. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2009;78(1):76-83.
- Heyndrickx M., Lebbe L., Kersters K., De Vos P., Forsyth G., Logan N.A. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1998;48(1):99-106. DOI 10.1099/00207713-48-1-99.
- Heyrman J., Logan N.A., Busse H.-J., Balcaen A., Lebbe L., Rodriguez-Diaz M., Swings J., De Vos P. *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2003;53(2):501-511. DOI 10.1099/ijs.0.02371-0.
- Holt J.R., Corey D.P., Eatock R.A. Mechano-electrical transduction and adaptation in hair cells of the mouse utricle, a low-frequency vestibular organ. *J. Neurosci*. 1997;17:8739-8748.
- Hua N.P., Hamza-Chaffai A., Vreeland R.H., Isoda H., Naganuma T. *Virgibacillus salarius* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Saharan salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2008;58:2409-2414. DOI 10.1099/ijs.0.65693-0.
- Kaitouni L.B.D., Anissi J., Sendide K., Hassouni M.E. Diversity of hydrolase-producing halophilic bacteria and evaluation of their enzymatic activities in submerged cultures. *Annals Microbiol*. 2020;70:33. DOI 10.1186/s13213-020-01570-z.
- Khalilova E.A., Kotenko S.Ts., Islammagomedova E.A., Hasanov R.Z., Abakarova A.A., Aliverdiyeva D.A. Extremophilic microbial communities of saline soils and their diversity in the regions of the Caspian depression. *Aridnye Ekosistemy = Arid Ecosystems*. 2017;7(2):116-120. DOI 10.1134/S2079096117020068.
- Khalilova E.A., Kotenko S.Ts., Islammagomedova E.A., Hasanov R.Z., Abakarova A.A., Aliverdiyeva D.A. Halophilic microbial communities and their biodiversity in the arid regions of the Caspian Lowland. *Aridnye Ekosistemy = Arid Ecosystems*. 2020;10(1):79-85. DOI 10.1134/S2079096120010084.
- Khalilova E.A., Nuratinov R.A., Kotenko S.Ts., Islammagomedova E.A. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms of hot springs and their significance in the assessment of the biodiversity of microbial communities. *Aridnye Ekosistemy = Arid Ecosystems*. 2014;4(1):25-30. DOI 10.1134/S2079096114010028.
- Kindzierski V., Raschke S., Knabe N., Siedler F., Scheffer B., Grau K.P., Pfeiffer F., Oesterheld D., Marin-Sanguino A., Kunte H.J. Osmoregulation in the halophilic bacterium *Halomonas elongata*: a case study for integrative systems biology. *PLoS One*. 2017;12(1):1-22. DOI 10.1371/journal.pone.0168818.
- Kolganova T.V., Kuznetsov B.B., Turova T.P. Designing and testing of oligonucleotide primers for amplification and sequencing of 16S rRNA genes of archaea. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2002;71(2):243-246.
- Kushner D.J., Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodríguez-Varela F. (Ed.). *Halophilic Bacteria*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1988;1:109-138.
- Kuznetsov A.E., Kalenov S.V. Russian Federation Patent RU 2323226. Method for preparing halophilic bacterium biomass. Bull. No. 12. 2008;6. (in Russian)
- Lalov V.V., Osokina N.V., Piorunskij D.A., Chizhikov M.A. Russian Federation Patent RU 2115722 C1. Method of halophilic microorganism culturing. 1998;5 (in Russian)
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.). New York: John Wiley & Sons, 1991;115-175.
- Lee S.-Y., Kang C.-H., Oh T.K., Yoon J.H. *Virgibacillus campisalis* sp. nov., from a marine solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2012;62:347-351. DOI 10.1099/ijs.0.033084-0.
- Liu C., Baffoe D.K., Zhang M. Halophile, an essential platform for bio-production. *J. Microbiol. Methods*. 2019;166:105704. DOI 10.1016/j.mimet.2019.105704.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol*. 1961;3:208-218. DOI 10.1016/S0022-2836(61)80047-8.
- Namsaraev Z.B., Babasanova O.B., Dunaevsky Y.E., Akimov V.N., Barkhutova D.D., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B. *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, Central Mongolia. *Microbiology*. 2010;79(4):491-499.
- Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. Laboratory Manual on Microbiology for college students. Moscow: Akademiya Publ., 2005. (in Russian)
- Owen R.J., Hill L.R., Lapage S.P. Determination of DNA base composition from melting profiles in dilute buffers. *Biopolymers*. 1969;7:503-516.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977;74:5463-5467.
- Schwibbert K., Marin-Sanguino A., Bagyan I., Heidrich G., Lentzen G., Seitz H., Rampp M., Schuster S.C., Klenk H.P., Pfeiffer F., Oesterheld D., Kunte H.J. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Environ. Microbiol*. 2011;13:1973-1994. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02336.
- Steel K.J. The oxidase reaction as a taxonomic tool. *J. Gen. Microbiol*. 1961;25:297-306.
- Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol*. 1993;10:512-526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol*. 2013;30:2725-2729.

- Thomas J.C., Khour R., Neeley C.K., Akroush A.M., Davies E.C. A fast CTAB method of human DNA isolation for polymerase chain reaction applications. *Biochem. Educ.* 1997;25(4):233-235. DOI 10.1016/S0307-4412(97)00122-2.
- Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 1994; 10:569-570. DOI 10.1093/bioinformatics/10.5.569.
- Varrella S., Tangherlini M., Corinaldesi C. Deep hypersaline anoxic basins as untapped reservoir of polyextremophilic prokaryotes of biotechnological interest. *Mar. Drugs.* 2020;18(2):91. DOI 10.3390/md18020091.
- Vreeland R.H., Litchfield C.D., Martin E.L., Elliot E. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1980;3(2):485-495. DOI 10.1099/00207713-30-2-485.
- Wang T., Zhang L., Bo L., Zhu Y., Tang X., Liu W. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high concentrations of NaCl by *Halomonas* bacteria. *IOP Conf. Ser.: Earth. Environ. Sci.* 2019;237(5):052033. DOI 10.1088/1755-1315/237/5/052033.
- Zavarzin G.A. Microbial diversity studies at the Winogradsky Institute of Microbiology. *Mikrobiologiya = Microbiology.* 2004;73(5):509-522. DOI 10.1023/B:MICI.0000044242.93603.00.

ORCID ID

S.C. Kotenko orcid.org/0000-0002-7099-873X
E.A. Islammagomedova orcid.org/0000-0002-9897-1256
A.A. Abakarova orcid.org/0000-0003-0888-9580
N.A. Chernykh orcid.org/0000-0003-3092-7539
D.A. Aliverdieva orcid.org/0000-0002-4784-4548

Compliance with ethical standards. This paper does not contain the results of studies using animals as subjects.

Acknowledgements. The work of N.A. Chernykh carried out with the partial financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

The authors of the paper would like to express gratitude to Candidate of Biological Sciences E.N. Detkova for assistance in determining GC content in the DNA.

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

Received September 12, 2020. Revised February 2, 2021. Accepted February 2, 2021.

Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске

А.В. Бардашева¹, Н.В. Фоменко², Т.В. Калымбетова², И.В. Бабкин¹, С.О. Кретьен³, Е.В. Жираковская¹,
Н.В. Тикунова¹, В.В. Морозова¹ 

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

³ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

 morozova@niboch.nsc.ru

Аннотация. Проанализированы 72 клинических штамма *Klebsiella* spp., изолированных в Новосибирске из образцов, полученных от людей. Проведена видовая идентификация штаммов по последовательностям генов 16S rRNA и *rpoB*. Показано, что в популяции клебсиелл доминировали штаммы *Klebsiella pneumoniae* (57 штаммов), остальные 15 штаммов относились к видам *K. grimontii*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* и *K. quasipneumoniae*. Методом молекулярного серотипирования с использованием последовательности гена *wzi* штаммы *K. pneumoniae* были отнесены к двадцати одному К-серотипу, при этом большую долю составляли вирулентные серотипы K1 и K2. Выявлено, что штаммы *K. pneumoniae*, полученные от госпитализированных пациентов, обладали максимально выраженной резистентностью к различным классам антибиотиков в отличие от остальных видов клебсиелл. Методом ПЦР в реальном времени обнаружено, что в исследованной популяции присутствуют гены семейств *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* и ген *bla_{OXA-48}*, являющиеся генетическими детерминантами резистентности к бета-лактамам. Показано, что присутствие последовательности *bla_{CTX}* коррелирует с продукцией штаммом бета-лактамаз расширенного спектра, а фенотипическая устойчивость к карбапенемам обусловлена наличием гена *bla_{OXA-48}*. При этом генов карбапенемаз *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* обнаружено не было. Среди исследованных генов устойчивости к аминогликозидам были найдены гены *aph(6)-Ia* и *aadA*, однако их наличие не всегда совпадало с фенотипической резистентностью. Устойчивость к фторхинолонам у большинства штаммов сопровождалась присутствием генов *aac(6)-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB* и *qnrS* в различных комбинациях, при этом наличие только генов *oqxA* и/или *oqxB* не коррелировало с устойчивостью к фторхинолонам. Таким образом, обнаружение *bla_{CTX}* и *bla_{OXA-48}* может быть использовано для быстрого выявления продукции бета-лактамаз расширенного спектра и определения резистентности клебсиелл к карбапенемам, а выявление генов *aac(6)-Ib-cr* и/или *qnrB/qnrS* – для быстрого определения устойчивости к фторхинолонам. Ключевые слова: *Klebsiella*; молекулярное серотипирование; бета-лактамы; фторхинолоны; аминогликозиды; бета-лактамазы расширенного спектра; металло-бета-лактамазы; диско-диффузионный анализ; генетические детерминанты антибиотикорезистентности.

Для цитирования: Бардашева А.В., Фоменко Н.В., Калымбетова Т.В., Бабкин И.В., Кретьен С.О., Жираковская Е.В., Тикунова Н.В., Морозова В.В. Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(2):234-245. DOI 10.18699/VJ21.49-o

Genetic characterization of clinical *Klebsiella* isolates circulating in Novosibirsk

A.V. Bardasheva¹, N.V. Fomenko², T.V. Kalymbetova², I.V. Babkin¹, S.O. Chretien³, E.V. Zhirakovskaya¹,
N.V. Tikunova¹, V.V. Morozova¹ 

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² JSC "Vector-Best", Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after Ya.L. Tsvyanyan of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

 morozova@niboch.nsc.ru

Abstract. 72 clinical strains of *Klebsiella* spp. isolated from samples obtained from humans in Novosibirsk, Russia, were analyzed. Species identification of strains was performed using 16S rRNA and *rpoB* gene sequences. It was revealed that *Klebsiella pneumoniae* strains were dominant in the population (57 strains), while the remaining 15 strains were *K. grimontii*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* and *K. quasipneumoniae*. By molecular serotyping using the *wzi* gene sequence, *K. pneumoniae* strains were assigned to twenty-one K-serotypes with a high proportion of virulent K1- and K2-serotypes. It was found that *K. pneumoniae* strains isolated from the hospitalized patients had a higher resistance to antibiotics compared to the other *Klebsiella* species. Real-time PCR revealed that the population contained genes of the *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* families and the *bla_{OXA-48}* gene, which are the genetic determinants of beta-lactam resistance. It has been shown that the presence of the *bla_{CTX}* sequence correlated with the production of extended-spectrum beta-lactamases, and phenotypic resistance to car-

bapenems is due to the presence of the *bla*_{OXA-48} gene. At the same time, the carbapenemase genes *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* were not detected. Among the aminoglycoside resistance genes studied, the *aph*(6)-*Id* and *aadA* genes were found, but their presence did not always coincide with phenotypic resistance. Resistance to fluoroquinolones in the vast majority of strains was accompanied by the presence of the *aac*(6')-*Ib-cr*, *oqx*A, *oqx*B, *qnr*B, and *qnr*S genes in various combinations, while the presence of the *oqx*A and/or *oqx*B genes alone did not correlate with resistance to fluoroquinolones. Thus, the detection of *bla*_{CTX} and *bla*_{OXA-48} can be used to quickly predict the production of extended-spectrum beta-lactamases and to determine the resistance of *Klebsiella* to carbapenems. The detection of the *aac*(6')-*Ib-cr* and/or *qnr*B/*qnr*S genes can be used to quickly determine resistance to fluoroquinolones.

Key words: *Klebsiella*; molecular serotyping; beta-lactam; fluoroquinolone; aminoglycoside; extended-spectrum beta-lactamases; metallo-beta-lactamases; disco-diffusion analysis; genetic determinants of antibiotic resistance.

For citation: Bardasheva A.V., Fomenko N.V., Kalymbetova T.V., Babkin I.V., Chretien S.O., Zhirakovskaya E.V., Tikunova N.V., Morozova V.V. Genetic characterization of clinical *Klebsiella* isolates circulating in Novosibirsk. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):234-245. DOI 10.18699/VJ21.49-o (in Russian)

Введение

Клебсиеллы представляют собой род грамотрицательных инкапсулированных неподвижных бактерий, относящихся к семейству Enterobacteriaceae порядка Enterobacterales. Род насчитывает более 12 видов, из которых чаще всего встречаются *Klebsiella pneumoniae* и *K. oxytoca*. Клебсиеллы являются частью нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, кожных покровов и верхних дыхательных путей здоровых людей (Broberg et al., 2014). В то же время они служат одной из наиболее распространенных причин как нозокомиальных, так и внебольничных инфекций, включая инфекции мочевыводящих путей, бактериемию, пневмонию, неонатальный абсцесс и гнойный абсцесс печени (Podschun, Ullmann, 1998; Mukherjee et al., 2020).

Для лечения пациентов с клебсиелльными инфекциями используют бета-лактамы антибиотиков, фторхинолоны и аминогликозиды (Galal et al., 2019). При этом основными в терапии являются бета-лактамы, которые блокируют синтез клеточной стенки бактерий и наименее токсичны для человека. Применение данного класса антибиотиков ограничено способностью многих штаммов клебсиелл продуцировать бета-лактамазы, расщепляющие бета-лактамы антибиотиков (Козлова и др., 2018). Традиционно существуют две классификации бета-лактамаз – функциональная и структурная. Первая основана на их способности расщеплять различные классы бета-лактамов и на чувствительности к ингибиторам, таким как клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам (функциональные группы 1, 2 и 3). Вторая классификация (структурная) распределяет лактамазы по молекулярным классам А, В, С и D соответственно сходству и различиям их белковых последовательностей (Bush, Jacoby, 2010). Серьезную проблему с практической точки зрения представляют бета-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС), относящиеся ко второй функциональной группе. Они характеризуются способностью расщеплять различные классы бета-лактамов, включая пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы. К БЛРС относятся ферменты семейств TEM, SHV, CTX-M, OXA и др. (Gharrah et al., 2017; Galal et al., 2019). На сегодняшний день для каждого семейства бета-лактамаз известно большое количество аллельных вариантов, обеспечивающих устойчивость к третьему поколению цефалоспоринов, монобактамам и карбапенемам (Liakouroulos et al., 2016). Помимо функциональной и структурной классификации, ферменты,

гидролизующие бета-лактамы, разделяются на два типа по механизму действия: сериновые бета-лактамазы и металло-бета-лактамазы (МБЛ), требующие двухвалентных катионов, обычно цинка, в качестве кофакторов (Walsh et al., 2005). Известно около десяти семейств металло-бета-лактамаз, а именно: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM, TMB и др. Наиболее широко распространены лактамазы семейств IMP, VIM и NDM (Тапальский и др., 2012).

Для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, наряду с бета-лактамами антибиотиками используют аминогликозиды, которые способны связывать молекулы антибиотика с субъединицей 16S рРНК бактерии и ингибировать синтез белка. Самый распространенный механизм бактериальной резистентности к аминогликозидам – продукция аминогликозид-модифицирующих ферментов. Аминогликозид-модифицирующие ферменты представляют собой фосфотрансферазы (APH), ацетилтрансферазы (AAC) или нуклеотидилтрансферазы (ANT) (Ramirez, Tolmasky, 2010).

Еще одним используемым классом антибиотиков являются фторхинолоны, которые воздействуют на ДНК-гиразу и ДНК-топоизомеразу IV (Машковский, 2005). К основным механизмам резистентности грамотрицательных бактерий к данным антибиотикам относятся модификация антибиотика, например с использованием плазмид-кодируемой аминогликозидацетилтрансферазы AAC (6')-Ib-cr, защита мишени (семейство плазмидных генов *qnr*) и система эффлюкса, например OqxAB-TolC RND, гены которой находятся в хромосоме большинства штаммов *K. pneumoniae* (Yang et al., 2014; Hooper, Jacoby, 2015).

В последние годы заметной проблемой стал рост резистентности клебсиелльных штаммов, в особенности внутрибольничных изолятов, ко всем клинически значимым антибиотикам. Именно резистентность делает клебсиелл лидерами среди оппортунистических патогенов (Чеботарь и др., 2020). Цель нашего исследования – анализ генетических и фенотипических маркеров резистентности, включая бета-лактамы, фторхинолоны и аминогликозиды, клинических изолятов клебсиелл, выделенных в г. Новосибирске (Россия).

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе исследовали 72 штамма бактерий рода *Klebsiella*, выделенных в Новосибирске

из клинических образцов. Чистые культуры бактерий получали, как описано ранее (Козлова и др., 2017); принадлежность к роду *Klebsiella* определяли по культурально-морфологическим признакам с использованием селективных сред – агара МакКонки (BioMérieux, Франция) и агара Левина (OXOID, Великобритания). Штаммы депонировали в Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины (КЭМТК ИХБФМ) СО РАН (http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection).

Идентификация бактериальных штаммов. Видовую принадлежность бактерий устанавливали секвенированием последовательностей гена 16S рРНК (1342 п.н.) (Козлова и др., 2017) и подтверждали секвенированием фрагмента гена *rpoB* (501 п.н.) (Morozova et al., 2019). Для определения вида использовали наиболее близкие референсные последовательности рода *Klebsiella*, присутствующие в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), при уровне сходства последовательностей не менее 98 %. Последовательности генов 16S рРНК депонировали в базу данных NCBI GenBank под номерами MT436838–MT436841, MT436848, MT436849, MT436851–MT436856, MT439052–MT439054, MT439056–MT439058, MT439061–MT439079, MT439081–MT439103, MT439106, MT489341–MT489346. Последовательности генов *rpoB* депонировали в базу данных NCBI GenBank под номерами MT447755–MT447758, MT447760–447768, MT447770, MT447771, MT447773–MT447775, MT447778–MT447798, MT447825, MT447828–MT447830.

Молекулярное серотипирование штаммов *K. pneumoniae* и *K. quasipneumoniae*. Серотипирование коллекционных штаммов проводили путем секвенирования последовательностей гена *wzi*, относящегося к кластеру генов синтеза полисахаридной капсулы клебсиелл, как описано ранее (Brisse et al., 2013; Morozova et al., 2019). Для определения серотипа использовали наиболее близкие последовательности гена *wzi* референсных штаммов *K. pneumoniae*, присутствующие в базе данных NCBI GenBank. В ходе работы молекулярное серотипирование было проведено для 13 коллекционных штаммов *K. pneumoniae* и *K. quasipneumoniae*. Последовательности генов *wzi* были депонированы в базу данных NCBI GenBank под номерами MT434694, MT447742–MT447754. Остальные коллекционные штаммы *K. pneumoniae* и *K. quasipneumoniae* были типированы ранее (Morozova et al., 2019).

Оценку гипермукоидности штаммов проводили, используя струнный тест (Lee H.C. et al., 2006). Для этого стандартной бактериологической петлей растягивали слизистый тяж из бактериальных колоний, выращенных на кровяном агаре с 5 % овечьей крови, при 37 °С в течение ночи. При формировании вязкой нити длиной >10 мм штаммы оценивались как гипермукоидные.

Определение фенотипической антибиотикорезистентности штаммов. Антибиотикорезистентность штаммов выявляли диско-диффузионным методом согласно рекомендациям Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST, <https://eucast.org>) с использованием агара Мюллера–Хинтона (OXOID, Великобритания). Иссле-

довали чувствительность штаммов к следующим антибиотикам (OXOID): амоксициллин/клавулановая кислота (AMP/CAL, 20/10 мкг); ампициллин/сульбактам (AMP/SUL, 10/10 мкг); пиперациллин/тазобактам (PIP/TZB, 30/10 мкг); цефтазидим (CAZ, 10 мкг); амикацин (AMK, 30 мкг); гентамицин (GEN, 10 мкг); левофлоксацин (LEV, 5 мкг); цiproфлоксацин (CIP, 5 мкг); имипенем (IPM, 10 мкг); меропенем (MEM, 10 мкг); хлорамфеникол (CLM, 30 мкг); азтреонам (ATM, 30 мкг). Штамм *E. coli* ATCC 25922, не обладающий резистентностью к антибиотикам, использовали в качестве контроля.

Фенотипическое определение БЛРС. Выявление БЛРС, резистентных к клавуланат-защищенным пенициллинам, проводили, как описано ранее (Hoa et al., 1998; Эйдельштейн, 2001). Штамм *K. pneumoniae* ATCC 700603, продуцирующий БЛРС, использовали в качестве положительного контроля.

Выявление продукции металло-бета-лактамаз. Продукцию МБЛ штаммами клебсиелл исследовали методом двойных дисков с использованием этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) по методу, описанному ранее (Lee K. et al., 2001; Yong et al., 2002; Иванов, Егоров, 2008). Увеличение на 8 мм зоны ингибирования роста вокруг диска, содержащего антибиотик и ЭДТА, по сравнению с исходным диском с антибиотиком, интерпретировали как положительный результат (Yong et al., 2002).

Выявление генов антибиотикорезистентности методом ПЦР в реальном времени. Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл суспензии клеток *Klebsiella* spp. с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» (АО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Гены резистентности выявляли с использованием олигонуклеотидов, представленных в табл. 1. Также штаммы анализировали на наличие генов бета-лактамаз семейства OXA: *bla_{OXA-2}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-58}*; генов устойчивости к карбапенемам семейств *kpc*, *vim*, *ndm*, *imp*; генов устойчивости к аминогликозидам *aac3*, *aph6*, *ant2*, *ant6*; гена устойчивости к фторхинолонам *qnrA*. Перечисленные гены обнаружены не были, и последовательности соответствующих олигонуклеотидов не приводятся.

ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием амплификатора с флуоресцентной детекцией CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Условия амплификации: прогрев при 94 °С – 1 мин, далее 50 циклов (94 °С – 10 с, 60 °С – 20 с).

Результаты

Видовая принадлежность, молекулярное серотипирование и выявление гипермукоидности

Из 1512 клинических образцов от пациентов с разными заболеваниями было выявлено 72 (4.8 %) образца, содержащих клебсиеллы. Из них 46 штаммов были выделены из образцов от амбулаторных больных, а 26 штаммов – от госпитализированных пациентов. В результате видовой идентификации с использованием генов 16S рРНК и *rpoB* среди штаммов от амбулаторных больных было выделено 34 штамма *K. pneumoniae* (74 %), 5 – *K. grimontii*, 4 – *K. aerogenes*, 2 – *K. oxytoca* и 1 – *K. quasipneumoniae*.

Table 1. Synthetic oligonucleotide primers for the detection of antibiotic resistance genes

Gene/gene family	Oligonucleotide	Sequence
<i>bla_{SHV}</i>	Fshv	CCTTTTTCGCCAGATC
	Rshv	CCTCATTCAAGTCCGTT
	SHV	(ROX)ACAACGTCACCCGCTTGACCGCT-BHQ2
<i>bla_{TEM}</i>	TemF	TGTGGCGCGGTATTATCCCGT
	TemR	AGTACTCACCAGTCACAGAA
	TEM	(SIMA)GCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCA-BHQ1
<i>bla_{CTX}</i>	CTX	(SIMA)TGGCACCACCAACGATATCGCGGT-BHQ1
	CTX9	(SIMA)TGGCACCACCAATGATATTGCGGTGATCTGGC-BHQ1
	Fctx	AAGACCGGCAGCGGCGACTA
	Rctx1	GAACCAGCGGTGCGTGGTT
	Rctx2	GAACCAGCGGCGCACGACC
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA48	(ROX)ACAAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGG-BHQ2
	FOXA48	GCGCAGCCAGCGTATTGTCAA
	F1OXA48	GCGTAGTCAGCGCATCGTGAA
	ROXA48	TTAGCCCGAATAATATAGTC
<i>aph(6)-Id</i>	Aph6F	ATCAAAACGCAGGTTGTCA
	Aph6R	GAGGCATTGCTCATCATTGA
	Aph6	(ROX)TGACTACGTCCACGCGCGATTATAG-BHQ2
<i>aadA</i>	Raad	AGCGACATCCTTCGGCGC
	Faad	GCTGGCGATGAGCGAAATGT
	aadA	(SIMA)ACCTTGCTCTCGCATTTGGTACAGCG-BHQ2
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	IbcrF	GACGTACAGGAACAGTACT
	IbcrR	CAATCGGCTCTCCATTCA
	Ibcr	(ROX)AGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGCTACT-BHQ2
<i>oqxB</i>	FOqxB	CTGTTTGGCTGGATTTTCC
	ROqxB	CAGGTACACCGCAAACAC
	OqxB	(SIMA)CCACGGCGTCCAAGCGTTTTGCCTACCA-BHQ1
	OqxB2	(SIMA)CCACGGCGTCCGAGGGTTTTGCTACCA-BHQ1
<i>oxxA</i>	OqxAF	CAAGAGCCAAAACGCAGG
	OqxAR	GGGAGACGAGGTTGGTAT
	OqxAZ	(ROX)CGCAAAGCGAGGCGAACCACCGCA-BHQ2
<i>qnrB</i>	QnrBF	CTGTGGGAAAACCGTTGGA
	QnrBR	GTCAGATCGCAATGTGTGAA
	QnrBZ	(SIMA)CCAGGTACTGGGCGCGACGTTTCA-BHQ1
<i>qnrS</i>	QnrSF	CAATTTATGCCACGCCGAA
	QnrSR	GGCTGCAATTTTGATACCTGA
	QnrSZ	(ROX)TGATCGACTTTGCGGGGATCTAAACCG-BHQ2

Среди штаммов от госпитализированных пациентов было 23 штамма *K. pneumoniae* (88 %), 2 – *K. grimontii* и 1 – *K. aerogenes*.

Методом молекулярного серотипирования по последовательности гена *wzi* был выявлен 21 К-серотип (табл. 2). К наиболее вирулентным серотипам К1 и К2 принадлежали 15 штаммов от амбулаторных больных и 7 штаммов от госпитализированных пациентов. Из образцов, взятых от пациентов с диареей при поступлении в Инфекционную клиническую больницу № 1 г. Новосибирска, было

выявлено 4 штамма К47-серотипа. Еще 11 штаммов (серотипы К22/К30 и К17) были получены от пациентов клиники Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна (ННИИТО). К-серотип некоторых штаммов определить не удалось; можно было лишь заключить, что данный штамм относится к некой группе серотипов (см. табл. 2). По-видимому, для таких штаммов необходимо проводить серотипирование иммунологическими методами или секвенировать весь кластер генов синтеза полисахаридной капсулы (35 тыс. п.н.).

Table 2. *K. pneumoniae* and *K. quasipneumoniae* strains: serotypes and hypermucoviscosity

K serotype	Number of strains of the K serotype/ number of hypermucoviscous strains	
	Outpatients	Inpatients
K1	5/1	1/1
K1/KN2*	2/1	–
K2	8/1	6/2
K3/K31*	1/1	–
K5	1/1	–
K6/K64*, **	2	–
K9	1	–
K10	1	–
K17	–	4
K22/K30*	–	7/1
K24	–	1
K25	3/1	–
K34/K57*	–	2/1
K38	2	–
K43	1	–
K47	4	1
K62	1	–
K71	1	–
K80	1	–
K140	1	–
K13/K46/K61/K21*	–	1

Note. K serotypes were identified by molecular serotyping with the sequence of the *wzi* gene.

* The *wsj* sequence is insufficient for precise serotyping. ** One of the strains (KQ_1250) belonged to *K. quasipneumoniae*.

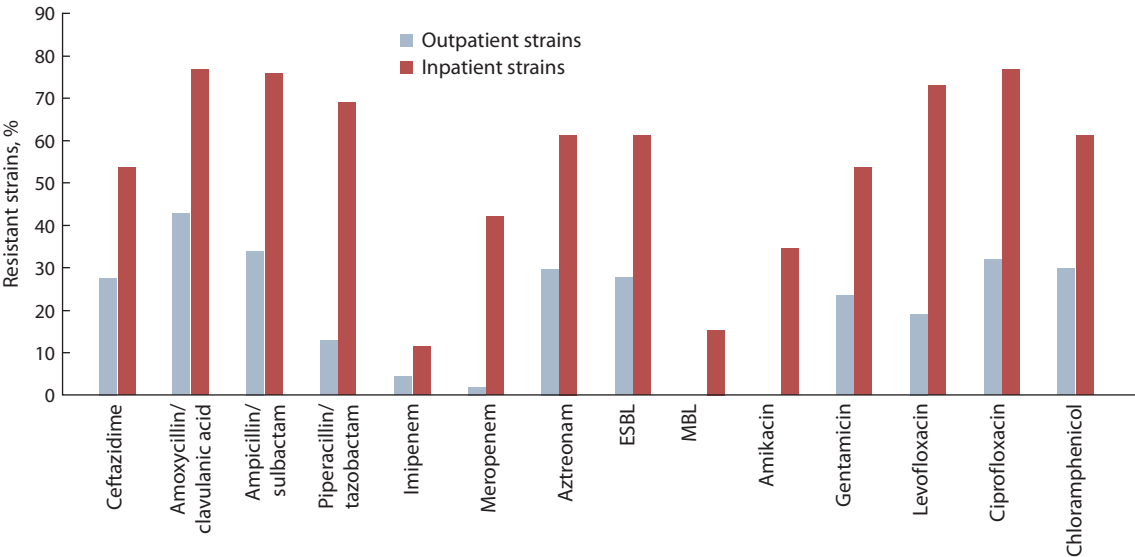
Количество гипермукоидных среди штаммов *K. pneumoniae* от амбулаторных и госпитализированных больных составило 13 и 19 % соответственно. Этот фактор патогенности присутствовал у штаммов, относившихся к разным К-серотипам (см. табл. 2).

Фенотипическая резистентность к антибиотикам

Среди штаммов от амбулаторных больных чаще выявлялась резистентность к ампициллин/клавуланату (более 40 % случаев), почти не встречалась резистентность к карбапенемам, БЛРС продуцировали 28 % штаммов. Штаммов, продуцирующих МБЛ, не выявлено. Среди штаммов от госпитализированных пациентов резистентность к разным классам антибиотиков оказалась выше (см. рисунок). Свыше 70 % штаммов были нечувствительны к защищенным пенициллинам, более 40 % проявляли резистентность к меропенему, 11.5 и 60 % штаммов являлись продуцентами МБЛ и БЛРС соответственно. Также среди штаммов от амбулаторных и госпитализированных пациентов было выявлено соответственно 21.7 и 54 % полнорезистентных штаммов, обладавших устойчивостью к четырем классам антибиотиков.

Генетические детерминанты резистентности

штаммов от амбулаторных больных
Штаммы, чувствительные к использованным антибиотикам. В ходе исследования было показано, что 30 (65 %) штаммов *Klebsiella* spp., полученных от амбулаторных больных, чувствительны к использованным антибиотикам либо резистентны только к одному-двум из них (табл. 3). В то же время у большинства штаммов были обнаружены гены бета-лактамаз семейства *shv*, а также хромосомные гены *oqxA* и *oqxB* системы эффлюкса, которая должна способствовать выведению фторхинолонов из клетки. Наличие генов *oqxA* и *oqxB* у чувствительных штаммов согласуется с литературными данными, так как известно, что эти гены присутствуют у большинства штаммов *K. pneumoniae* (Yang et al., 2014; Hooper, Jacoby, 2015). Штамм КР_2634 содержал ген *aadA*, но был чув-



Phenotypic antibiotic resistance in clinical *Klebsiella* strains.

Table 3. Resistance genes found in outpatient strains sensitive to antibiotics tested

Strain designation (K serotype)	Strain origin	Detected genes	Antibiotics to which the strain is resistant, (I) intermediate resistance
KP_270 (K43) KG_1621 KG_2641 KG_3113 KG_3768 KG_3770	Feces (AEI), urine	–	–
KO_2335	Feces (AEI)	<i>oqxA</i>	–
KP_1967 (K38) KP_2686 (K47)	Skin lesions, feces (AEI)	<i>bla_{SHV}</i>	–
KP_2291 (K25) KP_2646 (K71) KP_2405 (K1)	Feces (AEI), nasopharyngeal swab	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB</i>	– –
KP_2634 (K62)	Urine	<i>bla_{SHV}</i> <i>aadA</i> <i>oqxA, oqxB</i>	– – –
KP_356 (K80)	Feces	–	CIP (I)
KA_2531 KA_2891	Feces (AEI), nasopharyngeal swab	–	AMP/CAL
KQ_1250 (K6/K64)	Vaginal smear	<i>oqxA, oqxB</i>	CIP
KO_2487	Feces (AEI)	– <i>oqxA</i>	CAZ (I) –
KP_2452 (K47)	Feces (AEI)	<i>bla_{SHV}</i>	PIP/TZB (I)
KP_2505 (K5)	Feces (AEI)	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB</i>	PIP/TZB (I) –
KP_3647 (K1)	Throat swab	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA</i>	AMP/CAL –
KP_3729 (K2)	Nasopharyngeal swab	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA</i>	– CIP (I)
KP_3908 (K38)	Nasopharyngeal swab	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA</i>	PIP/TZB –
KP_2810 (K1)	Vaginal smear	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA</i>	AMP/SUL, PIP/TZB (I) –
KA_2890	Nasopharyngeal swab	–	CAZ (I), AMP/CAL
KP_1751 (K140)	Feces (AEI)	–	PIP/TZB (I) CIP (I)
KP_3632 (K1) KP_3649 (K1/KN2)	Feces	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB</i> n. t.	– LEV (I), CIP CLM
KP_3646 (K1)	Throat swab	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB</i> n. t.	– LEV (I), CIP (I) CLM
KP_3425 (K10)	Vaginal smear	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB, qnrS</i>	PIP/TZB (I) LEV (I), CIP

Note. Here and in Tables 4 and 5: KA – *K. aerogenes*, KG – *K. grimontii*, KO – *K. oxytoca*, KP – *K. pneumoniae*, KQ – *K. quasipneumoniae*; AEI, acute enteric infection; DFD, diabetic foot disease. Strain numbers correspond to numbers in the Collection of extremophilic microorganisms and type cultures, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk. Strains were tested for sensitivity to antibiotics: amoxycillin+clavulanic acid (AMP/CAL, 20/20 µg), ampicillin/sulbactam (AMP/SUL, 10/10 µg), piperacillin/tazobactam (PIP/TZB, 30/10 µg), ceftazidime (CAZ, 10 µg), amikacin (AMK, 30 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), levofloxacin (LEV, 5 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), imipenem (IPM, 10 µg), meropenem (MEM, 10 µg), chloramphenicol (CLM, 30 µg), aztreonam (ATM, 30 µg); n.t. — not tested.

Table 4. Resistance genes found in outpatient strains resistant to antibiotics tested

Strain designation (K serotype)	Strain origin	Detected genes	Antibiotics to which the strain is resistant, (I) intermediate resistance
KP_3041 (K3/K31)	Discharge from a septic wound in DFD	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aph6-Id</i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>	AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB – –
KA_2420	Feces (AEI)	– – n.t.	AMP/CAL, PIP/TZB (I) IPM ATM, CLM
KP_2473 (K47)	Feces (AEI)	<i>bla_{SHV}</i> – n.t.	CAZ (I), PIP/TZB (I) CIP (I) ATM (I)
KP_2685 (K47)	Feces (AEI)	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aph6-Id</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL – – ATM
KP_2827 (K25)	Vaginal smear	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> n.t.	CAZ (I), AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) – CLM
KP_2826 (K9)	Vaginal smear	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>qnrB</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) AMK (I) – ATM
KP_2337 (K13/K64)	Feces (AEI)	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aph6-Id</i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL GEN LEV (I), CIP ATM
KP_2548 (K2), KP_2576 (K2)	Urine	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2574 (K2)	Urine	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2728 (K2)	Urine	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2946 (K2)	Urine	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I), GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2786 (K25)	Vaginal smear	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aadA</i> , <i>aph6-Id</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) GEN LEV (I), CIP ATM
KP_2554 (K2)	Feces (AEI)	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aph6-Id</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) GEN LEV (I), CIP ATM, CLM
KP_2573 (K2)	Feces (AEI)	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV (I), CIP ATM, CLM
KP_3597 (K1/KN2)	Feces	<i>bla_{OXA-48}</i> , <i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aadA</i> , <i>aph6-Id</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> n.t.	IPM, MEM, CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV (I), CIP ATM, CLM

ствителен к аминогликозидам, тогда как резистентный к ципрофлоксацину штамм КР_3425 обладал, помимо генов *oqxA* и *oqxB*, плазмидным геном *qnrS* (см. табл. 3). По-видимому, присутствие одиночных генов резистентности в клетках клебсиелл не всегда коррелирует с проявлением фенотипической резистентности, наличие которой зависит от экспрессии этих генов или может быть опосредовано другими механизмами.

Штаммы, устойчивые к использованным антибиотикам. В эту группу были объединены штаммы, устойчивые к трем и более антибиотикам. При этом устойчивость к двум или более защищенным пенициллинам (AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB) сопровождалась наличием генов семейств *bla_{SHV}* и *bla_{TEM}* у всех штаммов, кроме КА_2420, КР_2826 и КР_2827. Присутствие гена семейства *bla_{CTX}* во всех случаях сопровождалось резистентностью к цефтазидиму (CAZ) и продукцией БЛРС. Резистентность к карбапенемам была выявлена в двух штаммах, из них КР_3597 содержал ген *bla_{OXA-48}*, а в штамме КА_2420 не обнаружено никаких генов резистентности из изучаемого спектра (табл. 4).

Резистентность к аминогликозидам (AMK и/или GEN) присутствовала у 11 штаммов, но только у четырех из них были найдены последовательности генов *aadA* и/или *aph6-Id*. Последовательность *aph6-Id* выявлялась и у штаммов, не обладавших резистентностью к аминогликозидам (см. табл. 4).

Полная (R) или промежуточная (I) резистентность к фторхинолонам (LEV и/или CIP) была выявлена у 11 штаммов; у 10 из них были найдены гены *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB* и *qnrS* в различных комбинациях. Надо отметить, что присутствие только генов *oqxA* и/или *oqxB* не коррелирует с наличием резистентности к фторхинолонам (см. табл. 3 и 4).

Генетические детерминанты резистентности штаммов от госпитализированных пациентов

Из 26 штаммов только пять не обладали множественной устойчивостью к антибиотикам, и 42 % штаммов были резистентны к карбапенемам (табл. 5). Как и в штаммах от амбулаторных больных, устойчивость к цефтазидиму и продукция БЛРС совпадали с присутствием гена семейства *bla_{CTX}*, а устойчивость к карбапенемам была связана с наличием гена *bla_{OXA-48}*. Ген *bla_{OXA-48}* также был ассоциирован с продукцией БЛРС у штаммов КР_3521, КР_3522, КР_3533, у которых *bla_{CTX}* не выявлялся. Генов карбапенемаз семейств *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* не было обнаружено, хотя штаммы КР_3521, КР_3526 и КР_3533 обладали резистентностью к карбапенемам, подавляемой в присутствии ЭДТА (см. табл. 5). По-видимому, резистентность к карбапенемам обусловлена другими генетическими механизмами.

Шестнадцать штаммов от госпитализированных пациентов (61 %) были устойчивы к аминогликозидам (AMK и/или GEN), у 12 из них были выявлены гены *aadA* и/или *aph6-Id*. Устойчивость оставшихся 4 штаммов была обусловлена другими механизмами, так как у них не обнаружены исследуемые гены резистентности (см. табл. 5).

Резистентность к фторхинолонам (LEV и CIP) была выявлена у 20 штаммов, у 18 из них найдены гены *aac(6')*-

Ib-cr, *oqxA*, *oqxB* и *qnrS* в различных комбинациях. Так же, как и в популяции штаммов от амбулаторных больных, выявление только генов *oqxA* и/или *oqxB* не коррелировало с наличием резистентности к фторхинолонам (см. табл. 3–5).

Обсуждение

В ходе исследования среди 72 клинических штаммов клебсиелл было выявлено 57 штаммов *K. pneumoniae*. Из 15 оставшихся штаммов семь были отнесены к *K. grimontii*, пять – к *K. aerogenes*, два – к *K. oxytoca* и один штамм – к *K. quasipneumoniae* (см. табл. 3–5). Четырнадцать из этих 15 штаммов показали чувствительность к большинству использованных антибиотиков. Исключением стал штамм *K. aerogenes* КА_2420, устойчивый к защищенным пенициллинам, имипенему, азтреонаму и хлорамфениколу (см. табл. 4). При этом ни у одного штамма, включая КА_2420, не выявлено исследуемых генов резистентности, кроме *oqxA*, *oqxB* у штаммов КО_2335, КО_2487 и КQ_1250. Возможно, генетические механизмы резистентности различны у штаммов клебсиелл, относящихся к разным видам.

Основную проблему для терапии представляют штаммы *K. pneumoniae*, поскольку именно они являются полирезистентными (см. табл. 5). Анализ 57 штаммов *K. pneumoniae* на наличие генов бета-лактамаз семейств *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* и бета-лактамаз семейства OXA (*bla_{OXA-2}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-48}* и *bla_{OXA-58}*) выявил гены первых трех семейств и ген *bla_{OXA-48}*. Ген *bla_{SHV}* присутствовал у 84 % амбулаторных штаммов *K. pneumoniae* со слабовыраженной резистентностью (табл. 3, 6) и у 100 % резистентных штаммов как от амбулаторных, так и от госпитализированных больных (см. табл. 4–6). Ген *bla_{TEM}* отсутствовал у чувствительных к антибиотикам штаммов от амбулаторных больных, но был обнаружен у 80 % резистентных штаммов от амбулаторных больных и лишь у 40 % штаммов от госпитализированных пациентов (см. табл. 4–6). Наличие *bla_{SHV}* и/или *bla_{TEM}* не всегда сочеталось с резистентностью к исследованным бета-лактамам, поэтому они не могут быть корректными маркерами резистентности, в отличие от *bla_{CTX}* и *bla_{OXA-48}* (см. табл. 4 и 5), выявление которых может быть использовано для быстрого определения продукции БЛРС и резистентности к карбапенемам соответственно.

Согласно многоцентровому эпидемиологическому исследованию, проведенному в России в 2015–2016 гг., 75.6 % нозокомальных штаммов *K. pneumoniae* продуцировали БЛРС, 26.5 % штаммов продуцировали карбапенемазы (OXA-48 – 21.5 %, NDM – 4.3, OXA-48 и NDM – 0.6, KPC – 0.1 %) (Сухорукова и др., 2019). В изученной нами выборке штаммов от госпитализированных пациентов доля штаммов-продуцентов БЛРС была похожей (65 %), но гораздо выше оказалась доля штаммов, устойчивых к карбапенемам и содержащих *bla_{OXA-48}* (56 %); при этом генов устойчивости к карбапенемам семейств *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* нами не выявлено.

Среди исследованных генов устойчивости к аминогликозидам *aac3*, *aph6*, *ant2*, *ant6*, *aph(6)-Id*, *aadA* были обнаружены только последние два. Их присутствие не всегда коррелировало с фенотипической резистентностью

Table 5. Resistance genes in strains from inpatients

Strain designation (K serotype)	Strain origin*	Detected genes	Antibiotics to which the strain is resistant, (I) intermediate resistance
KG_1801	Discharge from a septic wound in DFD (RCH)	–	–
KP_1819 (K21/K13/K46/K61)	Discharge from a septic wound in DFD (RCH)	<i>bla_{SHV}</i>	–
KP_3442 (K47)	Pharyngeal swab from a patient under invasive ventilation (CCH)	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqx_A, oxq_B</i>	– –
KG_1838	Discharge from a septic wound in DFD (RCH)	–	PIP/TZB
KA_3530	Urine (RITO)	–	AMP/CAL
KP_2067 (K2)	Surgical wound punctate (RITO)	<i>bla_{SHV}</i> – n. t.	PIP/TZB (I) LEV, CIP CLM
KP_2071 (K2)	Synovial fluid (RITO)	<i>bla_{SHV}</i> – – n. t.	– GEN LEV, CIP CLM
KP_3772 (K2)	Blood cyst content (CNMT)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV}</i> <i>aac(6')-lb-cr, oxq_A, oxq_B</i> n. t.	IPM (I), MEM (I), AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB LEV, CIP CLM
KP_3522 (K2)	Urine (RITO)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV}</i> <i>aac(6')-lb-cr, oxq_A, oxq_B</i> n. t.	MEM (I), ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB LEV, CIP CLM
KP_2894 (K1)	Wound discharge (RCH)	<i>bla_{CTX}, bla_{SHV}, bla_{TEM}</i> <i>oxq_A</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) – ATM
KP_3813 (K24)	Bioplate (RITO)	<i>bla_{CTX}, bla_{SHV}, bla_{TEM}</i> <i>aph6-ld</i> <i>oxq_A, oxq_B, qnrS</i> n. t.	ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL – LEV (I), CIP ATM (I), CLM
KP_3519 (K34/K57)	Bioplate (RITO)	<i>bla_{CTX}, bla_{SHV}</i> <i>aph6-ld, aadA</i> <i>aac(6')-lb-cr, oxq_A, oxq_B, qnrS</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3520 (K34/K57)	Pure culture (RITO)	<i>bla_{CTX}, bla_{SHV}</i> <i>aadA</i> <i>aac(6')-lb-cr, oxq_A, oxq_B, qnrS</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3521 (K2)	Pure culture (RITO)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV}</i> <i>aac(6')-lb-cr, oxq_A, oxq_B</i> n. t.	IPM, MEM, ESBL, MBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I) LEV, CIP CLM
KP_3533 (K2)	Pure culture (RITO)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV}</i> <i>aadA</i> <i>aac(6')-lb-cr, oxq_A, oxq_B</i> n. t.	IPM, MEM, ESBL, MBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I) LEV, CIP CLM
KP_3523 (K22/K30) KP_3524 (K22/K30) KP_3528 (K22/K30) KP_3531 (K22/K30) KP_3537 (K22/K30)	Urine (RITO)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{CTX}, bla_{SHV}, bla_{TEM}</i> <i>aadA, aph6-ld</i> <i>oxq_A, oxq_B</i> n. t.	IPM (I), MEM, CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3526 (K22/K30)	Urine (RITO)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{CTX}, bla_{SHV}, bla_{TEM}</i> <i>aadA, aph6-ld</i> <i>oxq_A, oxq_B</i> n. t.	IPM (I), MEM, CAZ, ESBL, MBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM

End of Table 5

Strain designation (K serotype)	Strain origin*	Detected genes	Antibiotics to which the strain is resistant, (I) intermediate resistance
KP_3529 (K22/K30)	Urine (RITO)	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} <i>aadA</i> , <i>aph6-Id</i> <i>oqx</i> A, <i>oqx</i> B n.t.	MEM, CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3835 (K17)	Wound discharge (RITO)	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX} , <i>bla</i> _{SHV} <i>aadA</i> <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>oqx</i> A, <i>oqx</i> B n.t.	IPM (I), MEM, CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I), GEN LEV, CIP ATM
KP_3836 (K17)	Urine (RITO)	<i>bla</i> _{CTX} , <i>bla</i> _{SHV} – <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>oqx</i> A, <i>oqx</i> B n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I), GEN LEV, CIP ATM
KP_3838 (K17)	Pure culture (RITO)	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX} , <i>bla</i> _{SHV} <i>aadA</i> <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>oqx</i> A, <i>oqx</i> B n.t.	IPM, MEM, CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM
KP_3839 (K17)	Wound discharge (RITO)	<i>bla</i> _{CTX} , <i>bla</i> _{SHV} – <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>oqx</i> A, <i>oqx</i> B n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV, CIP ATM

* RCH, Railway Clinical Hospital, Novosibirsk-Glavnyy Railway Station; CCH, Central Clinical Hospital, Siberian Branch of the RAS; RITO, Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk; CNMT, Center for New Medicinal Technologies, Novosibirsk.

Table 6. Percentage of *K. pneumoniae* strains bearing resistance genes

Gene or gene family	Outpatient strains		Inpatient strains
	weakly resistant	resistant	
<i>bla</i> _{SHV}	84	100	100
<i>bla</i> _{TEM}	0	80	40
<i>bla</i> _{CTX}	0	80	65
<i>bla</i> _{OXA-48}	0	5	56
<i>oqx</i> A	68	93	83
<i>oqx</i> B	47	73	83
<i>aac</i> (6')-Ib-cr	0	73	43
<i>qnr</i> B	0	20	0
<i>qnr</i> S	5	33	13
<i>aadA</i>	5	13	52
<i>aph6-Id</i>	0	40	39

(см. табл. 3–5), свидетельствуя о том, что резистентность к аминогликозидам может быть обусловлена и другими механизмами.

Из 22 штаммов *K. pneumoniae*, обладавших генами *aac*(6')-Ib-cr и/или *qnr*B/*qnr*S, резистентность к фторхинолонам (LEV и CIP) была определена у 20 (90 %) штаммов (см. табл. 3–5). Следует отметить, что ген *qnr*B обнаружен лишь в трех случаях (см. табл. 4 и 6) и, возможно, является малораспространенным в новосибирских штаммах. Тем не менее выявление *aac*(6')-Ib-cr и/или *qnr*B/*qnr*S хоро-

шо согласуется с наличием фенотипической резистентности и может быть использовано для быстрого предсказания устойчивости изолята к фторхинолонам.

Считается, что плазмидные гены резистентности к фторхинолонам семейства *qnr* часто ассоциированы с БЛРС-продуцирующими изолятами (Robicsek et al., 2006). В нашем исследовании такая ассоциация была выявлена среди штаммов, выделенных от амбулаторных больных, так как 10 из 12 штаммов-продуцентов БЛРС содержали гены *qnr*B и/или *qnr*S (см. табл. 4). В то же время толь-

ко 3 из 18 штаммов-продуцентов БЛРС, полученных от госпитализированных пациентов, содержали ген *qnrS*, при этом 17 из них были резистентны к фторхинолонам. Это свидетельствует о других возможных механизмах резистентности, таких как уменьшение проницаемости мембраны и сверхактивность эффлюксной помпы.

Заключение

Таким образом, среди клинических штаммов клебсиелл, выделенных у пациентов в г. Новосибирске, доминировали штаммы *K. pneumoniae*. Обнаружены также штаммы *K. grimontii*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* и *K. quasipneumoniae*. Методом молекулярного серотипирования штаммы *K. pneumoniae* были отнесены к 21 К-серотипу; большинство среди них составляли вирулентные серотипы K1 и K2. Выявлено, что штаммы *K. pneumoniae* обладали наибольшей резистентностью к антибиотикам среди различных видов клебсиелл. Генетическими детерминантами резистентности к бета-лактамам в исследованной популяции являлись *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* и *bla_{OXA-48}*. Показаны ассоциации между присутствием *bla_{CTX}*, *bla_{OXA-48}* и продукцией БЛРС и устойчивостью к карбапенемам соответственно. Среди исследованных генов устойчивости к аминогликозидам были обнаружены гены *aph(6)-Id* и *aadA*, однако их наличие не всегда совпадало с фенотипической резистентностью. Резистентность к фторхинолонам у большинства штаммов сопровождалась присутствием генов *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxV*, *qnrB* и *qnrS* в различных комбинациях. Следует отметить, что присутствие одних только генов *oqxA* и/или *oqxV* не коррелировало с наличием устойчивости к фторхинолонам.

Список литературы / References

Иванов Д.В., Егоров А.М. Распространение и механизмы резистентности микроорганизмов, продуцирующих бета-лактамазы. Молекулярные механизмы устойчивости к бета-лактамам антибиотикам штаммов клебсиелл, выделенных при внутрибольничных инфекциях. *Биомед. химия*. 2008;54(1):104-113. [Ivanov D.V., Egorov A.M. Spreading and mechanisms of antimicrobial resistance in microorganisms, producing beta-lactamases. Molecular mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics of *Klebsiella* spp. strains, isolated in cases of nosocomial infections. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B*. 2008;2:311-317. DOI 10.1134/S1990750808030141.]

Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(1):79-84. DOI 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84. [Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Susceptibility to antibiotics in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a multidisciplinary medical centre. *Infektsiya i Immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018;8(1):79-84. (in Russian)]

Козлова Ю.Н., Фоменко Н.В., Морозова В.В., Саранина И.В., Тикунов А.Ю., Ганичев Д.А., Самохин А.Г., Павлов В.В., Рожнова О.М., Бондарь И.А., Зенкова Е.В., Нимаев В.В., Климонтов В.В., Тикунова Н.В. Идентификация стафилококков, включая метициллинрезистентные штаммы, биохимическими и генетическими методами. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(8):952-958. DOI 10.18699/VJ17.318. [Kozlova Y.N., Fomenko N.V., Morozova V.V., Saranina I.V., Tikunov A.Yu., Ganichev D.A., Samokhin A.G., Pavlov V.V., Rozhnova O.M., Bondar' I.A., Zenkova E.V., Nimaev V.V., Klimontov V.V., Tikunova N.V. Genetic and biochemical characterization of staphy-

lococci occurring in Novosibirsk, Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017; 21(8):952-958. DOI 10.18699/VJ17.318. (in Russian)]

Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая Волна, 2005. [Mashkovsky M.D. Medicinal Preparations. Moscow: Novaya Volna Publ., 2005. (in Russian)]

Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Скленова Е.Ю., Шайдуллина Э.Р., Азизов И.С., Шек Е.А., Кузьменков А.Ю., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Семенова Н.В., ... Звонарева О.В., Корнилова П.А., Крянга В.Г., Портнягина У.С., Шамаева С.Х., Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacterales в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». *Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(2): 147-159. DOI 10.36488/cmasc.2019.2.147-159. [Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Ivanchik N.V., Skleenova E.Yu., Shaidullina E.R., Azizov I.S., Shek E.A., Kuzmenkov A.Iu., Dekhnic A.V., Kozlov R.S., Semenova N.V., ... Zvonareva O.V., Kornilova P.A., Krianga V.G., Portniagina U.S., Shamaeva S.Kh., Popov D.A., Vostrikova T.Iu. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacterales isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016". *Klinicheskaâ Mikrobiologiâ i Antimikrobnââ Himioterapiâ = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(2):147-159. DOI 10.36488/cmasc.2019.2.147-159. (in Russian)]

Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. *Мед. журн.* 2012;2(40):10-15. [Tapalsky D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Meditsynskiy Zhurnal = Medical Journal*. 2012;2(40):10-15. (in Russian)]

Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригора И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. *Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2020;22(1):4-19. DOI 10.36488/cmasc.2020.1.4-19. [Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Podoprighora I.V., Shagin D.A. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. *Klinicheskaâ Mikrobiologiâ i Antimikrobnââ Himioterapiâ = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;22(1):4-19. DOI 10.36488/cmasc.2020.1.4-19. (in Russian)]

Эйдельштейн М.В. Выявление β-лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов. *Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001;3(2):183-189. [Edelstein M.V. Detection of extended spectrum β-lactamases by phenotypic methods in gram-negative bacteria. *Klinicheskaâ Mikrobiologiâ i Antimikrobnââ Himioterapiâ = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;3(2):183-189. (in Russian)]

Brisse S., Passet V., Haugaard A.B., Babosan A., Kassis-Chikhani N., Struve C., Decré D. *wzi* gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for *Klebsiella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51:4073-4078. DOI 10.1128/JCM.01924-13.

Broberg C.A., Palacios M., Miller V.L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep.* 2014;6:64. DOI 10.12703/P6-64.

Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(3):969-976. DOI 10.1128/AAC.01009-09.

Galal L., Abdel Aziz N.A., Hassan W.M. Defining the relationship between phenotypic and genotypic resistance profiles of multidrug-resistant enterobacterial clinical isolates. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1214:9-21. DOI 10.1007/5584_2018_208.

Gharrah M.M., El-Mahdy A.M., Barwa R.F. Association between virulence factors and extended spectrum beta-lactamase producing *Kleb-*

- siella pneumoniae* compared to nonproducing isolates. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2017;7279830. DOI 10.1155/2017/7279830.
- Hoa P.L., Chowa K.H., Yuena K.Y., Ngb W.S., Chaua P.Y. Comparison of a novel, inhibitor-potentiased disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998;42:49-54.
- Hooper D.C., Jacoby G.A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2015;1354(1):12-31. DOI 10.1111/nyas.12830.
- Lee H.C., Chuang Y.C., Yu W.L., Lee N.Y., Chang C.M., Ko N.Y., Wang L.R., Ko W.C. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. *J. Intern. Med.* 2006;259(6):606-614. DOI 10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x.
- Lee K., Chong Y., Shin H.B., Kim Y.A., Yong D., Yum J.H. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001;7:88-91.
- Liakopoulos A., Mevius D., Ceccarelli D. A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous. *Front. Microbiol.* 2016;5(7):1374. DOI 10.3389/fmicb.2016.01374.
- Morozova V.V., Babkin I.V., Kozlova Y.N., Baykov I.K., Bokovaya O.V., Tikunov A.Yu., Ushakova T.A., Bardasheva A.V., Ryabchikova E.I., Zelentsova E., Tikunova N.V. Isolation and characterization of a novel *Klebsiella pneumoniae* N4-like bacteriophage KP8. *Viruses*. 2019;11(12):1115. DOI 10.3390/v11121115.
- Mukherjee S., Naha S., Bhadury P., Saha B., Dutta M., Dutta S., Basu S. Emergence of OXA-232-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 causing neonatal sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020;75(7):2004-2006. DOI 10.1093/jac/dkaa080.
- Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998;11(4):589-603.
- Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug. Resist. Updat.* 2010;13(6):151-171.
- Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* 2006;6:629-640.
- Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 2005;18(2):306-325.
- Yang H.Y., Nam Y.S., Lee H.J. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2014;25(3):163-169.
- Yong D., Lee K., Yum J.H., Shin H.B., Rossolini G.M., Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(10):3798-3801.

ORCID ID

A.V. Bardasheva orcid.org/0000-0002-3872-4122
I.V. Babkin orcid.org/0000-0001-7158-3774
E.V. Zhirakovskaya orcid.org/0000-0001-6787-8393
N.V. Tikunova orcid.org/0000-0002-1687-8278
V.V. Morozova orcid.org/0000-0002-0869-3476

Acknowledgements. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 18-29-08015, and State Budgeted Project 0245-2021-0008 for the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk. The strains tested were taken from the Collection of Extremophilic Microorganisms and Type Cultures, ICBFM.

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

Received September 11, 2020. Revised November 30, 2020. Accepted December 8, 2020. Published online February 11, 2021.

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, PubMed Central, Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, каталог научных ресурсов открытого доступа ROAD.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦИГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦИГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 16.04.2021. Выход в свет 30.04.2021. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 13.02.

Уч.-изд. л. 15.2. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–50 экз.). Заказ № 71. Цена свободная.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.