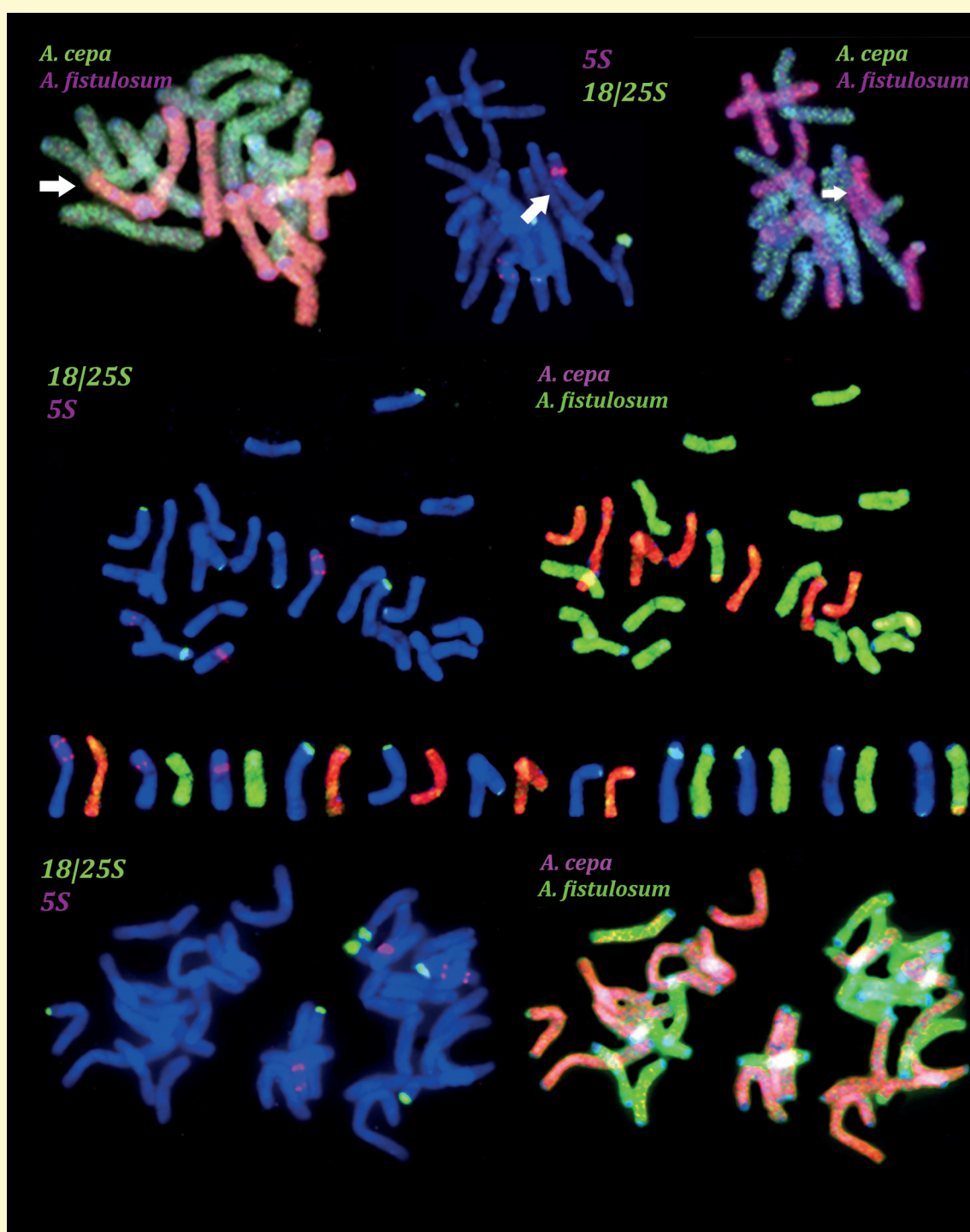


БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2(3), 2019



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ВСЕРОССИЙСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА (ВИР)



THE MINISTRY OF SCIENCE AND HIGHER
EDUCATION OF THE RUSSIAN FEDERATION
FEDERAL RESEARCH CENTER
THE N.I. VAVILOV ALL-RUSSIAN INSTITUTE OF
PLANT GENETIC RESOURCES (VIR)

НАУЧНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2019, 2 (3)

ОСНОВАН В 2018 ГОДУ
ПЕРИОДИЧНОСТЬ 4 РАЗА В ГОД

*Для биотехнологов, селекционеров,
генетиков, преподавателей вузов
биологического и сельскохозяйствен-
ного профиля.*

e-mail: pbi@vir.nw.ru

190000 Россия, г. Санкт-Петербург,
ул. Б. Морская, 42, 44

© Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)

DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3
УДК: 573.6:631.527

ПИ № ФС 77–74475
ISSN: 2658-6266 (Print)
ISSN: 2658-6258 (Online)

SCIENTIFIC PEER REVIEWED JOURNAL

PLANT BIOTECHNOLOGY AND BREEDING

2019, 2 (3)

FOUNDED IN 2018
PUBLISHED 4 TIMES ANNUALLY

*Addressed to biotechnologists, geneticists,
plant breeders and lecturers of biological
and agricultural universities and colleges.*

e-mail: pbi@vir.nw.ru

42, 44 Bolshaya Morskaya Street,
St. Petersburg 190000, Russia

© Federal Research Center the N.I. Vavilov
All-Russian Institute of Plant Genetic Resources
(VIR)

Главный редактор:

Е. К. Хлесткина – д.б.н., профессор РАН.

Заместитель главного редактора:

Т. А. Гавриленко – д.б.н.

Ответственные секретари:

И. Н. Анисимова – д.б.н.

Л. Ю. Новикова – д.с.-х.н.

Редакционный совет:

А. И. Абугалиева – д.б.н. (Казахстан)
О. С. Афанасенко – д.б.н., академик РАН (Россия)
Г. А. Баталова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Р. К. Берсимбаев – д.б.н., академик НАН РК (Казахстан)
Л. А. Беспалова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
А. И. Грабовец – д.с.-х.н., чл.-корр. РАН (Россия)
С. И. Гриб – д.с.-х.н., академик НАНБ (Беларусь)
Е. А. Егоров – д.э.н., академик РАН (Россия)
В. Г. Еремин – д.с.-х.н., профессор РАН (Россия)
Г. В. Еремин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Г. И. Карлов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
А. В. Кильчевский – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)
З. А. Козловская – д.с.-х.н. (Беларусь)
Н. А. Колчанов – д.б.н., академик РАН (Россия)
В. Н. Корзун – д-р (Германия)
А. В. Кочетов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
Н. В. Кухарчик – д.с.-х.н. (Беларусь)
В. М. Лукомец – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Л. А. Лутова – д.б.н. (Россия)
С. Мишева – д-р (Болгария)
А. И. Моргунов – д-р (Турция)
В. Ройчев – д.с.-х.н. (Болгария)
А. А. Романенко – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
А. В. Рындин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Е. Н. Седов – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
И. А. Тихонович – д.б.н., академик РАН (Россия)
П. Н. Харченко – д.б.н., академик РАН (Россия)
Л. В. Хотылева – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)
В. К. Шумный – д.б.н., академик РАН (Россия)

Редакционная коллегия:

Е. Е. Андронов – к.б.н. (Россия)
Д. А. Афонников – к.б.н. (Россия)
А. Х. Баймиев – д.б.н. (Россия)
И. А. Белан – к.с.-х.н. (Россия)
А. Г. Беседин – к.с.-х.н. (Россия)
М. А. Вишнякова – д.б.н. (Россия)
В. А. Гаврилова – д.б.н. (Россия)
С. В. Гаркуша – д.с.-х.н. (Россия)
Т. А. Гасанова – к.с.-х.н. (Россия)
С. В. Герасимова – к.б.н. (Россия)
М. С. Гинс – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
С. В. Гончаров – д.б.н. (Россия)
Р. О. Давоян – д.б.н. (Россия)
Я. Н. Демулин – д.б.н. (Россия)
М. Г. Дивашук – к.б.н. (Россия)
С. Н. Еланский – д.б.н. (Россия)
О. В. Еремина – д.с.-х.н. (Россия)
А. П. Ермишин – д.б.н. (Беларусь)
М. В. Ефимова – к.б.н. (Россия)
Р. Ш. Заремук – д.с.-х.н. (Россия)
С. В. Зеленцов – д.с.-х.н. (Россия)
Е. Т. Ильницкая – к.б.н. (Россия)
Р. Н. Календарь – к.б.н. (Казахстан)
Н. Н. Карпун – к.б.н. (Россия)
В. С. Ковалев – д.с.-х.н. (Россия)
Н. Н. Коваленко – д.б.н. (Россия)
Е. З. Кочиева – д.б.н. (Россия)
Б. Р. Кулуев – д.б.н. (Россия)
К. У. Куркиев – д.б.н. (Россия)
С. В. Кушнаренко – к.б.н. (Казахстан)
И. Н. Леонова – д.б.н. (Россия)
И. Е. Лихенко – д.с.-х.н. (Россия)
В. В. Лиховской – д.с.-х.н. (Россия)
П. Н. Мальчиков – д.с.-х.н. (Россия)
Т. В. Матвеева – д.б.н. (Россия)
Н. В. Мироненко – д.б.н. (Россия)
И. В. Митрофанова – д.б.н. (Россия)
Е. И. Михайлова – д.б.н. (Россия)
С. В. Осипова – д.б.н. (Россия)
В. Н. Подорожный – к.с.-х.н. (Россия)
Т. Г. Причко – д.с.-х.н. (Россия)
Т. А. Рожмина – д.б.н. (Россия)
А. В. Смыков – д.с.-х.н. (Россия)
А. А. Соловьев – д.б.н., профессор РАН (Россия)
И. И. Супрун – к.б.н. (Россия)
Е. К. Турусбеков – к.б.н. (Казахстан)
Е. В. Ульяновская – д.с.-х.н. (Россия)
О. Ю. Урбанович – д.б.н. (Беларусь)
Ю. В. Фотев – к.с.-х.н. (Россия)
Э. Б. Хатефов – д.б.н. (Россия)
Я. А. Цепилов – к.б.н. (Россия)
М. Н. Шаптуренко – д.б.н. (Беларусь)
О. Ю. Шоева – к.б.н. (Россия)
Л. А. Эльконин – д.б.н. (Россия)
Г. В. Якуба – к.б.н. (Россия)

Editor-in-Chief:

E. K. Khlestkina – Dr. Sci. in Biol., Professor.

Deputy Editor-in-Chief:

T. A. Gavrilenko – Dr. Sci. in Biol.

Executive Secretaries:

I. N. Anisimova – Dr. Sci. in Biol.

L. Yu. Novikova – Dr. Sci. in Agricul.

Editorial council:

A. I. Abugalieva – Dr. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
O. S. Afanasenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
G. A. Batalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
R. K. Bersimbaev – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS RK (Kazakhstan)
L. A. Beshpalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
E. A. Egorov – Dr. Sci. in Econ., Full Member of the RAS (Russia)
G. V. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. G. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Professor (Russia)
A. I. Grabovets – Dr. Sci. in Agricul., Corr. Member of the RAS (Russia)
S. I. Grib – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
G. I. Karlov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
P. N. Kharchenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
L. V. Khotyleva – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
A. V. Kilchevsky – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the NAS of Belarus (Belarus)
A. V. Kochetov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
N. A. Kolchanov – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
V. N. Korzun – Dr. (Germany)
Z. A. Kozlovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)
N. V. Kukharchik – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)
V. M. Lukomets – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
L. A. Lutova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. Misheva – Dr. (Bulgaria)
A. I. Morgunov – Dr. (Turkey)
A. A. Romanenko – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
A. V. Ryndin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. Roychev – Dr. Sci. in Agricul. (Bulgaria)
E. N. Sedov – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. K. Shumny – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
I. A. Tikhonovich – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

Editorial board:

D. A. Afonnikov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. E. Andronov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
A. H. Bajmiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. A. Belan – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
A. G. Besedin – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
R. O. Davoyan – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
Ya. N. Demurin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M. G. Divashuk – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M. V. Efimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
S. N. Elansky – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
L. A. Elkonin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
O. V. Eremina – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A. P. Ermishin – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
Yu. V. Fotev – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
S. V. Garkusha – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. A. Gasanova – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
V. A. Gavrilova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Gerasimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M. S. Gins – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
S. V. Goncharov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. T. Il'nitskaya – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R. N. Kalendar – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
N. N. Karpun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. B. Khatefov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. Z. Kochieva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N. N. Kovalenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V. S. Kovalev – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
B. R. Kuluev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
K. U. Kurkiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Kushnarenko – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
I. N. Leonova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. E. Lihenko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
V. V. Likhovskoi – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
P. N. Malchikov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. V. Matveeva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N. V. Mironenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. V. Mitrofanova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. I. Mikhailova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Osipova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V. N. Podorozhnyi – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
T. G. Prichko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. A. Rozhmina – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M. N. Shapturenko – Dr. Sci. Biology (Belarus)
O. Yu. Shoeva – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
A. V. Smykov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A. A. Soloviev – Dr. Sci. in Biol., Professor (Russia)
I. I. Suprun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
Ya. A. Tsepilov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. K. Turuspekov – Cand. Sci. in Biol.
E. V. Ulyanovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
O. Yu. Urbanovich – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
M. A. Vishnyakova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
G. V. Yakuba – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R. Sh. Zaremuk – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
S. V. Zelentsov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

Содержание

ОТ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

5

Хлесткина Е. К.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

6

Пендинен Г. И., Чернов В. Е.

РАЗНООБРАЗИЕ ХРОМОСОМНОГО
СОСТАВА ОБРАЗЦОВ
ЛУКА МНОГОЯРУСНОГО
ALLIUM × *PROLIFERUM*
(MOENCH) SCHRAD. EX WILLD.
ИЗ КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* ВИР

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

15

*Ильницкая Е. Т., Макаркина М. В.,
Токмаков С. В.*

ДНК-МАРКЕРНАЯ
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА
УСТОЙЧИВОСТИ К МИЛДЬЮ
Rpv3 В БЕССЕМЯННЫХ СОРТАХ
ВИНОГРАДА

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

20

*Анискина Ю. В., Малиновская Е. В.,
Мицурова В. С., Велишаева Н. С.,
Колобова О. С., Шилов И. А.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО
РАЗНООБРАЗИЯ СОРГО
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ТЕХНОЛОГИИ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО
МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

ОБЗОР

30

*Храбров И. Э., Антонова О. Ю.,
Шаповалов М. И., Семёнова Л. Г.*

УСТОЙЧИВОСТЬ ЗЕМЛЯНИКИ
К ОСНОВНЫМ ГРИБНЫМ
ФИТОПАТОГЕНАМ: *R*-ГЕНЫ
И ИХ ДНК-МАРКЕРЫ

ОБЗОР

41

*Эльконин Л. А., Панин В. М.,
Кенжегулов О. А., Геращенко Г. А.*

УЛУЧШЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ
СВОЙСТВ ЗЕРНОВОГО СОРГО НА
ОСНОВЕ МЕТОДОВ СОВРЕМЕННОЙ
ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Contents

FROM THE EDITOR IN CHIEF

5

Khlestkina E. K.

ORIGINAL ARTICLE

6

Pendinen G. I., Chernov V. E.

DIVERSITY OF CHROMOSOMAL
COMPOSITION IN TOP ONION
ALLIUM × *PROLIFERUM* (MOENCH)
SCHRAD. EX WILLD. ACCESSIONS
FROM THE VIR *IN VITRO*
COLLECTION

ORIGINAL ARTICLE

15

*Ilitskaya E. T., Makarkina M. V.,
Tokmakov S. V.*

DNA MARKER IDENTIFICATION
OF *Rpv3* DOWNY MILDEW
RESISTANCE GENE IN SEEDLESS
GRAPE VARIETIES

ORIGINAL ARTICLE

20

*Aniskina Y. V., Malinovskaya E. V.,
Mitsurova V. S., Velishaeva N. S.,
Kolobova O. S., Shilov I. A.*

RESEARCHING THE GENETIC
DIVERSITY OF SORGHUM USING
THE MULTIPLEX MICROSATELLITE
ANALYSIS

REVIEW ARTICLE

30

*Khrabrov I. E., Antonova O. Y.,
Shapovalov M. I., Semenova L. G.*

STRAWBERRY RESISTANCE
TO THE MAJOR FUNGAL
PHYTOPATHOGENS: *R*-GENES AND
THEIR DNA MARKERS

REVIEW ARTICLE

41

*Elkonin L. A., Panin V. M., Kenzhegulov O. A.,
Gerashchenkov G. A.*

IMPROVEMENT OF GRAIN
SORGHUM NUTRITIVE
PROPERTIES USING MODERN
GENETIC AND BIOTECHNOLOGICAL
METHODS



Уважаемые читатели!

Сегодня особое внимание в области прикладной биотехнологии растений и маркер-ориентированной селекции уделяется вегетативно размножаемым культурам и их устойчивости к различным факторам биотического стресса. Несколько статей текущего номера посвящены решению этих вопросов.

Представлена обзорная работа по землянике садовой, обобщающая и систематизирующая сведения об известных генах и локусах количественных признаков, контролирующих устойчивость к грибным заболеваниям, таким как антракнозная гниль, мучнистая роса и др. Приведена информация о ДНК-маркерах, ассоциированных с данными локусами устойчивости, в том числе о маркерах, уже используемых в практической селекции для молекулярного скрининга коллекционного и селекционного материала земляники.

Также представлены результаты оригинального исследования, посвященного поиску доноров гена *Rpv3* среди бессемянных сортов столового винограда. Данный ген обеспечивает устойчивость к одному из наиболее распространенных грибных заболеваний виноградной лозы – милдью. Для определения аллельного состояния гена *Rpv3* использовали аллель-специфичные ДНК-маркеры.

Выделены пять сортов – носителей функционального аллеля данного гена, которые могут быть использованы в селекции бессемянных сортов как доноры устойчивости к милдью.

Понимание организации гибридного генома лука многоярусного, изучению которой при помощи методов молекулярной цитогенетики посвящена следующая работа, позволит пролить свет на механизмы устойчивости лука к факторам биотического стресса.

Другое направление, на котором делается акцент в текущем номере – генетические подходы к изучению и получению продовольственных зерновых культур с повышенной питательной ценностью. Сегодня улучшение соответствующих показателей зерна для удовлетворения потребностей населения в продуктах для диетического, специализированного и функционального питания – одно из наиболее актуальных направлений селекции злаков. Одним из привлекательных объектов для работы в этом направлении является сорго – высокоурожайная жаростойкая и засухоустойчивая культура, зерно которой обладает значительным содержанием белка. В номере представлен обзор работ по использованию методов генетической инженерии и геномного редактирования для улучшения питательной ценности зерна сорго, описаны потенциальные гены-мишени и их функциональная роль. Также представлены результаты оригинального исследования, направленного на оценку степени генетического разнообразия и анализ генетической структуры отечественной коллекции сорго. В результате разработана единая система мультиплексного ПЦР-анализа на основе 12 полиморфных микросателлитных локусов, позволяющая проводить анализ образцов растений в одну стадию. Обработка полученных экспериментальных данных позволила дифференцировать более 200 образцов шести видов сорго по группам в соответствии с классификацией по морфологическим и агрономическим признакам.

Представленные работы будут интересны как для широкого круга читателей в области биологии растений, так и для специалистов, занимающихся частной генетикой и селекцией упомянутых выше культур.

*Главный редактор,
профессор РАН,
Е. К. Хлесткина*

РАЗНООБРАЗИЕ ХРОМОСОМНОГО СОСТАВА ОБРАЗЦОВ ЛУКА МНОГОЯРУСНОГО *ALLIUM* × *PROLIFERUM* (MOENCH) SCHRAD. EX WILLD. ИЗ КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* ВИР

Пендинен Г.И.^{1*}, Чернов В.Е.²

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; ✉ *pendinen@mail.ru

² Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, 194175, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6 лит. Ж

Актуальность. Лук многоярусный *Allium* × *proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd., 1809 (2n=2x=16) – вид, для которого характерно только вегетативное размножение: воздушными или подземными луковицами. Показано, что образцы этого вида являются гибридами *Allium cepa* и *Allium fistulosum* (Fiskesjo, 1975; Vosa, 1976; Schubert et al., 1983; Puizina, Papes, 1999). В коллекции *in vitro* ВИР сохраняются образцы *A. × proliferum*, которые были получены из разных источников, однако, их родословная нам неизвестна. Поэтому существует необходимость определения уровня пloidности и геномного состава образцов, поддерживаемых в коллекции. **Материал и методы.** В исследовании использовали 13 образцов *A. × proliferum*, сохраняемых в коллекции *in vitro* ВИР. Для характеристики уровня пloidности и геномного состава образцов использовали методы молекулярной цитогенетики: FISH с хромосомоспецифичными маркерами: 5S и 18S/25S рДНК и GISH с дифференциально мечеными ДНК предполагаемых родительских видов: *A. cepa* и *A. fistulosum*. **Результаты.** GISH анализ показал, что все изученные образцы представляют собой гибриды *A. cepa* с *A. fistulosum*. Большая часть (10 из 13 изученных) образцов были определены как диплоидные гибриды, кариотип которых включает восемь хромосом *A. cepa* и восемь хромосом *A. fistulosum*. Образец К 3206 также представляет собой диплоидный 16-ти хромосомный гибрид с восемью хромосомами *A. cepa*, семью – *A. fistulosum* и одной перестроенной хромосомой. Образцы К 3205 и К 3202 представляют собой полиплоидные формы. У *A. × proliferum* К 3202 выявлено семь хромосом *A. cepa* и 16 хромосом *A. fistulosum*, одна из которых имеет локализованную терминально интрогрессию генетического материала *A. cepa*. Для образца К 3205 характерно наличие 16-ти хромосом *A. cepa* и 13 хромосом *A. fistulosum*. У этого образца выявлена только одна хромосома *Allium fistulosum* с локусом 5S рДНК. **Выводы.** Таким образом, в коллекции представлены образцы лука многоярусного, имеющие кариотипические различия.

Ключевые слова: лук многоярусный, *Allium* × *proliferum*, межвидовые гибриды, *in situ* гибридизация.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-3-o2>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

DIVERSITY OF CHROMOSOMAL COMPOSITION IN TOP ONION *ALLIUM* × *PROLIFERUM* (MOENCH) SCHRAD. EX WILLD. ACCESSIONS FROM THE VIR *IN VITRO* COLLECTION

Pendinen G.I.^{1*}, Chernov V.E.²

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia; ✉ *pendinen@mail.ru

² S.M. Kirov Military Medical Academy, 6 Zh, Acad. Lebedev Street, St. Petersburg, 194175, Russia;

Background. Top onion, *Allium* × *proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd., 1809 (2n=2x=16), is a species that is characterized by vegetative propagation by air or underground bulbs only. Accessions of this species have been shown to be hybrids of *Allium cepa* and *Allium fistulosum* (Fiskesjo, 1975; Vosa, 1976; Schubert et al., 1983; Puizina and Papes, 1999). Accessions of *Allium* × *proliferum* were obtained from various sources and conserved in the *in vitro* collection of VIR. However, their pedigree was unknown, therefore there was a need to determine the ploidy level and genomic composition of these accessions. **Materials and Methods.** Thirteen *Allium* × *proliferum* accessions from the VIR *in vitro* collection were studied. To characterize the ploidy level and genomic composition of the accessions, the research employed FISH with chromosome-specific markers (5S and 18S/25S rDNA) and GISH with differentially labeled DNA of the putative parent species, i.e., *A. cepa* and *A. fistulosum*. **Results.** According to GISH, all the studied accessions were hybrids of *A. cepa* and *A. fistulosum*. Most (10 out of 13) accessions were determined as diploid hybrids with eight *A. cepa* and eight *A. fistulosum* chromosomes. The accession K 3206 turned out to be a diploid 16-chromosome hybrid with eight *A. cepa*, seven *A. fistulosum* chromosomes and one rearranged chromosome. Accessions K 3205 and K 3202 were found to be polyploids. The *A. × proliferum* accession K 3202 contained seven *A. cepa* and 16 *A. fistulosum* chromosomes. The accession K 3205 is characterized by the presence of 16 chromosomes hybridizing with *A. cepa* DNA and 13 chromosomes hybridizing with *A. fistulosum* DNA. Only one chromosome of *A. fistulosum* in this accession was revealed to have a 5s rDNA locus. **Conclusions.** The above shows that the collection contains top onion accessions with karyotypic differences.

Key words: top onion, *Allium* × *proliferum*, interspecific hybrids, *in situ* hybridization.

Для цитирования: Пендинен Г.И., Чернов В.Е. Разнообразие хромосомного состава образцов лука многоярусного *Allium* × *proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd. из коллекции *in vitro* ВИР. Биотехнология и селекция растений. 2019;2(3):6-14. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-o2

For citation: Pendinen G.I., Chernov V.E. Diversity of chromosomal composition in top onion (*Allium* × *proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd.) accessions from the VIR *in vitro* collection. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(3):6-14. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-o2

ORCID:

Pendinen G.I. <https://orcid.org/0000-0003-2814-7074>

УДК 575.222.7:635.25/26

Поступила в редакцию: 10.10.2019

Принята к публикации: 17.11.2019

Введение

Лук многоярусный *Allium × proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd., 1809 – многолетнее растение, размножающееся только вегетативно: воздушными или подземными луковицами. Его характерной особенностью является образование на семенных стрелках луковиц вместо цветков в 2, 3 и даже в 4 яруса. Наряду с луковицами, в соцветиях могут формироваться стерильные цветки (Puizina, 2013). В литературе можно встретить этот вид под названиями *A. aobatum* Araki и *A. wakegi* Araki – для образцов восточно-азиатской группы, или *Allium cepa* L. var. *viviparum* (Metzg.) Alef и *A. cepa* var. *proliferum* (Moench) Schrad. – для образцов евразийской группы (Fritsch, Friesen, 2002). Изначально его классифицировали как разновидность лука репчатого (Helm, 1956). Это диплоидный вид ($2n=4x=16$), однако кариотип лука многоярусного является псевдодиплоидным. На основании результатов сравнительного морфологического анализа хромосом *Allium cepa* L. var. *viviparum* (Metzg.) Alef, *A. cepa* L. и *A. fistulosum* L. было выдвинуто предположение о гибридной природе лука многоярусного (Bozzini, 1964). Позднее это было подтверждено в ряде исследований с использованием методов дифференциального окрашивания хромосом (Fiskesjo, 1975; Vosa, 1976; Schubert et al., 1983). Основываясь на данных, подтверждающих гибридную природу лука многоярусного, Шуберт с соавторами вводят название вида *Allium × proliferum* (Moench) Schrad. (Schubert et al., 1983). В дальнейшем при изучении различных образцов посредством геномной *in situ* гибридизации (GISH) и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием в качестве проб (зондов) 5S и 18S рДНК было подтверждено, что лук многоярусный и *A. wakegi* Araki являются межвидовыми гибридами между *A. cepa* L. и *A. fistulosum* L. (Friesen, Klaas, 1998; Puizina, Papes, 1999; Hizume, 1994; Khrustaleva et al., 2010). Анализ разнообразия *A. × proliferum* с использованием пяти систем изоферментов подтвердил гибридную природу этого вида, а также выявил его политопическое происхождение (Maass, 1997).

Лук многоярусный не является столь широко возделываемой и экономически значимой культурой, как лук репчатый *A. cepa* или чеснок *A. sativum*. Тем не менее, культивирование этого многолетнего вида широко распространено на приусадебных и дачных участках в Европе, Северной Америке, Северо-Восточной Азии (Fritsch, Friesen, 2002) для использования в пищу зеленых листьев, которые отрастают, начиная с весны и до осенних холодов. Это холодостойкая культура, выдерживающая мороз до 45 градусов под снежным покровом без дополнительного укрытия (Avrov, 1961). Один из родителей лука многоярусного – лук батун *A. fistulosum* является источником ряда ценных признаков, таких как устойчи-

вость к ряду патогенов, таких как возбудители антракноза *Colletotrichum gloeosporioides* (Galvan et al, 1997), листовой гнили *Botrytis squamosa* (Curran, Maude, 1984), розовой корневой гнили *Purenjchaeta terrestris* (Netzer et al, 1985). Поэтому батун привлекают в межвидовые скрещивания с луком репчатым. Описаны формы, полученные на основе межвидовых гибридов, обладающие устойчивостью к таким патогенам, как возбудитель пероноспороза *Peronospora destructor*, возбудитель стеμφилиоза лука *Stemphylium vesicarium*, полученные на основе межвидовых гибридов (Budylin et al., 2014; Kudryavtseva et al., 2019).

Существуют данные о получении растений, сходных с луком многоярусным, в экспериментах по межвидовой гибридизации. Так, Ершов и Юрьева сообщают, что при скрещивании *A. vavilovii* с *A. fistulosum* среди растений F_1 была выявлена форма, сходная по фенотипическим характеристикам с луком многоярусным: на стрелках образовывались воздушные луковицы, цветки в соцветиях не развивались, в последующих вегетативных поколениях признаки многоярусного лука сохранялись (Ershov, Yureva, 1985). В этой же публикации авторы приводят информацию о выявлении растения с признаками лука многоярусного среди растений поколения F_3 гибрида лука репчатого и батун. У форм, выщепляющихся в поколениях более поздних, чем F_1 , и фенотипически схожих с луком многоярусным, кариотип может претерпеть изменения.

В коллекции *in vitro* ВИР сохраняются образцы *A. × proliferum*, которые были получены из разных источников, однако, их родословная нам неизвестна. Целью нашей работы было изучение разнообразия геномного и хромосомного состава образцов лука многоярусного *A. × proliferum* (Moench) Schrad. из коллекции *in vitro* ВИР с использованием методов молекулярной цитогенетики.

Материалы и методы.

В работе были исследованы 13 образцов лука многоярусного *A. × proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd. 1809, 11 из которых были получены из полевой коллекции ВИР, введены и сохраняются в *in vitro* с 2003 г., 1 – собран на территории республики Марий Эл, около города Йошкар-Ола, где культивировался на садовом участке более 30 лет, в культуре *in vitro* с 2014 г.; 1 – из Германии, в культуре *in vitro* с 2018 г. Используемые в работе образцы лука из коллекции *in vitro* представлены в таблице 1.

Образцы *Allium cepa* К 5320 и *Allium fistulosum* Русский зимний (К 3244) использовали для получения меченых проб ДНК родительских геномов для GISH экспериментов. Растения лука-батун получены из семян и выращены в почвенной культуре.

Таблица 1. Образцы *Allium* из коллекции *in vitro* ВИР, использованные в исследовании

Table 1. Studied *Allium* accessions from the VIR *in vitro* collection.

№ п/п	Вид	№ по каталогу	Происхождение	Год введения в культуру <i>in vitro</i>
1	<i>A. × proliferum</i>	3202	Сибирский ботанический сад	2003
2	<i>A. × proliferum</i>	3203	Ленинградская область (ЛСХИ)	2003
3	<i>A. × proliferum.</i>	3204	Ленинградская область	2003
4	<i>A. × proliferum</i>	3205	Ленинградская область	2003
5	<i>A. × proliferum</i>	3206	Алтайский край.	2003
6	<i>A. × proliferum</i>	3207	Ленинградская область	2003
7	<i>A. × proliferum</i>	3208	Ленинградская область	2003
8	<i>A. × proliferum</i>	3209	Алтайский край	2003
9	<i>A. × proliferum</i>	3210	Краснодарский край	2003
10	<i>A. × proliferum</i>	3211	Ленинградская область, завезен из Омской области	2003
11	<i>A. × proliferum</i>	3212	Ленинградская область	2003
12	<i>A. × proliferum</i>	И: o157901	Республика Марий Эл, Россия,	2014
13	<i>A. × proliferum</i>	И: 632061	Германия, Мекленбург - Передняя Померания	2018
14	<i>A. cepa ssp. ascalonicum</i>	5320	Алтайский край	2004

Растения образцов лука многоярусного высаживали из культуры *in vitro* в почву и выращивали в условиях естественных фотопериода и температуры в весенне-летний период. Для анализа использовали по 3 растения каждого образца.

Фиксация материала и подготовка препаратов митотических хромосом. Для цитогенетического анализа корешки укорененных в почве растений помещали в воду со льдом (0°C) на сутки, затем в фиксатор 3:1 (96% этиловый спирт: ледяная уксусная кислота), фиксации хранили в морозильнике (-20°C) до использования. Для цитогенетического анализа готовили давленные препараты из корневой меристемы, обработанной в течение 50 мин. раствором мацерирующих ферментов, содержащим целлюлазу (1,07 U/mg, Sigma, Cellulase c22178, Япония) в концентрации 40 мг/мл и пектолиазу (0,94 U/mg, Sigma, Pectolyase p3026, Япония) в концентрации 10 мг/мл.

Подготовка ДНК. ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum* выделяли по протоколу Бернатского и Тенксли (Bernatzky, Tanksley, 1986).

Геномную ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum* и плазмидную ДНК, несущую 18S/25S рДНК (зонд Ver17) (Yakura, Tanifuji, 1983) метили методом Nick – трансляции с использованием DIG-Nick Translation Mix и Bio-Nick Translation Mix (Roche Diagnostics); меченую биотином 5S рДНК получали методом ПЦР с использованием праймеров согласно Gottlob-McHugh с соавторами (Gottlob-McHugh et al., 1990).

Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH, GISH). Флюоресцентную *in situ* гибридизацию проводили,

взяв за основу стандартные методики (Leitch et al, 1994; Pendinen et al, 2008).

FISH с дифференциально мечеными 18S/25S (DIG) и 5S (BIO) рДНК провели для определения их числа и локализации на митотических хромосомах лука многоярусного. Затем для идентификации геномной принадлежности хромосом на тех же препаратах провели GISH с дифференциально мечеными ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum*. В двухцветной GISH-FISH для детекции биотиновой пробы использовали streptavidin–Cy3 (CyTM-conjugated Streptavidin, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Dianova) в концентрации 6 ng/μl, для детекции дигоксигениновой метки – Anti Digoxigenin-Fluorescein (Roche Diagnostics) в концентрации 6 ng/μl. Хромосомы контрастировали раствором DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1.0 ng/μl).

Анализ препаратов и создание изображений проводили с использованием эпифлюоресцентного микроскопа AxioImager M2 с камерой AxioCamMRm и программным обеспечением AxioVision Rel 4.8.(ZEISS, Германия)

Результаты

Анализ хромосомного состава образцов лука многоярусного из коллекции *in vitro* ВИР с использованием FISH и хромосомспецифичных маркеров (5S и 18/25S рДНК) и GISH с дифференциально мечеными ДНК предполагаемых родительских видов выявил их гибридную природу.

В геноме родительских видов сайты 18S/25S рДНК локализованы терминально в коротких плечах двух пар хромосом (хромосомы 6 и 8) генома *A. cepa* (рисунк 1а, в, г), одна из которых со спутником (хромосома 6,

рис.1в), и в коротком плече одной пары спутничных хромосом *A. fistulosum* (рис. 1д, ж), сайты 5S рДНК, локализованы в коротких плечах 7-й хромосомы: *A. cepa* (2 сайта, рис. 1б) и *A. fistulosum* (1 сайт) (рис. 1д, е).

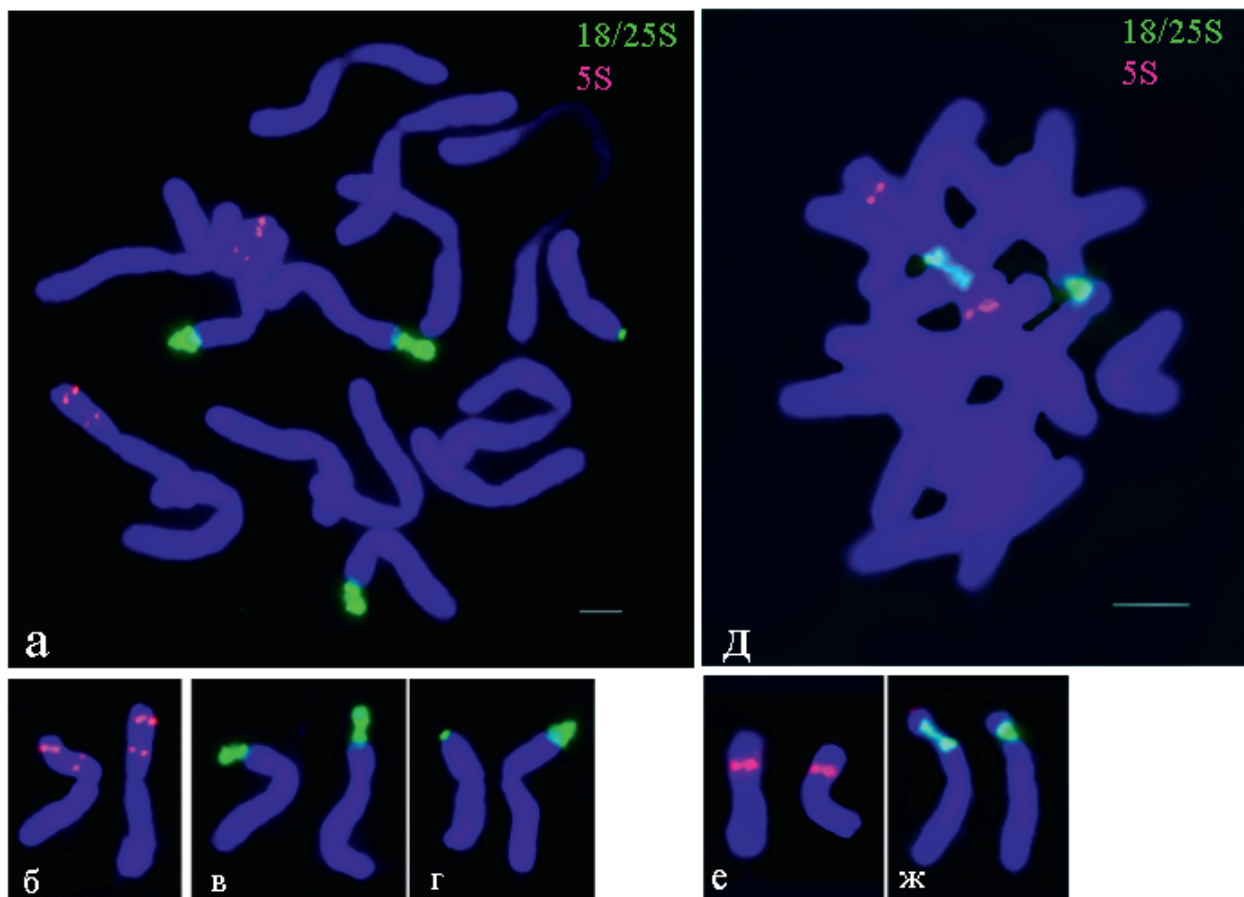


Рис. 1. Локализация маркеров 5S 18/25S рДНК на митотических хромосомах *A. cepa* (а – г) и *A. fistulosum* (д – е). а – FISH с хромосомами *A. cepa* (К 5320) – идентифицированы: б – пара хромосом 7 с двойным 5S маркером в коротком плече, в – пара хромосом 6 с сателлитом в коротком плече, г – пара хромосом 8 с 18/25S маркером в коротком плече; д – FISH с хромосомами *A. fistulosum* Русский зимний: е – пара хромосома 7 с одним 5S маркером в коротком плече, ж – пара хромосом с сателлитом в коротком плече.

Fig. 1. Localization of 5S and 18/25S rDNA markers on mitotic chromosomes of *A. cepa* (а – г) and *A. fistulosum* (д – е). а – FISH with *A. cepa* (k-5320) chromosomes; identified: б – chromosome 7 pairs with a double 5S marker on the short arm, в – chromosome 6 pair with a satellite on the short arm, г – chromosome 8 pair with 18/25S marker on the short arm; д – FISH with *A. fistulosum* (cv. Russkii zimnii) chromosomes: е – chromosome 7 pair with one 5S marker on the short arm, ж – pair of chromosomes with a satellite on the short arm.

GISH анализ показал, что все изученные образцы *A. × proliferum* представляют собой межвидовые гибриды *A. cepa* с *A. fistulosum* (таблица 2, рисунки 2 – 4), однако, было выявлено некоторое разнообразие кариотипов и уровня пloidности.

Большая часть образцов *A. × proliferum* – 10 из 13 пред-

ставляют собой гибриды ($2n=2x=16$), в кариотипе которых выявлены по восемь хромосом родительских видов (табл. 2, рис. 2, б, и). У семи из них (К 3204; К 3208; К 3210; К 3211; К 3212; К 3209; И:632061) число и распределение на хромосомах маркеров рДНК соответствует этой характеристике родительских видов (рис. 2., а – ж).

Таблица 2. Характеристика хромосомного состава образцов *A. × proliferum* из коллекции *in vitro* ВИР
Table 2. Details of chromosome composition of *A. × proliferum* accessions from the VIR *in vitro* collection

Образцы	Число хромосом				Хромосом с маркером			
	всего	<i>cepa</i> *	<i>fist</i> **	<i>cepa/fist</i>	18S/25S		5S	
					<i>cepa</i>	<i>fist</i>	<i>cepa</i>	<i>fist</i>
К 3204; К 3208; К 3210; К 3211; К 3212; К 3209; И:632061	16	8	8	0	2	1	1	1
К 3202; К 3207; И:о157901	16	8	8	0	3	1	1	1
К 3206	16	8	7	1	2	1	1	1
К 3205	29	16	13	0	4	2	2	1
К 3203	23	7	15	1***	3+1***	4	1	2
<i>A. cepa</i> ssp. <i>ascalonicum</i> К 5320	16	16	-	-	4	-	2	-
<i>A. fistulosum</i> К 3244	16	-	16	-	-	2	-	2

* - *A. cepa*; ** - *A. fistulosum*, *** - хромосома *A. fistulosum* с небольшой терминальной интрогрессией *A. cepa*, несущей 18S/25S маркер.

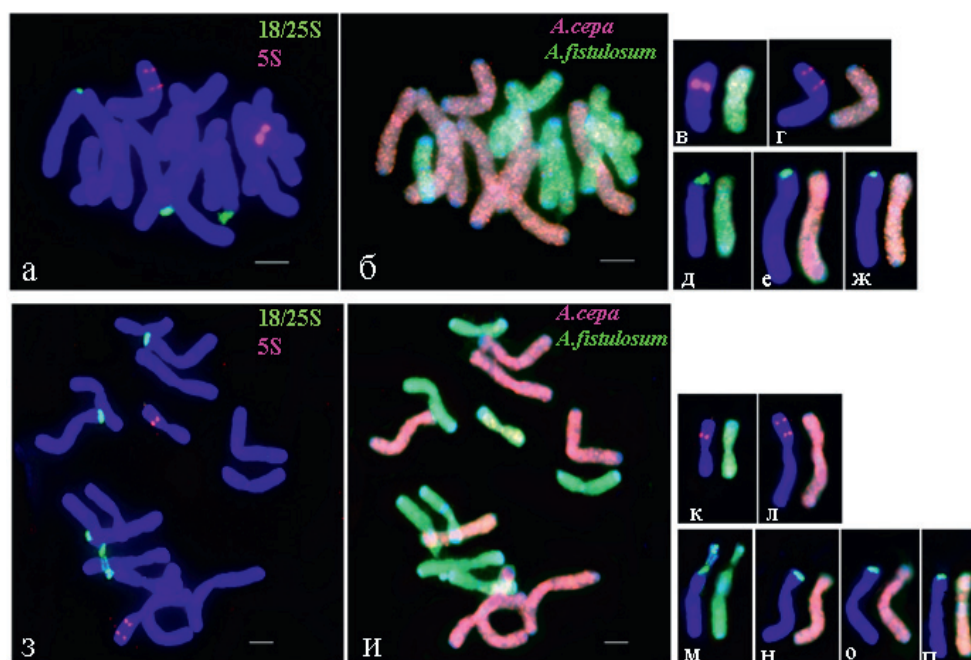


Рис. 2. FISH с маркерами 5S и 18/25S рДНК и GISH с геномными ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum* митотических хромосом диплоидных образцов *A. × proliferum* (а – ж) – К 3212: а – результат FISH с 5S и 18/25S маркерами, б – та же клетка после GISH; в, г – хромосомы 7 с 5S маркером геномов *A. fistulosum* и *A. cepa* соответственно, д – е – хромосомы с маркером 18/25S – спутничная хромосома *A. fistulosum* (д) и 2 хромосомы *A. cepa* (е, ж), одна из которых хромосома 6 – спутничная (е). (з – п) – И:о157901: з – результат FISH с 5S и 18/25S хромосомными маркерами, и та же клетка после GISH; к, л – хромосомы 7 с 5S маркером хромосом *A. fistulosum* и *A. cepa* соответственно; м – п хромосомы с маркером 18/25S – спутничная хромосома *A. fistulosum* (м) и три хромосомы *A. cepa* (н – п), одна из которых хромосома 6 – спутничная (н).

Fig. 2. FISH with 5S and 18/25S rDNA markers and GISH with genomic DNA *A. cepa* and *A. fistulosum* mitotic chromosomes of labeled accessions *A. × proliferum* (a – ж) – k-3212: a – the result of FISH with 5S and 18/25S markers, б – the same cell after GISH; в, г – chromosomes 7 with 5S marker of *A. fistulosum* and *A. cepa* genomes, respectively; д – е – chromosomes with 18/25S marker – satellite chromosome of *A. fistulosum* (д) and two *A. cepa* chromosomes (е, ж), one of which i.e., chromosome 6, is a satellite chromosome (е). (з – п) – I:о157901: з – the result of FISH with 5S and 18/25S chromosome markers, and the same cell after GISH; к, л – chromosomes 7 with 5S marker of *A. fistulosum* and *A. cepa*, respectively; м – п – chromosomes with 18/25S marker – satellite chromosome of *A. fistulosum* (м) and 3 chromosomes of *A. cepa* (н – п), one of which, i.e., chromosome 6, is a satellite chromosome (н).

У перечисленных семи образцов сайты 18S/25S рДНК локализованы терминально в коротких плечах двух хромосом *A. cepa* (рис. 2, а, е, ж) и в одной хромосоме *A. fistulosum* (рис. 2, а, г), сайты 5S рДНК выявлены у *A. cepa* в одной хромосоме (2 сайта, рис. 2, г) и в одной хромосоме *A. fistulosum* (1 сайт, рис. 2, в). У трех образцов (К 3202, К 3207, И:о157901), наряду с 18S/25S маркером в двух хромосомах, дополнительно выявлена еще одна хромосома с этим маркером, локализованным терминально в коротком плече одной из субметацентрических хромосом *A. cepa* (рис. 2, н – п). Число и локализация марке-

ра 5S рДНК у этих форм также сходны с родительскими видами (табл. 2, рис. 2, к, л), причем у образца И:о157901 были изучены как растения из культуры *in vitro*, так и растения исходного клона, все время культивируемые *in vivo*. Кариотипические характеристики обеих форм совпали.

У всех трех изученных растений одного из диплоидных образцов лука многоярусного ($2n = 2x = 16$) (К 3206) выявлено восемь хромосом *A. fistulosum*, семь хромосом *A. cepa* и одна рекомбинантная хромосома *A. fistulosum/A. cepa*, в которой генетический материал *A. cepa*, охватывает большую часть одного из плеч (рис. 3, а, в).

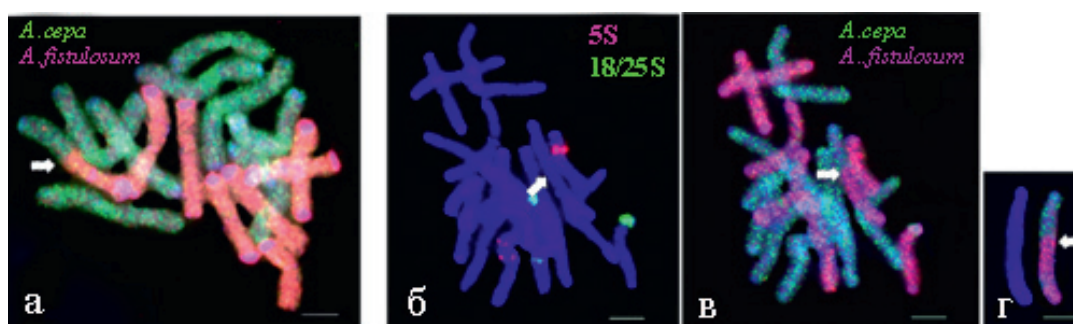


Рис. 3. GISH с геномными ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum* различных растений и FISH с маркерами 5S и 18/25S рДНК диплоидного образца *A. × proliferum* К 3206. а – GISH хромосом растения 1 с дифференциально мечеными ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum*; б, в – FISH хромосом растения 2 и та же клетка после GISH соответственно; г – перестроенная хромосома генома *A. fistulosum* с интрогрессией генетического материала *A. cepa*.

Fig. 3. GISH with genomic DNA of *A. cepa* and *A. fistulosum* of different plants and FISH with 5S and 18/25S diploid rDNA probes on *A. × proliferum* accession К 3206. а – GISH of plant 1 chromosomes with differentially labeled *A. cepa* and *A. fistulosum* DNA; б, в – FISH of plant 2 chromosomes and the same cell after GISH, respectively; г – rearranged chromosome of the *A. fistulosum* genome with introgression of *A. cepa* genetic material.

Число и распределение на хромосомах сайтов гибридизации с зондами 18S/25S, 5S рДНК соответствуют этим характеристикам родительских видов. Перестроенная хромосома не несет этих сайтов (рис. 3, б – г).

Два образца, в кариотипе которых также выявлены хромосомы *A. cepa* и *A. fistulosum*, отличаются по числу родительских хромосом от типичных представителей лука многоярусного (рисунок 4).

У *A. × proliferum* К 3203 выявлено семь хромосом *A. cepa* и 16 хромосом *A. fistulosum*, одна из которых несет терминальную интрогрессию генетического материала *A. cepa* в длинном плече (рис. 4, б). В четырех хромосомах *A. cepa* выявлены сайты 18S/25S рДНК: в хромосоме 6 – спутничной – хорошо идентифицируемый в терминальной части короткого плеча – в районе спутника, и терминально расположенные минорные сайты в коротких плечах трех хромосом (рис. 4, а, д, е). В коротком плече хромосомы 7 *A. cepa*, как и у родительского вида, выявлены два сайта 5S рДНК (рис. 4, а, в). Среди хромосом *A. fistulosum* выявлена пара спутничных хромосом (хромосома 8), несущих сайты 18S/25S рДНК (рис. 4, а, ж). Кроме того, в коротком плече еще одной из хромосом *A. fistulosum* выявлен терминально лока-

лизированный минорный сайт 18S/25S рДНК (рис. 4, з). В одной паре хромосом локализован сайт 5S рДНК (рис. 4, г). Расположение 5S маркера на обеих хромосомах 7 *A. fistulosum* соответствует этой характеристике родительского кариотипа, но гомологичные хромосомы различаются размерами сайтов гибридизации с зондом 5S рДНК (рис. 4, г). В длинном плече одной из субметацентрических хромосом выявлена терминально расположенная интрогрессия генетического материала *A. cepa* с терминальным минорным маркером 18/25S в интрогрессированном фрагменте (рис. 4, и).

Образец К 3205 представляет собой близкую к тетраплоидной форму с 16 хромосомами *A. cepa* и 13 хромосомами *A. fistulosum* (рис. 4, л). Среди хромосом *A. cepa* этого образца, как и у родительского вида, идентифицированы две пары хромосом (шестой – спутничной и восьмой) с терминально локализованными в коротких плечах сайтами 18S/25S рДНК (рис. 4, к, о) и пара хромосом 7 с двумя сайтами 5S рДНК в коротком плече (рис. 4, м). Среди хромосом *A. fistulosum* выявлена пара спутничных хромосом, несущих сайт 18S/25S рДНК (рис. 4, к, р) и лишь одна хромосома 7 с сайтом 5S рДНК в коротком плече (рис. 4, к, н).

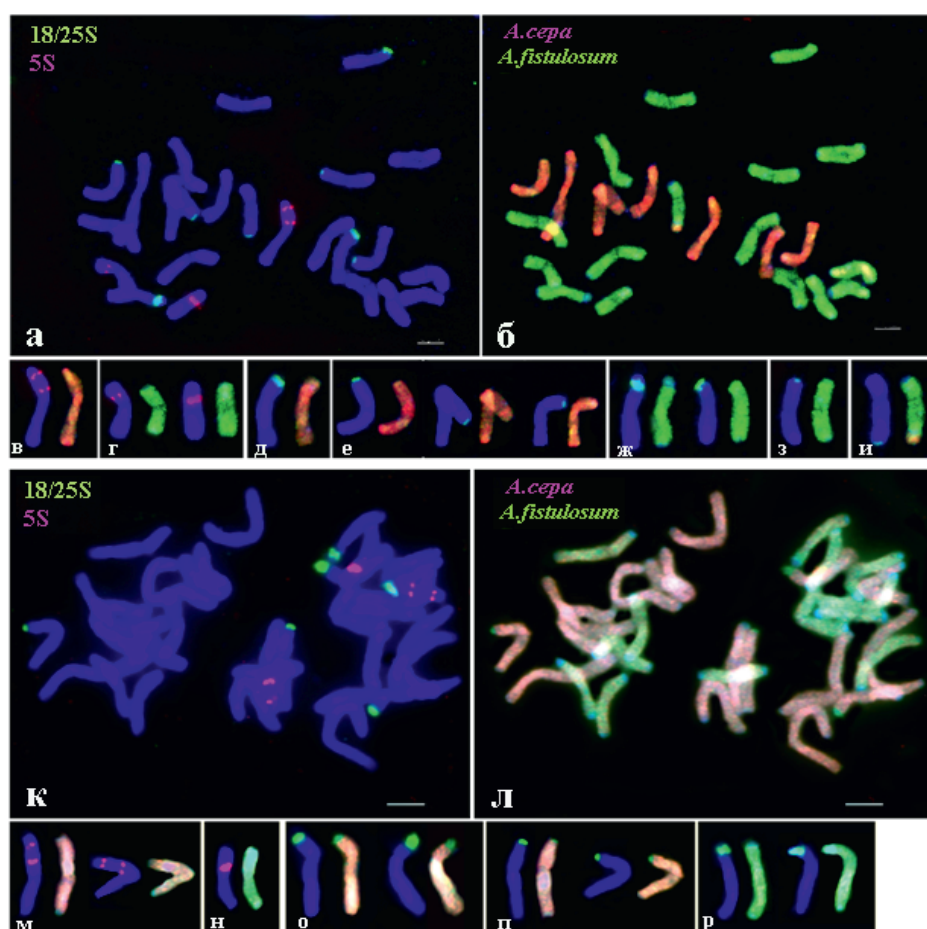


Рис. 4. FISH с использованием зондов 5S и 18/25S рДНК и GISH с геномными ДНК *A. cepa* и *A. fistulosum* применительно к образцам *A. × proliferum* с отличным от диплоидного числом хромосом. (а – и) – К 3203 ($2n=23$): а – FISH с 5S и 18/25S хромосомными маркерами, б – та же клетка после GISH – 7 хромосом *A. cepa* и 16 *A. fistulosum*, в, г – одна хромосома 7 *A. cepa* и две хромосомы *A. fistulosum* соответственно; д – е – хромосомы с маркером 18/25S у *A. cepa* – одна спутничная хромосома 6 (д) и три хромосомы с минорными терминально локализованными маркерами (е) *A. fistulosum* – пара спутничных хромосом (ж), хромосома с минорным теломерно локализованным маркером (з, и), и – хромосома *A. fistulosum* с интрогрессией генетического материала и минорным 18/25S маркером в интрогрессированном фрагменте; (к – п) – К 3205 ($2n=29$): к – FISH с 5S и 18/25S хромосомными маркерами, л – та же клетка после GISH – 16 хромосом *A. cepa* и 13 *A. fistulosum*; м, н – две хромосомы 7 *A. cepa* и одна *A. fistulosum* соответственно; о – п – три пары хромосом с маркером 18/25S: две *A. cepa* (о, п), одна из них спутничная (о), одна пара спутничных хромосом *A. fistulosum* (п).

Fig. 4. FISH with 5S and 18/25S rDNA as probes and GISH with genomic DNA from *A. cepa* and *A. fistulosum* as applied to *A. × proliferum* accessions with polyploid chromosome numbers. (а – и) – К 3203 ($2n=23$): а – FISH with 5S and 18/25S chromosome markers, б – the same cell after GISH – seven *A. cepa* and 16 *A. fistulosum* chromosomes, в, г – one chromosome 7 of *A. cepa* and two *A. fistulosum* chromosomes, respectively; д – е – of *A. cepa* chromosomes with 18/25S marker – one satellite chromosome 6 (д) and three chromosomes with minor telomeric markers (е); *A. fistulosum* chromosomes – a pair of satellite chromosomes (ж), a chromosome with a minor telomeric marker (з, и), и – *A. fistulosum* chromosome with introgression of genetic material and a minor 18/25S marker in the introgressed fragment; (к – п) – к-3205 ($2n=29$): к – FISH with 5S and 18/25S markers, л – the same cell after GISH – 16 *A. cepa* and 13 *A. fistulosum* chromosomes; м, н – two chromosomes 7 of *A. cepa* and one *A. fistulosum* chromosome, respectively; о – п – three pairs of chromosomes with 18/25S marker: two *A. cepa* chromosomes (о, п), one of them satellite (о), and one pair of satellite chromosomes of *A. fistulosum* (п).

Обсуждение

Результаты анализа локализации сайтов рДНК образцов видов – носителей родительских геномов лука многоярусного *A. × proliferum* согласуются с литературными данными (Sato, 1981; Ricroch et al., 1992; Do et al., 2001; Gernand et al., 2007). Среди исследованных нами образцов лука многоярусного выявлены формы (К 3202, К 3207, И:о157901) с локализацией 18/25S рДНК в трех хромосомах *A. cepa*, одна из которых спутничная и две с терминальными минорными сайтами. Однако, как свидетельствуют результаты ряда авторов, у этого вида сайты 18S/25S рДНК локализованы в коротких плечах только двух пар хромосом (хромосомы 6- и 8) у *A. cepa*, одна из которых спутничная (Sato, 1981; Ricroch et al., 1992; Do et al., 2001; Gernand et al., 2007). Выявление дополнительного минорного сайта 18/25S рДНК у этих образцов не является следствием изменений кариотипа при культивировании в условиях *in vitro*, поскольку для растений клона И:о157901, культивируемого *in vivo*, и того же образца после культивирования *in vitro* эти характеристики совпадают. Возможно, у лука репчатого существует полиморфизм количества минорных сайтов гибридизации с зондами 18/25S рДНК, и различное их количество у образцов лука многоярусного обусловлено полиморфизмом по этому признаку у родительских форм *A. cepa*.

У одного из диплоидных 16-ти хромосомных образцов – К 3206 – выявлена одна рекомбинантная хромосома *A. cepa*. Происхождение такой перестроенной хромосомы у этой формы не вполне понятно. Следует предположить, что эта форма еще до введения в культуру *in vitro* несла перестроенную хромосому, поскольку, при поддержании и размножении *in vitro* микроклонирование осуществляется, как и в естественных условиях, путем образования адвентивных почек. Образования каллуса, в процессе которого могут возникать изменения кариотипа, при этом не происходит. Можно предположить, что исходный гибрид не являлся луком многоярусным, лишенным способности к образованию цветков. Зародыш мог образоваться из неоплодотворенной яйцеклетки с диплоидным набором хромосом, явившейся следствием отсутствия редукции числа хромосом в первом делении мейоза. В таком случае рекомбинантных хромосом, составленных из генетического материала обоих родительских видов, было бы две – одна от *A. cepa*, а другая от *A. fistulosum*. Однако у образца К 3206 нами выявлена только одна такая хромосома. Исходя из данных литературы, может быть предложена следующая гипотеза возникновения диплоидного гибрида с одной рекомбинантной хромосомой. Для гибридов *A. cepa* с *A. fistulosum* описана спонтанная полиплоидизация (Levan, 1941; Budylin et al., 2014). Тетраплоидные формы могут быть фертильными и давать семена. Возврат к диплоидному состоянию у таких растений мог быть результатом гаплоидного апомиксиса, например, развития зародыша из не-

оплодотворенной яйцеклетки. Такой зародыш мог иметь одну хромосому, составленную из генетического материала обоих родительских видов. Эта форма, из-за изменения ее геномного состава, могла приобрести свойства лука многоярусного. В литературе есть информация о выявлении растения с признаками лука многоярусного среди растений поколения F_3 гибрида лука репчатого и батуна (Ershov, Yureva, 1985).

Среди изученных нами образцов были выявлены две полиплоидные формы лука многоярусного: К 3203 ($2n = 23$) и К 3205 ($2n = 29$). Для 23-хромосомного гибрида К 3203 характерно наличие семи хромосом *A. cepa* и диплоидного набора хромосом *A. fistulosum*, причем FISH с 5S рДНК выявил различие в размерах сайтов гибридизации этого зонда у разных гомологов хромосомы 7 *A. fistulosum*. Это позволяет предположить, что 23-хромосомный триплоидный гибрид был получен либо с участием нередуцированной ($2n$) гаметы батуна, либо это растение получено при беккроссировании гибрида пыльцой *A. fistulosum*. У этого растения выявлена одна хромосома *A. fistulosum* с интрогрессией генетического материала *A. cepa*. Среди хромосом *A. cepa* выявлено четыре хромосомы с сайтами гибридизации зонда 18/25S рДНК. Хромосомный состав этого образца требует более детального изучения с идентификацией индивидуальных хромосом. Исследованный нами образец К 3205 ($2n = 4x - 3 = 29$) представляет собой гипоплоидный тетраплоид с шестнадцатью хромосомами *A. cepa* и тринадцатью *A. fistulosum*.

Для объяснения возникновения полиплоидных форм нужно обратиться к результатам, изучения экспериментально полученных форм от скрещиваний *A. cepa* и *A. fistulosum* (Budylin et al., 2014; Kudryavtseva et al., 2019). Триплоидные формы ($2n = 3x = 24$) были выявлены в F_2 экспериментально полученных гибридов в этой комбинации скрещивания, одно растение имело гаплоидный набор хромосом *A. cepa* и диплоидный *A. fistulosum*, у двух, наоборот, идентифицированы восемь хромосом *A. fistulosum* и шестнадцать *A. cepa* (Budylin et al., 2014). Кроме того, в различных поколениях в потомстве гибридов были выявлены 32-х хромосомные тетраплоиды с диплоидными наборами хромосом родительских видов, среди которых встречались формы с рекомбинантными хромосомами, а также 30-ти хромосомное растение с 16-ю хромосомами *A. cepa* и 14-ю хромосомами *A. fistulosum* ($2n = 4x - 2 = 30$) (Budylin et al., 2014; Kudryavtseva et al., 2019). Все эти формы были получены спонтанно без искусственного удвоения числа хромосом. Механизм полиплоидизации неясен. Авторы предполагают, что полиплоидные формы могли произойти в результате отсутствия редукции числа хромосом в мейозе и участия в образовании зиготы нередуцированных гамет. Другой возможной причиной мог быть факультативный апомиксис. Это предположение связано с наличием такого типа размножения у ряда видов лука, например, у *A. tuberosum*, *A. ramosum* (Yamashita et al, 2012; Kojima,

Nagato, 1992). Также одним из возможных механизмов, как предполагают авторы, мог быть цитомиксис в материнских клетках пыльцы.

Заключение

С использованием методов молекулярной цитогенетики (GISH, FISH с зондами 5S и 18/25S рДНК) охарактеризован геномный состав образцов лука многоярусного *Allium × proliferum* из коллекции *in vitro* ВИР. Показано, что в коллекции представлены образцы лука многоярусного, имеющие кариотипические различия. Выявлены как типичные для *Allium × proliferum* аллодиплоидные формы (2n = 2x = 16), гибридный геном которых включает восемь хромосом *A. cepa* и восемь хромосом *A. fistulosum*, так и формы с хромосомными перестройками (К 3206, К 3203) и отличающиеся от *Allium × proliferum* уровнем плоидности (К 3205 и К 3203).

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0662-2019-0004.

References/Литература

- Avrov N.N. Top onions and chives (Mnogoyarusnyi luk i shnitt-luk). Leningrad: Lenizdat; 1961. 44 p. [in Russian] (Авров Н.Н. Многоярусный лук и шнитт-лук. Ленинград: Лениздат. 1961. 44 с.)
- Bernatzky R., Tanksley S.D. Genetics of actin-related sequences in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 1986;72:314-324. DOI: 10.1007/BF00288567
- Bozzini A. On the karyotype of a viviparous onion, known as *Allium cepa* L. var. *viviparum* (Metzg.) Alef. *Caryologia.* 1964;17(2):459-464. DOI:10.1080/00087114.1964.10796142
- Budylin M.V., Kan L.Yu., Romanov V.S., Khrustaleva L.I. GISH study generation of the interspecific hybrids between *Allium cepa* L. and *Allium fistulosum* L. with relative resistance to downy mildew. *Russian Journal of Genetics.* 2014;50(4):387-394. DOI:10.1134/s0022795414040036
- Curran L., Maude R.B. Laboratory tests for leaf resistance to *Botrytis squamosa* in onions. *Annals of Applied Biology.* 1984;105:277-283. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1984.tb03051.x
- Do S.D., Seo B.B., Yamamoto M., Suzuki G., Mukai Y. Identification and chromosome location of tandemly repeated DNA sequences in *Allium cepa*. *Genes Genet. Syst.* 2001;76:53-60. DOI: 10.1266/ggs.76.53
- Ershov I.I., Yureva N.A. Case of experimental production of top onion as a result of interspecific hybridization (Sluchay eksperimental'nogo polucheniya mnogoyarusnogo luka v rezultate mezhvidovoy gibrizatsii). In: *Sbornik nauchnykh trudov VNII selektsii i semenovodstva ovoshchnykh kul'tur.* 1985;20:117-119. [in Russian] (Ершов И.И., Юрьева Н.А. Случай экспериментального получения многоярусного лука в результате межвидовой гибридизации. В кн.: Сборник научных трудов ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур. 1985;20:117-119.
- Fiskesjo G. Chromosomal relationships between three species of *Allium* as revealed by C-banding. *Hereditas.* 1975;81:23-32. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1975.tb01010.x
- Friesen N., Klaas M. Origin of some minor vegetatively propagated *Allium* crops studied with RAPD and GISH. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 1998;45:511-523. DOI: 10.1023/A:1008647700251
- Fritsch R.M., Friesen N. I. Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabinowitch HD, Curran L (ed.) *Allium crop science: recent advances.* CABI Publishing; 2002. p.5-30.
- Galvan G.A., Wietsma W.A., Putrasamedja S., Permadi A.H., Kik C. Screening for resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) in *Allium cepa* and its wild relatives. *Euphytica.* 1997;95:173-178. DOI: 10.1023/A:1002914225154
- Gernand D., Golezyk H., Twan R., Ilnicki T., Houben A., Joachimiak A.J. Tissue culture triggers chromosome alterations, amplification, and transposition of repeat sequences in *Allium fistulosum*. *Genome.* 2007;50:435-442. DOI: 10.1139/G07-023
- Gottlob-McHugh S., Levesque M., MacKenzie K., Olson M., Yaro-sh O., Johnson D. Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5SrDNA repeat structure in higher plants. *Genome.* 1990;33:486-494. DOI: 10.1139/g90-072
- Helm J. Die zu Würz- und Speisewecken kultivierten Arten der Gattung *Allium* L. *Kulturpflanze.* 1956;4:130-180 [In German]. DOI: 10.1007/BF02095412
- Hizume M. Allopolyploid nature of *Allium wakegi* Araki revealed by genomic *in situ* hybridization and localization of 5S and 18S rDNAs. *Japanese Journal Genet.* 1994;69:407-415. DOI: 10.1266/jgg.69.407
- Leitch A., Schwarzacher T., Jason D., Leitch I. *In situ Hybridization: a Practical Guide.* Oxford: BIOS; 1994.
- Kojima A., Nagato Y. Diplosporous embryo-sac formation and the degree of diplospory in *Allium tuberosum*. *Sexual Plant Reproduction.* 1992;5(1):72-78. DOI: 10.1007/BF00714560
- Khrustaleva L.I., Kan L.Yu., Kirov I.V., Salmik A.A. Molecular cytogenetic analysis of natural and synthetic hybrids *A. fistulosum* × *A. cepa* (Molekulyarno-tsitogeneticheskiy analiz yestestvennykh i sinteticheskikh gbridov *A. fistulosum* × *A. cepa*). *News TSHA (Izvestiya TSKHA).* 2010;29:12-20. [in Russian] (Хрусталева Л.И., Кан Л.Ю., Киров И.В., Сальник А.А. Молекулярно-цитогенетический анализ естественных и синтетических гибридов *A. fistulosum* × *A. cepa*. Известия ТСХА. 2010;29:12-20.
- Kudryavtseva N., Havey M.J., Black L., Hanson P., Sokolov P., Odintsov L., Divashuk M., Khrustaleva L. Cytological evaluations of advanced generations of interspecific hybrids between *Allium cepa* and *Allium fistulosum* showing resistance to *Stemphylium vesicarium*. *Genes.* 2019;10:195. DOI: 10.3390/genes10030195
- Levan A. The cytology of the species hybrid *Allium cepa* × *Allium fistulosum* and its polyploidy derivatives. *Hereditas.* 1941;27:253-272. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1941.tb03260.x
- Maass H. Genetic diversity in the top onion, *Allium × proliferum* analysed by isozymes. *Pl. Syst. Evol.* 1997;208:35-44. DOI: 10.1007/BF00986081
- Netzer D., Rabinowitch H.D., Weintal C.H. Greenhouse technique to evaluate onion resistance to pink root. *Euphytica.* 1985;34:385-391. DOI: 10.1007/BF00022933
- Pendinen G., Gavrilenko T., Jiang J., Spooner D.M. Allopolyploid speciation of the Mexican tetraploid potato species *Solanum stoloniferum* and *S. hjertingii* revealed by genomic *in situ* hybridization. *Genome.* 2008;51:714-720. DOI: 10.1139/G08-052
- Puizina J. Shallots in Croatia – genetics, morphology and nomenclature. *Acta Bot. Croat.* 2013;72(2):387-398. DOI: 10.2478/botcro-2013-0016
- Puizina J., Papes D. Classical and molecular cytogenetic studies of top onion, *Allium × proliferum* (Moench) Schrader. *Acta Botanica Croatia.* 1999;58: 65-77.
- Ricroch A., Peffley E.B., Baker R.J. Chromosomal location of r DNA *Allium*: *in situ* hybridization using biotin- and fluorescein-labelled probe. *Theor. and Appl. Genet.* 1992;83:413-418. DOI: 10.1007/BF00226528
- Sato S. Cytological studies on the satellite chromosomes of *Allium cepa*. *Caryologia.* 1981;34: 431-440. DOI: 10.1080/00087114.1981.10796911
- Schubert I., Ohne H., Hanelt P. Phylogenetic conclusion from Giemsa banding and NOR staining in top onions (*Liliaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 1983;143:245-256. DOI: 10.1007/BF00986607
- Vosa C.G. Heterochromatic patterns in *Allium*. I. The relationship between the species of the *Cepa* group and its allies. *Heredity.* 1976;36:383-392. DOI: 10.1038/hdy.1976.45
- Yakura K., Tanifuji S. Molecular cloning and restriction analysis of Eco RI-fragments of *Vicia faba* rDNA. *Plant Cell Physiol.* 1983;24:1327-1330. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076650
- Yamashita K., Nakazawa Y., Namai K., Amagai M., Tsukazaki H., Wako T., Kojima A. Modes of inheritance of two apomixis components, diplospory and parthenogenesis, in Chinese chive (*Allium ramosum*) revealed by analysis of the segregating population generated by back-crossing between amphimictic and apomictic diploids. *Breeding Science.* 2012;62:160-169. DOI: 10.1270/jsbbs.62.160

ДНК-МАРКЕРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К МИЛДЬЮ *Rpv3* В БЕССЕМЯННЫХ СОРТАХ ВИНОГРАДА

Ильницкая Е. Т.*, Макаркина М. В., Токмаков С. В.

Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия,
350901 Россия, Краснодар, ул. имени 40-летия Победы, 39;
✉ *ilnitskaya79@mail.ru

Столовый виноград является ценным диетическим продуктом. Бессемянный виноград пользуется повышенным спросом у потребителя. По этой причине селекция бессемянных сортов – одно из востребованных направлений в современном виноградарстве, равно как и производство экологически безопасной продукции. Милдью (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni) – одно из наиболее распространённых грибных заболеваний виноградной лозы. Большинство американских к милдью форм винограда принадлежат к северо-американским видам – *Vitis aestivalis* Michx., *V. berlandieri* Planch., *V. cinerea* (Engelm. ex A. Gray) Engelm. ex Millard, *V. riparia* Michx., *V. rupestris* Scheele и др. Поиск доноров генов устойчивости – актуальная задача. Один из наиболее эффективных генов устойчивости – *Rpv3*. Источником гена являются некоторые северо-американские виды винограда. Цель проводимой работы – выявление методом ДНК-маркерного анализа гена устойчивости к милдью *Rpv3* в генотипах бессемянных сортов винограда. Объект исследования – сорта винограда с рудиментарным развитием семени в ягодах, имеющие в родословной северо-американские виды. В качестве положительного контроля использовали сорта Дунавски лазур, Сейв Виллар 12-375, несущие референсные аллели. В качестве отрицательного контроля использовали *V. vinifera* L. В исследовании использовали ДНК-маркеры UDV305 и UDV737, позволяющие идентифицировать аллельное состояние гена *Rpv3*. Работа проведена методом полимеразной цепной реакции. Разделение продуктов реакции – методом капиллярного электрофореза с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130. Оценка результатов при помощи программного обеспечения GeneMapper и PeakScanner. В генотипах винограда Кишмиш запорожский, Леди Патриция, Ремейли сидлесс, Памяти Смирнова и Шаян выявлено наличие функциональных аллелей гена устойчивости к милдью *Rpv3*. Во всех сортах выявлен один гаплотип из семи известных – *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹. Анализ родословных изученных сортов показал, что вероятными донорами гена являются родительские формы – гибриды Сейв Виллар и Зейбель. Формы винограда с идентифицированным геном *Rpv3* могут быть использованы в селекции бессемянных сортов как доноры устойчивости к милдью.

Ключевые слова: доноры устойчивости, *Plasmopara viticola*, бессемянность, ПЦР.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-3-04>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

Для цитирования: Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Токмаков С.В. ДНК-маркерная идентификация гена устойчивости к милдью *Rpv3* в бессемянных сортах винограда. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(3):15-19. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-04

For citation: Ilnitskaya E.T., Makarkina M.V., Tokmakov S.V. DNA marker identification of *Rpv3* downy mildew resistance gene in seedless grape varieties. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(3):15-19. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-04

DNA MARKER IDENTIFICATION OF *Rpv3* DOWNY MILDEW RESISTANCE GENE IN SEEDLESS GRAPE VARIETIES

Ilnitskaya E. T.*, Makarkina M. V., Tokmakov S. V.

The North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture and Wine-making»,
39, 40-letiya Pobedy st., Krasnodar 350901, Russia;
✉ *ilnitskaya79@mail.ru

Table grapes are a valuable dietary product. Seedless grapes are in high demand among consumers. For this reason, the breeding of seedless varieties is one of the popular trends in modern viticulture, along with the production of environmentally friendly products. Downy mildew (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni) is one of the most common fungal diseases of the grapevine. Most downy mildew resistant grape accessions belong to North American species like *Vitis aestivalis* Michx., *V. berlandieri* Planch., *V. cinerea* (Engelm. ex A. Gray) Engelm. ex Millard, *V. riparia* Michx., *V. rupestris* Scheele, etc. The search for donors of resistance genes is an urgent task. *Rpv3* is one of the most significant resistance genes from a number of North American grape varieties. The aim of this work is to identify the downy mildew resistance gene *Rpv3* in seedless grape varieties by means of DNA-marker analysis. The grape varieties with rudimentary development of seed in berries and with North American species in the pedigree were chosen as the object of the study. The varieties “Dunavski lazur” and “Seyve Villard 12-375” with reference alleles were used as the positive control, while *V. vinifera* L. was used as the negative control. UDV305 and UDV737 DNA-markers were used in this study to identify the allelic type of the *Rpv3* gene. The work was performed using the polymerase chain reaction. The reaction products were separated by capillary electrophoresis using the ABI Prism 3130 automatic genetic analyzer. Evaluation of the results was done using the GeneMapper and PeakScanner software. Functional alleles of the downy mildew resistance gene *Rpv3* were revealed in grape varieties “Kishmish zaporozhskiy”, “Lady Patricia”, “Remaily seedless”, “Pamyati Smirnova” and “Shayan”. *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹, one of the seven known haplotypes, was identified in all the varieties. The pedigree analysis of the studied varieties indicated that the parental forms – “Seyve Villard” and “Seibel” hybrids – are presumably the donors of the gene. Grape accessions with the identified *Rpv3* gene can be used in seedless varieties breeding as donors of resistance to downy mildew.

Key words: donors of resistance, *Plasmopara viticola*, seedlessness, PCR.

ORCID:

Ilnitskaya E. T. <https://orcid.org/0000-0002-2446-0971>

Makarkina M. V. <https://orcid.org/0000-0002-3397-0666>

Tokmakov S. V. <https://orcid.org/0000-0002-2092-7757>

УДК 575.11:634.8.09

Поступила в редакцию: 03.12.2019

Принята к публикации: 24.12.2019

Введение

Виноград возделывают издревле для двух основных направлений – непосредственного употребления в пищу и переработки ягод на виноделие. Столовый виноград является диетическим продуктом, может потребляться, как в свежем виде, так и в засушенном (изюме) – обладает высокой калорийностью (900-1000 ккал/кг) и сложным химическим составом, включающим сахара в виде фруктозы и глюкозы, органические кислоты, витамины А, В₁, В₂, В₉, С, D, Е, Р, К₁, РР и др., минеральные соли, белки, азотистые вещества (Naumova, 2004; Radchevskiy, Troshin, 2010).

Грибковые заболевания, в частности милдью представляют большую угрозу для виноградарства. Патоген (*Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et de Toni) вызывает дефолиацию растений винограда, повреждение ягод вплоть до полной гибели урожая, что приводит к огромным потерям в виноградарстве (Gessler et al., 2011). В настоящее время милдью контролируется с помощью фунгицидов и в условиях, благоприятных для развития заболевания количество обработок может достигать 14-16 за сезон (Margaryan et al., 2018). Снижение химических обработок и получение экологически безопасной продукции – актуальная проблема. Создание устойчивых столовых сортов винограда – особо важная задача, так как ягоды этих сортов напрямую используются человеком в пищу и риск сохранения в них остатков вредных реагентов наиболее высок; урожай технических сортов, например, подвергается переработке на винопродукцию или соки.

Большинство устойчивых к милдью сортов винограда принадлежат к североамериканским видам – *Vitis aestivalis* Michx., *V. berlandieri* Planch., *V. cinerea* (Engelm. ex A. Gray) Engelm. ex Millard, *V. riparia* Michx., *V. rupestris* Scheele и др. (Alleweldt, Possingham, 1988). Указанные виды активно используются в селекционной работе совместно с сортами *V. vinifera* L., которым характерно высокое качество, но в основном низкая устойчивость к большинству патогенам винограда. Согласно опубликованным данным в настоящее время идентифицировано 27 локусов устойчивости к *P. viticola* (*Rpv1-Rpv27*), ко многим генам разработаны ДНК-маркеры (www.vivc.de).

Один из наиболее эффективных генов устойчивости – *Rpv3* впервые был картирован в сложном межвидовом гибриде винограда «Бианка», в родословной которого присутствует несколько североамериканских видов винограда (Bellin et al., 2009). В результате проведенных молекулярно-генетических исследований были определены тесно сцепленные фланкирующие микросателлитные маркеры, позволяющие идентифицировать гаплотипы *Rpv3* гена: UDV305, UDV737 (Di Gaspero et al, 2012). Установлено, что ген имеет семь консервативных гаплотипов, определяющих устойчивость к милдью и наследуемых от разных североамериканских видов. Гаплотипы

Rpv3 соответствуют следующим аллельным состояниям локусов UDV305 и UDV737: *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ (наследуется от *V. rupestris*), *Rpv3*^{null-297} (*V. rupestris* или *V. lincecumii*), *Rpv3*³²¹⁻³¹² (*V. labrusca* или *V. riparia*), *Rpv3*^{null-271} (*V. labrusca* или *V. riparia*), *Rpv3*³⁶¹⁻²⁹⁹ (*V. rupestris*), *Rpv3*²⁹⁹⁻³¹⁴ (*V. rupestris*), *Rpv3*^{null-287} (*V. rupestris* или *V. labrusca*) (Di Gaspero et al, 2012). Использование молекулярных маркеров, сцепленных с ценными генами, обеспечивает новый инструментарий для селекционеров. Объединение нескольких генов резистентности в одном генотипе позволяет создать высокоустойчивые формы, а использование ДНК-маркеров ускоряет этот процесс (Eibach et al., 2007; Saifert et al., 2018; Sánchez-Mora et al., 2017; Foria et al., 2019). Первый этап в данных работах – поиск доноров ценных генов среди накопленного генофонда.

Бессемянные сорта винограда наиболее привлекательны для потребителя, в связи с чем селекция кишмишных сортов является одним из востребованных направлений в селекции винограда. При этом возделывание органической продукции, которая безопасна, как для человека, так и для окружающей среды, обеспечивает современный подход к системе виноградарства. Выделение доноров генов устойчивости среди генотипов бессемянных сортов – актуальная задача, решение которой нацелено в конечном итоге на создание сортов, дающих урожай привлекательный и безопасный для потребителя и высокопродуктивные для производства.

Целью данного исследования было выявить методом ДНК-маркерного анализа ген устойчивости к милдью *Rpv3* в бессемянных сортах винограда Анапской ампелографической коллекции.

Материалы и методы

В исследования были включены бессемянные сорта винограда Анапской ампелографической коллекции, которые, согласно анализу их родословных, могли бы нести ген устойчивости, поскольку в исходных родительских формах присутствуют североамериканские виды (Таблица). В качестве положительного контроля использовали формы, несущие референсные аллели, а именно сорта Дунавски лазур и Сейв Виллар 12-375 (CB 12-375) (Di Gaspero et al, 2012). Также включили в работу два древних аборигенных бессемянных сорта (Кишмиш чёрный, Кишмиш розовый). В качестве условно отрицательного контроля использовали растения вида *V. vinifera*.

Образцы ДНК выделяли из молодых верхушек побегов растений, экстракцию ДНК осуществляли с помощью буфера на основе ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид) (Rogers, Bendich, 1985). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в конечном объеме 25 мкл по ранее отработанному протоколу (Ilitskaya et al., 2018). В исследовании использовали микросателлитные

ДНК-маркеры UDV305 и UDV737, позволяющие идентифицировать аллельное состояние гена *Rpv3*. Последовательность праймерных олигонуклеотидов синтезирована согласно литературным данным (Di Gaspero et al, 2012). Прямые праймеры были синтезированы с флуоресцентной меткой TAMRA («Синтол», Россия). Амплификацию осуществляли с использованием прибора BioRad. Образцы-контроли были использованы для корректировки размеров фрагментов, полученных в ходе ПЦР анализа. Разделение продуктов реакции методом капиллярного электрофореза и оценка результатов проведены с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 и специального программного обеспечения GeneMapper и PeakScanner.

Результаты и обсуждение

По результатам ДНК-маркерного анализа во всех сортах, которые предположительно могли нести ген

устойчивости, выявлен гаплотип *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ (Таблица). Аллели локусов UDV305 (299, 361) и UDV737 (279, 299), коррелирующие с наличием функциональных аллелей устойчивости гена, выделены в таблице полужирным шрифтом. Следует отметить, что в генотипах Кишмиш розовый и Кишмиш чёрный выявлены аллели в локусе UDV737, размером 279 пар нуклеотидов; это не противоречит уже известным данным о возможном существовании указанной аллели в генотипах *V. vinifera* (Di Gaspero et al, 2012). На наличие гаплотипа, определяющего устойчивость, указывает одновременное присутствие целевых аллелей в локусах UDV305 и UDV737 (рисунок).

Анализ родословной сортов Кишмиш запорожский, Леди Патриция, Ремейли сидлесс, Памяти Смирнова и Шаян позволил установить, что донорами гена являются гибриды Сейв Виллар (СВ) и Зейбель. Данные гибриды, так называемые гибриды-прямые производители, создавались как комплексные источники устойчивости для селекции винограда путём сложных межвидовых скрещиваний, включающих в себя гибридизацию нескольких североамериканских видов и *V. vinifera*.

Таблица. Результаты ДНК-маркерного анализа сортов винограда

Table. The results of DNA marker analysis of grape varieties

Сорт Variety	Происхождение Pedigree	Идентифицированные аллели, пн* Identified alleles, bp			
		UDV305		UDV737	
Дунавски Лазур	Ркацители х СВ 12-375	299	326	279	295
СВ 12-375	Зейбель 6468 х Зейбель 6905	299	361	279	299
Кишмиш запорожский	Виктория ((<i>V. vinifera</i> х <i>V. amurensis</i>) х СВ 12-304) х Русбол (СВ 12-375 х Сверххранний бессемянный)	299	-	279	-
Леди Патриция	Зейбель 14665 х СВ 20-365	299	-	279	-
Ремейли сидлесс	Леди Патриция (Зейбель 14665 х СВ 20-365) х NY 33979	299	343	279	
Памяти Смирнова	СВ 12-375 х Кишмиш таировский розовый	299	343	279	
Шаян	Шамбурсен (СВ 12-417 х Зейбель 7053) х Янги Ер (Мадлен Анжевин х Аскери)	299	-	279	-
Кишмиш розовый	Аборигенный армянский сорт <i>V. vinifera</i>	342	349	279	287
Кишмиш чёрный	Древний средне-азиатский сорт <i>V. vinifera</i>	301		279	

Примечание: *- размер фрагментов ДНК приведён с учетом корректировки (см. Материал и методы)

По данным среднесезонных наблюдений растения сортов Кишмиш запорожский, Леди Патриция, Ремейли сидлесс, Памяти Смирнова и Шаян характеризуются повышенной устойчивостью к милдью (Egorov et al., 2018; Maistrenko et al., 2017).

Если рассматривать данные сорта в качестве роди-

тельских форм для селекции бессемянных сортов, то следует отметить, что ягоды винограда генотипов Кишмиш запорожский, Памяти Смирнова и Шаян имеют достаточно крупные рудименты семян (Ilnitskaya et al., 2019a; Maistrenko et al., 2017). По признаку «класс бессемянности» выделяется сорт Ремейли сидлесс

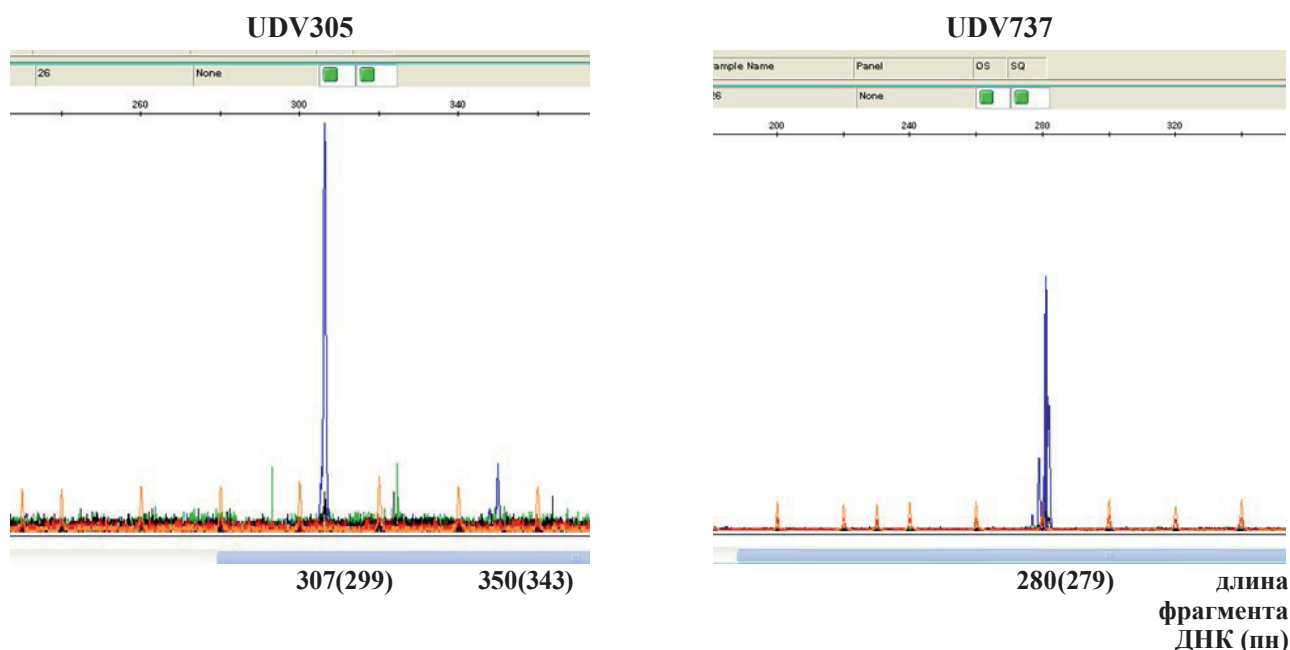


Рисунок. Профили локусов UDV305 и UDV737 сорта Памяти Смирнова при фрагментном анализе. По оси абсцисс отложена длина фрагментов ДНК, пн, по оси ординат - интенсивность соответствующего сигнала. В скобках указано значение с учётом корректировки относительно образца-контроля.

Fig. Profiles of UDV305 and UDV737 loci of “Pamjati Smirnova” variety in fragment analysis. Figures correspond to the fragment sizes of detected alleles; DNA fragment sizes are plotted on the X axis (bp), and the intensity of the corresponding signal on the Y axis. The value corrected according to the control sample is given in parentheses.

(Remaily Seedless), характеризующийся практически полным отсутствием рудиментов семян в ягодах, что делает его наиболее привлекательным в качестве источника ценных признаков именно для селекции бессемянных сортов (Ilnitskaya et al., 2019a; Pool et al., 1981).

Так как сорта винограда являются диплоидами, за редким исключением, в одном генотипе методами традиционной селекции для усиления фенотипического эффекта гена можно объединить только два гаплотипа гена *Rpv3* из семи известных. Эффективным для создания высокоустойчивых форм будет гибридизация сортов, несущих ген *Rpv3* с сортами, унаследовавшими гены устойчивости к милдью *Rpv10* и *Rpv12* от *V. amurensis* (Folia et al., 2019). Так например, *Rpv10* детектирован в ДНК бессемянного сорта Коринка русская (Ilnitskaya et al., 2019b). Анализ происхождения сорта Кишмиш запорожский говорит о присутствии *V. amurensis* в его родословной, и есть вероятность, что данный сорт также может обладать генами устойчивости амурского винограда к милдью от родительской формы – сорта Виктория (*(V. vinifera* x *V. amurensis)* x СВ 12-304). Однако сорт Кишмиш запорожский на наличие указанных генов нами ещё не проверен и информация в литературе не найдена. Работа в данном направлении будет продолжена.

В образцах аборигенного армянского сорта Кишмиш

розовый и древнего среднеазиатского сорта Кишмиш чёрный гаплотипы гена *Rpv3*, определяющие устойчивость к милдью, не обнаружены, что и ожидалось.

Заключение

Методами ДНК-маркерного анализа в образцах винограда Кишмиш запорожский, Леди Патриция, Ремейли сидлесс, Памяти Смирнова и Шаян выявлено наличие функциональной аллели гена устойчивости к милдью *Rpv3*, определён один гаплотип *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹. Указанный гаплотип по литературным данным происходит изначально от североамериканского вида *V. rupestris*. Анализ родословных сортов подтвердил, что источником гена явились сложные межвидовые гибриды винограда Сейв Виллар и Зейбель. Исследованные нами сорта винограда могут быть использованы в селекции бессемянных сортов как доноры устойчивости к милдью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-416-230051 p_a) и Администрации Краснодарского края.

References/Литература

- Alleweldt G., Possingham J.V. Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics*. 1988;75:669-673. DOI: 10.1007/BF00265585
- Bellin D., Peressotti E., Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Adam-Blondon A.F., Cipriani G., Di Gaspero G. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine “Bianca” is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics*. 2009;120(1):163-176. DOI: 10.1007/s00122-009-1167-2
- Di Gaspero G., Copetti D., Coleman C., Castellarin S.D., Eibach R., Kozma P., Lacombe T., Gambetta G., Zvyagin A., Cindrić P., Kovács L., Morgante M., Testolin R. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012;124:227-286. DOI: 10.1007/s00122-011-1703-8
- Egorov E.A., Ilina I.A., Petrov V.S. et al. Anapa ampelographic collection (biological plant resources) (Anapskaja ampelograficheskaja kollekcija (biologicheskie rastitel'nye resursy). Krasnodar; 2018. [in Russian] (Егоров Е.А., Ильина И.А., Петров В.С. и др. Анапская ампелогографическая коллекция (биологические растительные ресурсы). Краснодар; 2018).
- Eibach R., Zyprian E., Welter L., Topfer R. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis*. 2007;46(3):120-124. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.827.96
- Foria S., Monte C., Testolin R., Di Gaspero G., Cipriani G... Pyramiding resistance genes in grape: a breeding program for the selection of elite cultivars. *Acta Horticulturae*. 2019;1248:549-554. DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1248.73
- Gessler C., Pertot I., Perazzolli M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*. 2011;50:3-44. DOI: 10.1038/s41598-018-19158-8
- Ilinskaya E.T., Makarkina M.V., Tokmakov S.V., Naumova L.G. DNA-marker based identification of the *Rpv3* gene determining downy mildew resistance in grapevines. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(6):703-707. DOI: 10.18699/VJ18.413
- Ilinskaya E.T., Pyata E.G., Marmorshtein A.A., Kovalenko A.G. The seedlessness manifestation of grape varieties under the agro-climatic conditions of Anapa ampelographic collection. *Fruit growing and viticulture of South Russia*. 2019a;59(5):21-30 [in Russian] (Ильницкая Е.Т., Пята Е.Г., Марморштейн А.А., Коваленко А.Г. Проявление бессемянности сортов винограда в агроклиматических условиях Анапской ампелогографической коллекции. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2019a;59(5):21-30). DOI: 10.30679/2219-5335-2019-5-59-21-30
- Ilinskaya E., Tokmakov S., Makarkina M., Suprun I. Identification of downy mildew resistance genes *Rpv10* and *Rpv3* by DNA-marker analysis in a Russian grapevine germplasm collection. *Acta Horticulturae*. 2019b;1248:129-134. DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1248.19
- Maistrenko L.A., Duran N.A., Medutova E.N., Mezentsev L.N. Results of breeding of seedless grape varieties. *Russian grapes*. 2017;5:29-39 [in Russian] (Майстренко Л.А., Дуран Н.А., Медютова Е.Н., Мезенцева Л.Н. Итоги селекции бессемянных сортов винограда. *Русский виноград*. 2017;5:29-39).
- Margaryan K., Devejyan H., Melyan G. Screening of Armenian grape varieties for susceptibility to downy mildew. *Magarach. Viticulture and winemaking*. 2018;4(106):47-49 [in Russian] (Маргарян К.С., Деведжян А.Г., Мелян Г.Г. Скрининг армянских сортов винограда на восприимчивость к ложной мучнистой росе. *Магарач. Виноградарство и виноделие*. 2018;4(106):47-49).
- Naumova L.G. Biochemical and dietary characteristics of table grapes (Biokhimicheskaya i diyeticheskaya kharakteristika stolovogo vinograda). *Vinodeliye i vinogradarstvo = Winemaking and viticulture*. 2004;1:36-38 [in Russian] (Наумова Л.Г. Биохимическая и диетическая характеристика столового винограда. *Виноделие и виноградарство*. 2004;1:36-38).
- Pool R., Remaily G., Reisch B., Watson J., Kimball K. Remaily Seedless Grape. *New York's food and life sciences bulletin*. 1981:89.
- Radchevskiy P.P., Troshin L.P. Innovations of wine growing in Russia. 15. Seedless grades of grapes. *Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University*. 2010;56:122-142 [in Russian] (Радчевский П.П., Трошин Л.П. Новации виноградарства России. 15. Бессемянные сорта винограда. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 2010;56:122-142).
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*. 1985;19(1):69. DOI: 10.1007/BF00020088
- Saifert L., Sánchez-Mora F.D., Assumpção W.T., Zanghelini J.A., Giacometti R., Novak E.I., Dal Vesco L.L., Nodari R.O., Eibach R., Welter L.J. Marker-assisted pyramiding of resistance loci to grape downy mildew. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2018;53(5):602-610. DOI: 10.1590/S0100-204X2018000500009
- Sánchez-Mora F.D., Saifert L., Zanghelini J., Assumpção W.T., Guginski-Piva C.A., Giacometti R., Novak E.I., Klabunde G.H., Eibach R., Dal Vesco L., Nodari R.O., Welter L. Behavior of grape breeding lines with distinct resistance alleles to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 2017;17(2):141-149. DOI: 10.1590/198470332017v17n2a21
- Vitis international variety catalogue (VIVC)*. Table of loci for traits in grapevine relevant for breeding and genetics. Julius Kuhn-Institut; 2019. Available from: www.vivc.de [accessed February 16, 2019].

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

Анискина Ю.В.^{1*}, Малиновская Е.В.², Мицурова В.С.¹, Велишаева Н.С.¹, Колобова О.С.¹, Шилов И.А.¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ВНИИСБ), Россия 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42
✉ *aniskina.julia@gmail.com

² Кубанская опытная станция - филиал ВИР, Федеральный исследовательский центр Всероссийский научно-исследовательский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Россия 352183, Краснодарский край, Гулькевичский район, п. Ботаника, ул. Центральная, д. 2

Данное исследование направлено на оценку степени генетического разнообразия и анализ генетической структуры отечественной коллекции сорго. Исследование генетического разнообразия видов сельскохозяйственных культур имеет большое значение для управления генетическими ресурсами и обеспечения продовольственной безопасности любой страны. Значительное генетическое разнообразие сорго представляет большие возможности для улучшения агрономических признаков этой зерновой культуры. Эффективность анализа полиморфизма микросателлитных локусов для изучения генетического разнообразия и генетических взаимосвязей представителей различных рас и различных эколого-географических групп сорго продемонстрирована во многих исследованиях. Значительно ускорить генетический анализ большого количества растительных образцов позволяет использование мультиплексных систем ПЦР-анализа на основе набора полиморфных микросателлитных локусов. Для исследования генетического разнообразия коллекции культурных и дикорастущих форм сорго разработана единая система мультиплексного ПЦР-анализа на основе 12 полиморфных микросателлитных локусов, позволяющая проводить анализ образцов растений в одну стадию. В результате микросателлитного анализа 200 растений сорго было выявлено 229 аллелей. Исследованные локусы продемонстрировали высокий полиморфизм. В большинстве локусов было выявлено более 17 аллелей. Индексы полиморфности локусов (PIC) варьируют от 0,694 до 0,954. Установлен высокий показатель эффективного мультиплексного отношения (EMR) разработанной системы – 0,833. В результате микросателлитного анализа исследуемых образцов были получены оцифрованные генетические профили, составлены генетические паспорта каждого образца, установлен значительный полиморфизм среди представителей разных разновидностей (рас) сорго. В работе продемонстрирована эффективность применения разработанной мультилокусной системы для оценки генетического разнообразия и генетических взаимосвязей образцов сорго, относящихся к различным разновидностям. Анализ полученных данных тремя взаимодополняющими методами: кластерным анализом родства NJ, факторным анализом PCoA и кластерным анализом на основе байесовской модели позволил дифференцировать образцы по группам в соответствии с классификацией по морфологическим и агрономическим признакам.

Ключевые слова: сорго, генетическая идентификация, микросателлиты, мультиплексный анализ.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-3-01>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

RESEARCHING THE GENETIC DIVERSITY OF SORGHUM USING THE MULTIPLEX MICROSATELLITE ANALYSIS

Aniskina Yu. V.^{1*}, Malinovskaya E. V.², Mitsurova V. S.¹, Velishaeva N. S.¹, Kolobova O. S.¹, Shilov I. A.¹

¹ All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology (VNIISB), 42 Timiryazevskaya St., Moscow 127550, Russia
✉ *aniskina.julia@gmail.com

² Kuban Experimental Station of VIR, N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 2 Tsentralnaya St., Botanica, Krasnodar region, 352183, Russia.

This study is focused on evaluation of the genetic structure and diversity of the national sorghum collection. Analyzing the genetic diversity of crop species is of great importance for genetic resources management and food security of any country. Huge genetic diversity of sorghum provides a great opportunity to improve the agronomic characteristics of this crop. The efficiency of microsatellite analysis has been demonstrated in many studies on the genetic diversity of different races and geographical groups of sorghum plants. Development of multiplex PCR analysis systems based on a set of polymorphic microsatellite loci will facilitate genetic tests on a large number of plant samples, thus making the research on sorghum diversity more efficient and comprehensive. A system of multiplex PCR analysis based on 12 polymorphic microsatellite loci was developed to perform single-stage high-throughput screening of cultivated and wild forms preserved in the sorghum germplasm collection. As a result of the microsatellite analysis of 200 sorghum plants, 229 alleles were detected. The studied loci showed high polymorphism. More than 17 alleles were identified in most loci, their polymorphic index content (PIC) ranging from 0.694 to 0.954. The value of the effective multiplex ratio (EMR) in the developed system was estimated at 0.833. The microsatellite analysis of sorghum accessions resulted in obtaining quantized gene expressions profiles, with a DNA profile for each accession, and revealed significant polymorphism among the plants of different sorghum varieties (races). The developed multiplex PCR system was shown to be efficient for evaluation of the genetic diversity and genetic relationships of sorghum plants from different races. The analysis of the obtained data using three bioinformatic techniques, NJ cluster analysis, PCoA, and the Bayesian model-based clustering, helped to classify the analyzed sorghum accessions into cluster groups according to their morphological and agronomic traits.

Key words: sorghum, genetic diversity, genetic identification, microsatellites (SSR), multiplex PCR analysis, DNA fragment analysis.

Для цитирования: Анискина Ю.В., Малиновская Е.В., Мицурова В.С., Велишаева Н.С., Колобова О.С., Шилов И.А. Исследование генетического разнообразия сорго с использованием технологии мультиплексного микросателлитного анализа. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(3):20-29. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-01

For citation: Aniskina Yu.V., Malinovskaya E.V., Mitsurova V.S., Velishaeva N.S., Kolobova O.S., Shilov I.A. The study of the sorghum genetic diversity using the multiplex microsatellite analysis. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019; 2(3):20-29. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-01

ORCID:

Aniskina Yu.V. <https://orcid.org/0000-0002-3376-0263>
Malinovskaya E.V. <https://orcid.org/0000-0002-0136-3650>
Mitsurova V.S. <https://orcid.org/0000-0001-8998-5608>
Velishaeva N.S. <https://orcid.org/0000-0002-2755-3313>
Kolobova O.S. <https://orcid.org/0000-0003-3172-8099>
Shilov I.A. <https://orcid.org/0000-0003-2448-6239>

УДК 575.22:633.174

Поступила в редакцию: 28.06.2019

Принята к публикации: 03.10.2019

Введение

Сорго [*Sorghum bicolor* (L.) Moench, 2n = 20] занимает пятое место в мире среди зерновых культур и является основной продовольственной зерновой культурой в полупустынных тропиках (Salih et al., 2016). Крупнейшими производителями сорго, по данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций, опубликованным на интернет-портале <http://faostat.fao.org>, являются США, Нигерия, Судан, Мексика, Эфиопия и Индия. В России эта теплолюбивая культура выращивается преимущественно в южных регионах.

Культура сорго — ценный сельскохозяйственный и промышленный ресурс. Она отличается быстрым ростом и созреванием, устойчивостью к высоким температурам и низкому плодородию почвы. Сорго — культура многоцелевого использования. Она широко используется для производства муки, крупы, крахмала и сахара, в качестве корма для домашних животных, является одним из ценных источников биотоплива (биоэтанол, биогаз, твердое топливо), применяется в севообороте для возобновления почвы (Bolshakov et al., 2008).

Род *Sorghum* Moench., относящийся к семейству *Poaceae*, характеризуется большим видовым и сортовым разнообразием. Таксономия рода неоднократно пересматривалась и уточнялась. Основы ботанической классификации сорго были разработаны О. Stapf, J.D. Snowden, J.M.J. De Wet, J.P. Huckabay, J.R. Harlan, E. C. Якушевским и рядом других исследователей (Stapf, 1934; Snowden, 1936; De Wet, Huckabay, 1967; Yakushevsky, 1969; Harlan, de Wet, 1972).

На основе морфологических признаков колосков и зерновок J.D. Snowden подразделил род сорго на две секции: *Eu-Sorghum* и *Para-Sorghum*. Возделываемые виды были отнесены к серии *Sativa* секции *Eu-Sorghum*, и объединены в 6 подсерий: *Bicoloria*, *Guineensia*, *Caffra*, *Durra*, *Nervosa*, *Drummondii* (Snowden, 1936). В дальнейшем вследствие отсутствия генетических барьеров между таксонами, выделенными J.D. Snowden, J.M.J. de Wet и J.P. Huckabay объединили все формы сорго в один вид — *S. bicolor* (L.) Moench. (De Wet, Huckabay, 1967).

J.R. Harlan и J.M.J. de Wet предложили упрощенную классификацию вида *S. bicolor*, разделив его на два подвида — *S. bicolor* ssp. *bicolor* и *S. bicolor* ssp. *arundinaceum*. Все культурные формы авторы отнесли к подвиду *S. bicolor* ssp. *bicolor*, в котором на основе морфологических особенностей колосков и зерновок выделили пять основных рас: *Bicolor*, *Caudatum*, *Durra*, *Guinea*, *Kafir* и десять вариантов, являющихся результатом межрасовых скрещиваний (Harlan, de Wet, 1972).

В России предпочитают систематику Е. С. Якушевского. Он классифицировал все возделываемые в разных странах мира сорговые культуры с учетом хозяйственного назначения, биологических и эколого-географических особенностей как отдельные виды: сорго зерновое гвинейское, сорго

зерновое кафрское, сорго зерновое китайское, сорго зерновое негритянское, сорго зерновое хлебное, сорго сахарное, сорго техническое или веничное, суданская трава и сорго щедрое (Yakushevsky, 1969). Эта систематика считается более естественной и удобной, хотя и имеет недостатки в эволюционно-филогенетическом отношении (Shepel et al., 1985).

Согласно современной номенклатуре таксонов растений, опубликованной на интернет-портале <http://www.theplantlist.org/>, все культивируемые формы сорго объединены в вид сорго двуцветное (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) и рассматриваются как расы или разновидности, а не как отдельные виды (Deu, Hamon, 1994; Wiersema, Dahlberg, 2007).

Сорго характеризуется большим генетическим разнообразием. Наибольшее разнообразие форм этого растения обнаружено в северо-восточном регионе Африки, который считается центром происхождения или разнообразия этой культуры (Vavilov, 1935; Vavilov, Chester, 1951). В коллекциях генетических ресурсов сорго в настоящее время сохраняется более 42 тысяч образцов (Tesfaye et al., 2017). Одна из крупнейших коллекций находится в Международном научно-исследовательском координирующем центре растениеводства полупустынных тропиков (ICRISAT — International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) (Billot et al., 2013). В России самая большая коллекция, насчитывающая более 8 тыс. образцов, находится во Всероссийском научно-исследовательском институте генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР) (Malinovskaya, 2007). Исследование генетического разнообразия и паспортизация образцов, интегрированных в мировые коллекции, имеет большое значение для классификации и управления генетическими ресурсами сорго.

Использование генетически различных форм является ключевым условием любой селекционной программы для получения перспективных сортов (Ramu et al., 2013). Понимание генетического разнообразия сорго будет способствовать более целенаправленному подбору исходного материала для селекции и интрогрессии генов и позволит улучшить агрономические показатели этой зерновой культуры.

Традиционным методом оценки генетического разнообразия является анализ морфологических признаков, поскольку их анализ не требует сложного оборудования и методологии. Исследование морфологических признаков позволяет проводить предварительную оценку разнообразия в посевах. Однако, для исследования генетического разнообразия этих признаков бывает недостаточно, из-за их небольшого числа, ограниченного полиморфизма и вариабельности проявления в изменчивых условиях окружающей среды.

Наиболее надежным подходом является исследование разнообразия на генетическом уровне с использованием ДНК-маркеров. По сравнению с морфологическими признаками, они стабильны, хорошо воспроизводимы и не зависят от влияния факторов окружающей среды. Исследования генетического разнообразия сорго с использованием молекулярных маркеров были начаты в начале 1990-х годов. На начальных этапах разработки и применения молекулярных

маркеров значительную роль в идентификации геномных областей, ответственных за важные агрономические признаки, исследованиях генетического разнообразия и сравнительном картировании генома играли RFLP-маркеры, основанные на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК. С помощью RFLP-маркеров M. Deu и P. Hamon (1994) впервые дифференцировали образцы сорго в зависимости от расы и происхождения.

Микросателлитные маркеры (SSR, simple sequence repeats) являются эффективным инструментом для изучения генетического разнообразия, поскольку они широко представлены в геноме растений, характеризуются высоким полиморфизмом, точностью воспроизведения результатов и кодоминантным типом наследования, что позволяет получать информацию о гомозиготном или гетерозиготном состоянии локусов. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов дает возможность установить индивидуальную характеристику каждого отдельного генотипа — ДНК-профиль. Микросателлитные маркеры сорго были разработаны независимо несколькими исследовательскими группами (Brown et al., 1996; Taramino et al., 1997; Bhatramakki et al., 2000; Kong et al., 2000; Schloss et al., 2002; Srinivas et al., 2009; Li et al., 2009; Wang et al., 2012) и широко применялись для исследования генетических взаимосвязей между представителями разных рас и эколого-географических групп, в том числе в рамках международного проекта “The Generation Challenge Programme” (Ali et al., 2008; Sagnard et al., 2011; Ng'uni et al., 2011, 2012; Billot et al., 2012; 2013; Ramu et al., 2013; Salih et al., 2016; Ouedraogo et al., 2017; Maina et al., 2018).

Ранее на основе 17 микросателлитных локусов мы разработали две мультиплексные системы — «Сорго-7» и «Сорго-10» (Aniskina et al., 2018), которые дали возможность дифференцировать выборку из 249 образцов коллекции сорго ВИР. Однако для анализа большого количества образцов требуется создание единой системы ПЦР-анализа, позволяющей сократить сроки проведения молекулярно-генетического анализа.

Цель настоящего исследования заключается в разработке единой системы генотипирования сорго на основе мультиплексного анализа полиморфизма микросателлитных локусов и выяснение возможности ее использования для оценки уровня генетического разнообразия образцов сорго коллекции ВИР.

Материалы и методы

Исходный материал для исследования включал 200 образцов видов *Sorghum*, в том числе: 9 образцов гвинейского сорго (*S. guineensis* Snowd.), 47 — кафрского сорго (*S. caffrorum* (Beauv.) Snowd.), 12 — китайского сорго (*S. nervosum* Bess.), 19 — негритянского сорго (3 образца *S. bantuum* L. и 16 образцов *S. caudatum* (Hack.) Stapf), 23 — хлебного сорго (9 образцов

S. cernuum (Host.) Gram. и 14 образцов *S. durra* (Forsk.) Stapf.), 59 — сахарного сорго (*S. saccharatum* (L.) Pers.), 13 — веничного сорго (*S. technicum* (Koern.) Snowd) и 18 — суданской травы (*S. sudanense* Stapf.) (Приложение). Видовые названия образцов приведены в соответствии с классификацией Е.С. Якушевского по способу использования и хозяйственно — ценным признакам.

Методики выделения ДНК, амплификации и фрагментного анализа описаны нами ранее (Анискина и др., 2018).

Для оценки уровня полиморфизма использовали значение коэффициента полиморфизма PIC (polymorphic information content). Коэффициент полиморфизма был рассчитан отдельно для каждого локуса микросателлитных последовательностей генома сорго. Значение коэффициента вычисляли по формуле: $PIC = 1 - \sum (P_i)^2$, где P_i — частота встречаемости i -ой аллели (Ali et al., 1979).

Для определения эффективности предлагаемой мультиплексной системы был произведен расчет эффективного мультиплексного отношения (effective multiplex ratio, EMR) (Chesnokon et al., 2015). EMR находится с помощью произведения общего числа полиморфных локусов и доли полиморфных локусов от их общего числа: $EMR = n_p (n_p / n)$, где n_p — число полиморфных локусов, n — общее число локусов.

Для выяснения генетической структуры изученной выборки образцов сорго использовались три взаимодополняющих подхода. Для оценки генетических расстояний между растительными образцами в программе DARwin 6.0.21 были выполнены кластерный анализ родства NJ (Neighbor Joining) и факторный анализ PCoA (Principle Coordinate Analysis). Различия между всеми парами отдельных генотипов были оценены на основе стандартной процедуры сопоставления. Факторный анализ позволил получить общее представление о разнообразии выборки, в то время как генетические отношения между образцами коллекции были проанализированы построением дендрограммы с использованием метода Neighbor Joining (NJ).

Для исследования популяционной структуры и распределения изученных образцов по подгруппам (K) был выполнен кластерный анализ на основе байесовской модели с использованием программного обеспечения STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Байесовская модель предполагает, что каждый индивид происходит от одной из популяций K. Были установлены следующие параметры анализа: алгоритм Admixture model, корреляция с частотой аллелей, 100000 итераций Burn-in и 200000 повторов MCMC. Для каждого K в диапазоне от 2 до 10 было выполнено пять независимых анализов.

Результаты

Для создания эффективной системы мультиплексного микросателлитного анализа, позволяющей надежно различать и идентифицировать образцы растений определяющее значение

имеет подбор наиболее информативных микросателлитных маркеров. С этой целью было проведено исследование полиморфизма более 40 микросателлитных локусов. При выборе локусов по литературным данным учитывались такие данные как количество аллелей, выявленных в локусе (более 5), расположение на разных хромосомах, обеспечивающее независимое наследование ДНК-маркеров, и небольшая длина получаемых фрагментов (100-300 пн) для проведения достоверного анализа длин ПЦР-фрагментов. Полиморфизм данных локусов был исследован экспериментально у образцов расширенной коллекции сорго. В результате были отобраны наиболее полиморфные микросателлитные локусы, с использованием которых получены четко интерпретируемые и воспроизводимые результаты (Aniskina et al., 2018). Мономорфные микросателлитные локусы, трудно амплифицируемые или дающие неоднозначные и нестабильные результаты были исключены из исследования.

С целью разработки универсальной системы мультиплексного микросателлитного анализа для оценки генетического разнообразия сорго были отобраны 12 локусов, которые, по данным проведенных ранее исследований, характеризуются наиболее высокими индексами полиморфности (PIC). Модифицированная мультиплексная система обозначена нами как «Сорго-12» (таблица 1).

В предложенной системе анализ каждого микросателлитного локуса осуществляется с парой специфичных праймеров, один из которых помечен определенным флуоресцентным красителем (FAM, R6G, TAMRA, ROX или Sy630), в соответствии с ранее опубликованным протоколом (Анискина и др., 2018). Это позволяет анализировать получаемые по каждому локусу ПЦР-фрагменты отдельно по соответствующему каналу детекции (см. табл. 1). В используемой мультиплексной

системе по каждому каналу осуществлялся анализ 2–3 локусов, подобранных по длине таким образом, чтобы диапазоны длин их фрагментов не перекрывались (см. табл. 1). Для одновременной амплификации микросателлитных локусов в одной ПЦР-пробе подобрана единая оптимальная температура отжига нескольких пар праймеров ($T_{отж} = 55^{\circ}\text{C}$). Длина полученных ПЦР-фрагментов определяется с точностью до одного нуклеотида при разделении электрофорезом высокого разрешения в капиллярах на автоматическом генетическом анализаторе «Нанофор-05».

На рисунке 1 в качестве примера представлены результаты фрагментного анализа сорта «Feterita» негритянского сорго. Каждый пик на электрофореграмме представляет собой фрагмент определенной длины, соответствующий одной из аллелей микросателлитного локуса (рисунок 1А). Длина каждого микросателлитного фрагмента определена с точностью до одного нуклеотида. Совокупность фрагментов всех локусов представляет собой оцифрованный генетический профиль, который может быть записан в виде генетического паспорта (рисунок 1Б).

Уникальные генетические характеристики были получены для каждого образца коллекции (Приложение). Большинство исследуемых генотипов характеризуются гомозиготным состоянием локусов. Однако у некоторых образцов, например, у представителей суданской травы и технического сорго, некоторые локусы оказались гетерозиготными. Отметим, что стерильные и фертильные линии-аналоги (83-А и 83-В, Перспектива 80-А и Перспектива 80-В) имеют абсолютно идентичные профили.

В результате анализа коллекции сорго по 12 микросателлитным локусам было выявлено 229 аллелей, или так называемых дескрипторов генетического разнообразия.

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов сорго, входящих в состав мультиплексной системы «Сорго-12»

Table 1. Characteristics of sorghum SSR loci involved in the Sorghum-12 multiplex system

№ п/п	Буквенный индекс	Локус	Повтор	Краситель	Длина фрагмента, пн	Число аллелей	PIC локуса*
1	A	Sb4-15	(AG)	FAM	111 - 149	9	0,694
2	B	Sb4-32	(AG)	FAM	170 - 242	25	0,880
3	C	Sbl-10	(AG)	FAM	255 - 322	22	0,802
4	D	Xtxp25	(CT)	R6G	126 - 212	27	0,920
5	E	Dsenhsbm4	(TG)	R6G	245 - 265	10	0,855
6	F	SbAGA01	(AG)	TAMRA	99 - 133	17	0,826
7	G	Xtxp10	(CT)	TAMRA	145 - 171	10	0,758
8	H	Sb6-36	(AG)	TAMRA	173 - 225	17	0,859
9	I	Sb5-206	(AC)	ROX	116 - 184	23	0,904
10	J	Sb6-84	(AG)	ROX	194 - 250	25	0,860
11	K	SbAGH04	(AG)	Sy630	110 - 186	31	0,954
12	L	Sb6-342	(AC)	Sy630	242 - 308	13	0,789

Исследованные локусы продемонстрировали высокий полиморфизм. В каждом локусе было выявлено от 9 до 31 аллелей. Частота встречаемости аллелей варьировала от 0,004 до 0,49. Редкие аллели, встречающиеся с частотой менее 0,01, составили 26 % от числа всех выявленных аллелей. Доля наиболее часто встречающихся аллелей (0,20 – 0,49) составила 5 %. Индекс полиморфности локусов (PIC) варьировал от 0,694 до 0,954, что свидетельствует о высоком уровне

информативности используемых микросателлитных маркеров (см. табл. 1). При этом индекс полиморфности локуса может существенно различаться среди представителей различных разновидностей сорго. На основе полученных данных был вычислен показатель эффективного мультиплексного отношения (EMR) разработанной системы. Его значение составило 0,833, что свидетельствует об эффективности созданной мультиплексной системы.

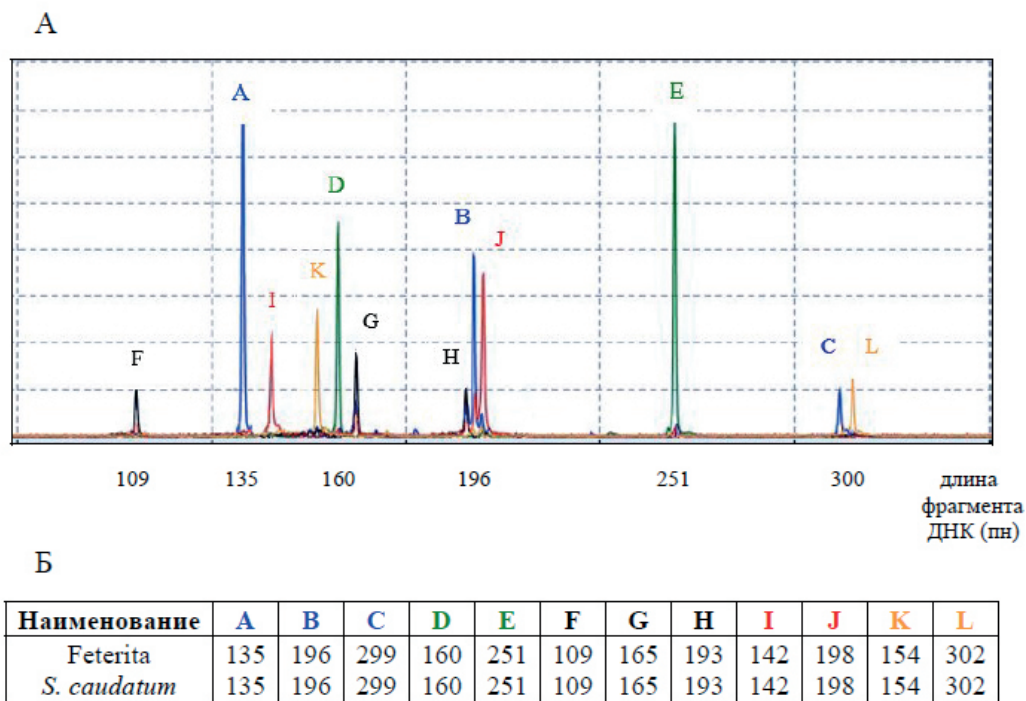


Рис. 1. Генетический профиль (А) и генетический паспорт (Б) сорта сорго «Feterita», полученные в результате анализа с использованием мультилокусной системы «Сорго-12». Латинскими буквами обозначены исследуемые микросателлитные локусы (см. табл. 1), цвет пика на графике соответствует цвету канала детекции на приборе «Нанофор-05». По оси абсцисс отложена длина фрагментов ДНК, по оси ординат - интенсивность соответствующего сигнала. Генетический паспорт – совокупность аллелей, выявленных в 12 локусах.

Fig. 1. DNA profile (A) and genetic passport (B) obtained after analyzing the sorghum cultivar «Feterita» with the developed multiplex system «Sorghum-12». Latin letters indicate the SSR loci (see Table 1), peak colors on the graph correspond to the detection channels of the Nanoфор-05 device; figures correspond to the fragment sizes of detected alleles, bp; DNA fragment sizes are plotted on the X axis (bp), and the intensity of the corresponding signal on the Y axis. The genetic passport is a set of alleles identified at 12 loci.

Для оценки генетического разнообразия сорго на основе данных микросателлитного анализа были использованы три взаимодополняющих подхода. Кластерный анализ родства NJ и факторный анализ PCoA позволили установить генетические расстояния между образцами.

Из полученной в программе DARwin 6.0.21 дендрограммы (рисунок 2А) следует, что все образцы технического сорго, 78% сахарного сорго, 79 % кафрского сорго, 83% китайского сорго и 56 % хлебного сорго образуют отдельные кластеры в соответствии с ботанической классификацией (таблица 2). Некоторые образцы сахарного, кафрско-

го, гвинейского и негритянского сорго, а также суданской травы объединились в кластеры с представителями других рас. Так, например, в единый кластер вместе с растениями кафрского сорго вошли представители других разновидностей зернового сорго и сахарного сорго. Такие образцы могут относиться к промежуточным формам, возникшим вследствие высокой способности сорго к гибридизации и сложной селекционной истории.

Так, например, сорт сахарного сорго Schrock (к-3046, образец № 140) является межрасовым гибридом сахарного и зернового сорго и группируется в кластер с зерновым

негритянским сорго. Образец № 149 (линия ДНВ-26, к-9402) является межрасовым гибридом суданской травы и зернового сорго и группируется в кластер с зерновым кафрским сорго.

В изученной выборке образцов сорго также были выявлены дублированные образцы с одинаковыми генотипами. Так, например, образец негритянского сорго с номером по каталогу к-2827 был представлен в коллекции дважды: как №78 – SPT-20 (*S. caudatum*) и №87 – SBT-20 (*S. bantuorum*).

Данные факторного анализа методом PCoA, проведенного в программе DARwin 6.0.21, в целом соответствуют результатам кластерного анализа с использованием алгоритма

Neighbor Joining (NJ) и позволяют дифференцировать группы образцов сорго в соответствии с классификацией по морфологическим и агрономическим признакам. При рассмотрении по осям 1/2 большинство образцов сахарного сорго были сгруппированы в левом верхнем квадранте, большинство образцов кафрского сорго – в правом верхнем квадранте, образцы китайского и негритянского сорго – в левом нижнем квадранте (рисунок 2Б). Образцы технического сорго локализованы обособленно в левом верхнем квадранте при рассмотрении по осям 2/3.

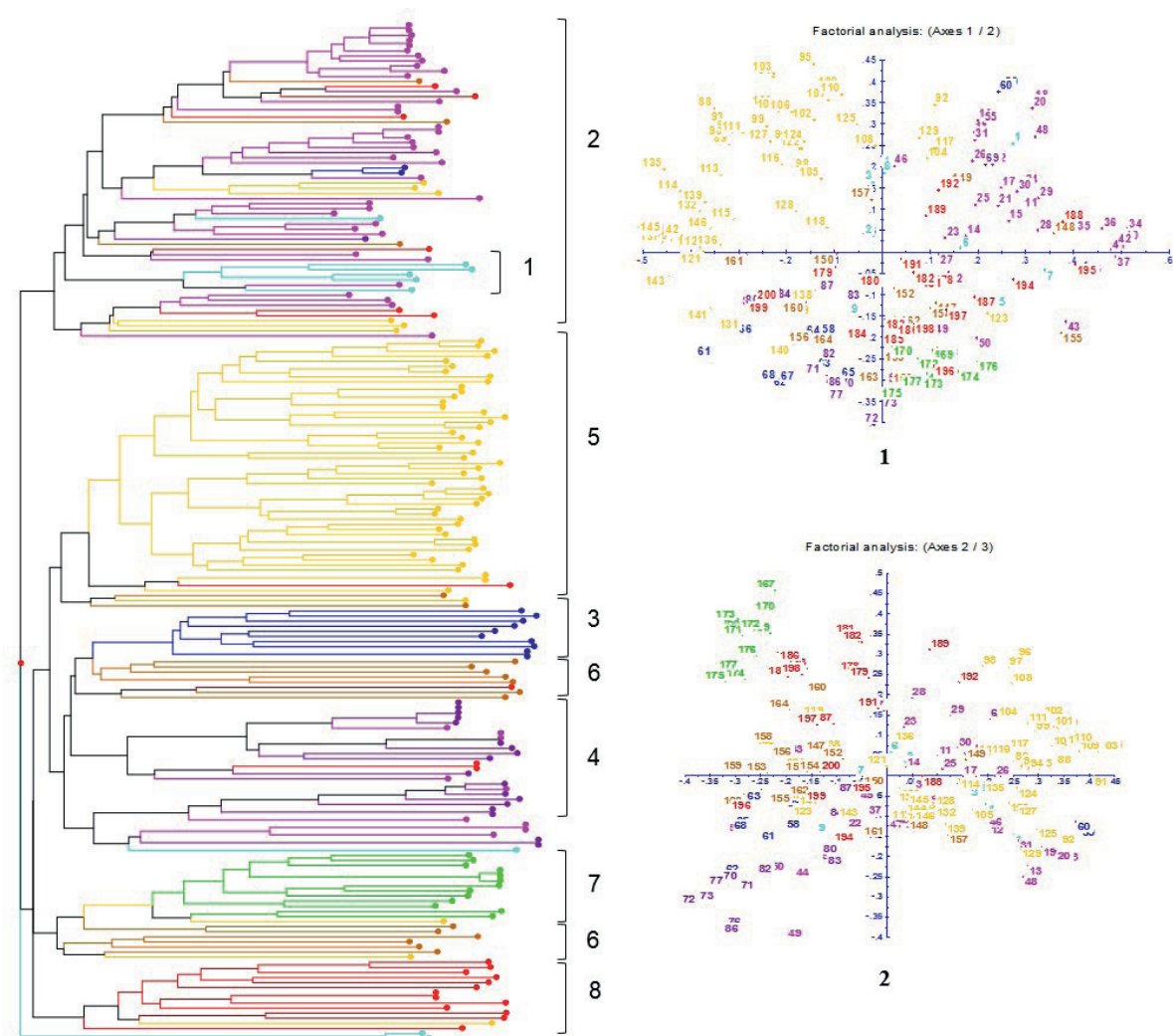


Рис. 2. Обработка результатов генетического анализа образцов сорго методами многомерной статистики в программе DARwin. А – Кластеризация образцов с использованием алгоритма NJ. Цвет шрифта соответствует таксономической классификации образцов: 1 – гвинейское (*S. guineensis*), 2 – кафрское (*S. caffrorum*), 3 – китайское (*S. nervosum*), 4 – негритянское (*S. caudatum* / *S. bantuorum*), 5 – сахарное (*S. saccharatum*), 6 – суданская трава (*S. sudanense*), 7 – техническое (*S. technicum*), 8 – хлебное (*S. cernum* / *S. durra*); Б – Группировка образцов выборки по результатам факторного анализа (PCoA). 1 – оси 1/2; 2 – оси 2/3.

Fig. 2. Processing the results of the genetic analysis of sorghum accessions using multivariate statistics based on the DARwin software. А – NJ analysis. Font colors correspond to the taxonomic classification of accessions: 1 – *S. guineensis*, 2 – *S. caffrorum*, 3 – *S. nervosum*, 4 – *S. caudatum* / *S. bantuorum*, 5 – *S. saccharatum*, 6 – *S. sudanense*, 7 – *S. technicum*, 8 – *S. cernum* / *S. durra*; Б – Principle coordinate analysis (PCoA). 1 – axes 1/2; 2 – axes 2/3.

Для исследования популяционной структуры и распределения образцов сорго по подгруппам (К) в программе STRUCTURE был выполнен кластерный анализ на основе байесовской модели. Было исследовано от 2 до 10 возможных подгрупп (К). Достаточно четкой дифференциации всех рас удалось достичь при значении $K = 8$. Кластерный анализ, выполненный при $K = 8$, в целом подтвердил результаты, полученные методами NJ и PCoA. Анализ структуры изученной выборки образцов сорго показывает, что 100%

образцов технического сорго (7), 88% суданской травы (6), 81% сахарного сорго (5), 83% китайского сорго (3), 71% кафрского сорго (2), 66% гвинейского сорго (1), 65% хлебного сорго (8) и 52% негритянского сорго (4) группируются в кластеры в соответствии с их ботанической классификацией (рисунок 3, см. табл. 2). Значение величины дифференциации образцов (F_{ST}) в полученных кластерах (группах) составил от 0,286 до 0,635.

Таблица 2. Кластеризация разновидностей сорго на основе результатов NJ анализа и структурного анализа на основе байесовской модели (BM)

Table 2. Clustering of sorghum accessions using the Neighbour-Joining (NJ) method and Bayesian model-based (BM) clustering technique

Метод	Кластеры образцов сорго							
	1	2	3	4	5	6	7	8
DARwin NJ	55%	79%	83%	47%	78%	38%	100%	56%
Structure BM	66%	71,5%	83%	52%	81%	88%	100%	65%

Примечание: цифрами обозначены разновидности сорго, объединенные в соответствующие кластеры:

1–гвинейское (*S. guineensis*), 2–кафрское (*S. caffrorum*), 3–китайское (*S. nervosum*), 4–негритянское (*S. caudatum*–*S. bantuo*), 5–сахарное (*S. saccharatum*), 6–суданская трава (*S. sudanense*), 7–техническое (*S. technicum*), 8–хлебное (*S. cernuum* / *S. durra*).

Note: the numbers indicate sorghum varieties, grouped into corresponding clusters:

1–*S. guineensis*, 2–*S. caffrorum*, 3–*S. nervosum*, 4–*S. caudatum*–*S. bantuo*, 5–*S. saccharatum*, 6–*S. sudanense*, 7–*S. technicum*, 8–*S. cernuum*–*S. durra*.

Таким образом, исследуемые образцы сорго образовали восемь хорошо отличимых групп (кластеров) как в результате использования метода NJ (DARwin), так и кластерного анализа на основе байесовской модели BM (STRUCTURE). В кластерах, полученных разными методами, наблюдается значительное соответствие состава и числа образцов. (см. табл. 2). В целом, распределение образцов сорго по группам соответствует их расовой принадлежности.

Обсуждение

Ключевым фактором в селекции сельскохозяйственных культур для создания перспективных сортов является подбор родительских форм, характеризующихся большим генетическим разнообразием. Анализ разнообразия на генетическом уровне с использованием микросателлитных маркеров является самым надежным и экономически оправданным методом выявления различий между генотипами.

Ранее для исследования генетического разнообразия представителей разных рас сорго были разработаны 2 мультиплексные системы «Сорго-7» и «Сорго-10» на основе 17 микросателлитных локусов (Aniskina et al., 2018). Однако несмотря на все достоинства этих ПЦР-систем, оказалось, что не все локусы подходят для дифференциации рас (различные разновидности сорго могут иметь сходный состав аллелей по некоторым микросателлитным локусам), и

использование таких локусов в кластерном анализе может способствовать объединению растений разных рас в общий кластер. Кроме того, этот подход оказался недостаточно удобен для анализа большой партии растительных образцов, поскольку анализ каждого образца необходимо осуществлять в 2 стадии.

Поэтому в целях оптимизации этапов проведения широкомасштабного генетического анализа была разработана единая мультиплексная система, позволяющая проводить ПЦР-анализ в одну стадию. Данный подход является более технологичным и экономичным, поскольку позволяет существенно сократить стоимость и сроки проведения подобных исследований. Для создания мультиплексной системы из 17 локусов сорго, выбранных ранее для оценки генетического разнообразия, были отобраны 12 локусов с наиболее высокими показателями PIC. Эти локусы характеризуются большим числом аллелей, а также низкой или средней частотой их встречаемости. Из анализа были исключены локусы с небольшим числом аллелей и высокой частотой их встречаемости.

Высокий уровень полиморфизма микросателлитных локусов, входящих в мультиплексный набор, позволил получить генетические паспорта всех образцов коллекции. На основании генетических профилей, полученных в результате использования данной мультиплексной системы, все исследуемые образцы были дифференцированы и установлены их генетические взаимосвязи. Достаточно четкие отличия наблюдались между образцами зернового и сахарного

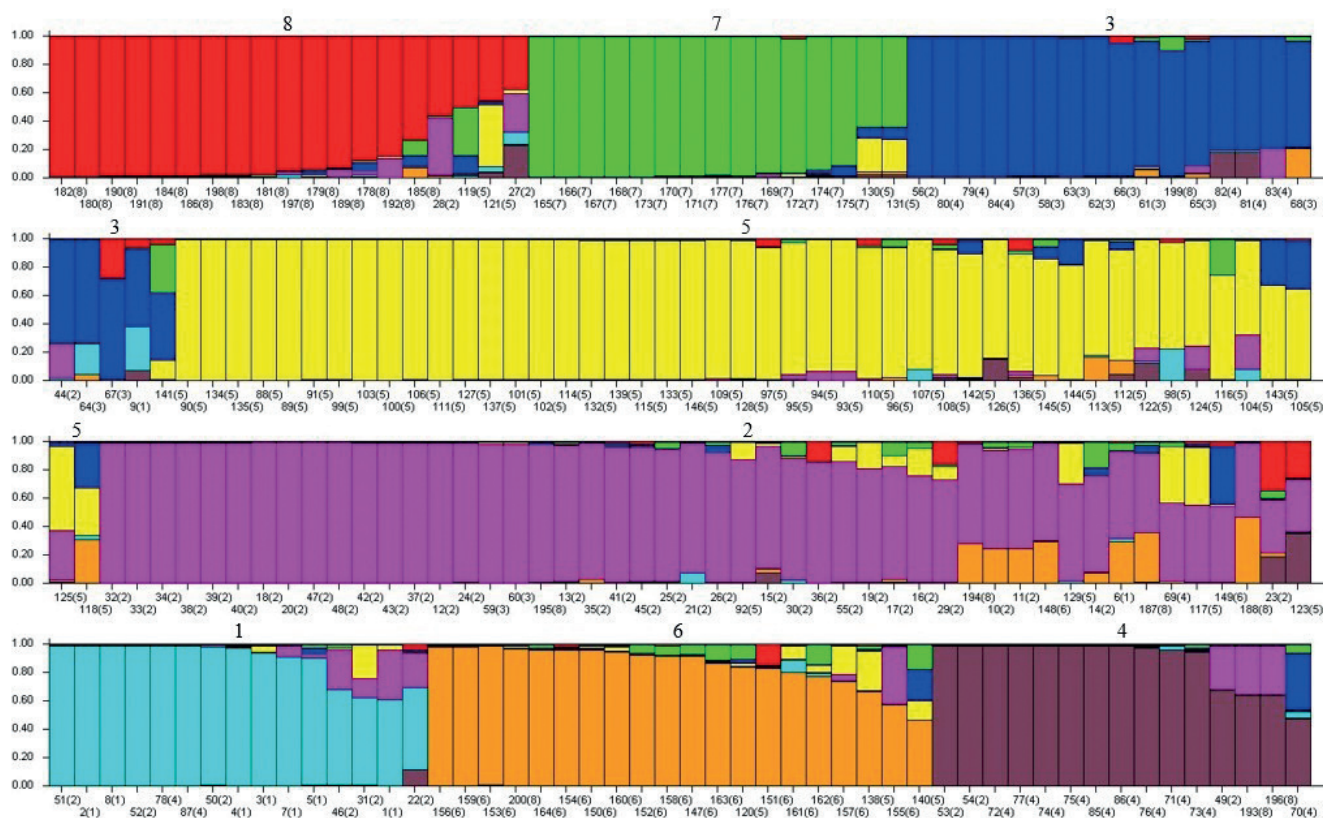


Рис. 3. Структура изученной выборки образцов коллекции сорго, полученная с использованием программы STRUCTURE. На основании байесовского анализа ($K = 8$), образцы сорго распределились по восьми кластерам, которые обозначены разными цветами.

Fig. 3. Structure of the studied samples from the sorghum collection obtained using the STRUCTURE program. According to the Bayesian analysis ($K = 8$) sorghum samples are lotted up in eight clusters which are differently colored.

сорго. Аналогичная дифференциация генотипов сахарного и зернового сорго также была достигнута другими авторами при использовании технологий секвенирования следующего поколения (NGS) (Zheng et al., 2011).

Генетические взаимосвязи, выявленные среди образцов сорго с использованием дистанционных методов парной дифференциации, PCoA и NJ-анализа, и кластерного анализа на основе байесовской модели, подтвердили дифференциацию образцов в соответствии с классификацией по расам, разработанной J.R. Harlan and J.M.J. de Wet (1972) и классификацией Е.С.Якушевского (1969). Тем не менее, представители некоторых рас сорго оказались распределены в другие группы в результате кластерного анализа. Это может быть связано со сложной селекционной историей исследуемых образцов и наличием в коллекции промежуточных форм (межрасовых гибридов). Дальнейшее исследование расширенной коллекции позволит более четко дифференцировать образцы сорго спорного происхождения.

Похожие результаты были получены другими исследовательскими группами. Так, например, в результате исследования 3367 образцов сорго разных рас и разного географического происхождения с использованием 41 микросателлитного

локуса также было выявлено глобальное совпадение в распределении образцов по группам на основе результатов NJ анализа и байесовской модели кластерного анализа (Billot et al., 2013). Среди культивируемых форм, за исключением кафрского сорго, практически не было обнаружено совпадения между расой и группой, сформированной на основе микросателлитных маркеров. Представители рас Bicolor, Caudatum, Durra и Guinea сгруппировались в три и более различных кластеров. Исследователи сообщают о подтверждении популяционной структуры сорго, и считают, что кластеризация образцов сорго по расам связана с их географическим происхождением (Billot et al., 2013). Разделение представителей сорго по расам в пределах географического происхождения также было продемонстрировано этой исследовательской группой в исследовании эталонного набора сорго из 384 образцов пяти рас сорго и их промежуточных форм (Ramu et al., 2013).

Авторы объясняют выявленную географическую дифференциацию исследуемых растений и различия в классификации, составленной на основе микросателлитных маркеров, и классификацией по расам, основанной на морфологических и агрономических признаках, следующими

факторами: географическим распространением радиально в направлениях от центра происхождения и сложными эволюционными процессами, а также обменом генами между культурными и дикими типами, обеспечивающим динамику популяции (Billot et al., 2013).

Работы других исследователей также свидетельствуют об определяющем значении таких факторов, как географическое происхождение и поток генов между культурными и дикорастущими растениями сорго для классификации сорго (Sagnard et al., 2011; Salih et al., 2016).

Сокращение числа исследуемых локусов, а, следовательно, и выявляемых аллелей (дескрипторов) существенно не повлияло на распределение представителей сорго по кластерам. В целом, результаты анализа генетического разнообразия исследуемых образцов сорго соответствуют результатам исследования, полученным нами ранее (Aniskina et al., 2018), но обработка результатов с помощью более расширенного арсенала биоинформатических методов (PCoA и NJ-анализа, и кластерного анализа на основе байесовской модели) позволила получить более точное распределение исследуемых представителей сорго по кластерам.

Заключение

Разработана единая система мультиплексного анализа сорго на основе 12 микросателлитных локусов, которая может быть использована в исследованиях генетического разнообразия коллекционных образцов сорго. Использование данной системы позволяет проводить анализ в одну стадию и, следовательно, сократить сроки его проведения, по сравнению с ранее предложенным подходом (Aniskina et al., 2018). Технология позволяет получать оцифрованные генетические профили, что значительно повышает точность идентификации растительных образцов при широкомасштабном исследовании. С использованием разработанной технологии был проведен генетический анализ отечественной коллекции сорго и получены уникальные генетические профили каждого образца коллекции. Анализ полученных данных тремя взаимодополняющими методами позволил дифференцировать образцы в соответствии с их классификацией по морфологическим и агрономическим признакам.

Понимание географического, экологического и социального аспектов формирования генетического разнообразия является ключом к устойчивому управлению генетическими ресурсами. Применение разработанной технологии для идентификации генотипов культуры сорго, характеризующейся высоким уровнем морфо-биологического разнообразия, будет способствовать уточнению классификации недостаточно изученных образцов сорго, формированию стержневых коллекций, что позволит уменьшить число ежегодно размножаемых образцов и сократить затраты на их содержание.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0574-2019-0003. Авторы благодарны сотрудникам ЦКП «Биотехнология» за помощь при работе на генетическом анализаторе «Нанофор-05».

References/Литература

- Ali M.L., Rajewski J.F., Baenziger P.S., Gill K.S., Eskridge K.M., Dweikat I. Assessment of genetic diversity and relationship among a collection of US sweet sorghum germplasm by SSR markers. *Molecular Breeding*. 2008;21(4): 497-509. DOI: 10.1007/s11032-007-9149-z
- Aniskina Yu.V., Malinovskaya E.V., Shalaeva T.V., Mitsurova V.S., Rodionova D.A., Kharchenko P.N. et al. Technology for genetic identification of sorghum varieties and hybrids based on multiplex microsatellite analysis. *Russian Journal of Biotechnology*. 2018;34(2):54-69. [in Russian] (Анискина Ю.В., Малиновская Е.В., Шалаева Т.В., Мишурова В.С., Родионова Д.А., Харченко П.Н. и др. Технология генетической паспортизации сортов и гибридов сорго на основе мультилокусного микросателлитного анализа. *Биотехнология*. 2018;34(2):54-69). DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-2-54-69
- Bhatramakki D., Dong J., Chhabra A.K., Hart G.E. An integrated SSR and RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Genome*. 2000;43(6):988-1002.
- Billot C., Ramu P., Bouchet S., Chantreau J., Deu M., Gardes L. et al. Massive sorghum collection genotyped with SSR markers to enhance use of global genetic resources. *PLoS One*. 2013;8(4):e59714. DOI: 10.1371/journal.pone.0059714
- Billot C., Rivallan R., Sall M.N., Fonceka D., Deu M., Glaszmann J.C. et al. A reference microsatellite kit to assess for genetic diversity of *Sorghum bicolor* (Poaceae). *Am. J. Bot.* 2012;99(6):e245-250. DOI: 10.3732/ajb.1100548
- Bolshakov A.Z., Bondarenko S.M., Kadyrov S.V., Klepko Yu.N., Kritsky A.N., Fedotov V.A., Usatova O.A. Time to honor sorghum (Vremya chestvovat sorgo). Rostov-on-Don: Rostizdat, 2008. [in Russian] (Большаков А.З., Бондаренко С.М., Кадыров С.В., Клепко Ю.Н., Крицкий А.Н., Федотов В.А., Усатова О.А. Время чествовать сорго. Ростов-на-Дону: Ростиздат; 2008).
- Brown S.M., Hopkins M.S., Mitchell S.E., Senior M.L., Wang T.Y., Duncan R.R. et al. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor. Appl. Genet.* 1996;93(1-2):190-198. DOI: 10.1007/BF00225745
- Chesnokov Yu.V., Artemyeva A.M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*. 2015;50(5):571-578. [in Russian] (Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия. *Сельскохозяйственная биология*. 2015;50(5):571-578. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.571rus
- De Wet J.M.J., Huckabay J.P. (1967) The origin of *Sorghum bicolor*. II. Distribution and domestication. *Evolution*. 1967;21(4):787-802. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1967.tb03434.x
- Deu M., Hamon P. The genetic organization of sorghum. *Agriculture et développement*. 1994;Special issue:25-30.
- Harlan J.R., de Wet J.M.J. A simplified classification of cultivated sorghum. *Crop Science*. 1972;12(2):172-176. DOI: 10.2135/cropsci1972.0011183X001200020005x
- Kidwell K.K., Osborn T.C. Simple Plant DNA Isolation Procedures. In: J. Beckman, T.C. Osborn (eds). *Plant Genomes. Methods for Genetic and Physical Mapping*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1992. p.1-13.
- Kong L., Dong J., Hart G.E. Characteristics, linkage-map positions, and allelic differentiation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench DNA simple-sequence repeats (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* 2000;101(3):438-448. DOI: 10.1007/s00122005101
- Li M., Yuyama N., Luo L., Hirata M., Cai H. In silico mapping of 1758 new SSR markers developed from public genomic sequences for *Sorghum*. *Molecular Breeding*. 2009;24(1):41-47. DOI: 10.1007/s11032-009-9270-2
- Maina F., Bouchet S., Marla S.R., Hu Z., Wang J., Mamadou A. et al. Population genomics of sorghum (*Sorghum bicolor*) across diverse agro-

- climatic zones of Niger. *Genome*. 2018;61(4):223-232. DOI: 10.1139/gen-2017-0131
- Malinovskaya E.V. Intraspecific diversity of *Sorghum guineensis* Snowd. in connection with the formation of the core collection (Vnutrividovoye raznoobrazie *Sorghum guineensis* Snowd. v svyazi s formirovaniyem sterzhnevoy kolleksii) [dissertation]. St. Petersburg; 2007. [in Russian] (Малиновская Е.В. Внутривидовое разнообразие *Sorghum guineensis* Snowd. в связи с формированием стержневой коллекции: дис. ... канд. с.-х. наук. Санкт-Петербург; 2007).
- Ng'uni D., Geleta M., Bryngelsson T. Genetic diversity in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) accessions of Zambia as revealed by simple sequence repeats (SSR). *Hereditas*. 2011;148(2):52-62. DOI: 10.1111/j.1601-5223.2011.02208.x
- Ng'uni D., Geleta M., Hofvander P., Fatih M., Bryngelsson T. Comparative genetic diversity and nutritional quality variation among some important Southern African sorghum accessions [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Aust. J. Crop Sci.* 2012;6(1):56-64.
- Ouedraogo N., Sanou J., Traore H., Gracen V., Tongoono P., Danquah E.Y. Genetic diversity among sorghum landraces and polymorphism assessment of local improved varieties for stay-green trait. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 2017;11(1):1-14. DOI: 10.4314/ijbcs.v11i1.1
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-959.
- Ramu P., Billot C., Rami J.F., Senthilvel S., Upadhyaya H.D., Ananda Reddy L. et al. Assessment of genetic diversity in the sorghum reference set using EST-SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(8):2051-2064. DOI: 10.1007/s00122-013-2117-6
- Sagnard F., Deu M., Dembélé D., Leblois R., Touré L., Diakité M. et al. Genetic diversity, structure, gene flow and evolutionary relationships within the *Sorghum bicolor* wild-weedy-crop complex in a western African region. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123(7):1231-1246. DOI: 10.1007/s00122-011-1662-0
- Salih S.A., Herselman L., Labuschagne M.T., Mohammed A.H. Assessment of genetic diversity of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] germplasm in East and Central Africa. *World Journal of Biotechnology*. 2016;1(3):113-120.
- Schloss J., Mitchell E., White M., Kukatla R., Bowers E., Paterson H. et al. Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105(6-7):912-920. DOI: 10.1007/s00122-002-0991-4
- Shepel N.A. Breeding and seed production of hybrid sorghum (Selektsiya i semenovodstvo gibridnogo sorgo). Rostov-on-Don: Rostov University Publishers; 1985. [in Russian] (Шепель Н.А. Селекция и семеноводство гибридного сорго. Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского университета; 1985).
- Snowden J.D. Cultivated races of sorghum. London: Adlard and Sons; 1936.
- Srinivas G., Satish K., Madhusudhana R., Seetharama N. Exploration and mapping of microsatellite markers from subtracted drought stress ESTs in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(4):703-717. DOI: 10.1007/s00122-008-0931-z
- Stapf O. Gramineae, sorghum. In: D. Praln (ed.). *Flora of Tropical Africa*. Vol. 9. London; 1934. p.104-154.
- Taramino G., Tarchini R., Ferrario S., Lee M., Pe' M.E. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in *Sorghum bicolor*. *Theor. Appl. Genet.* 1997;95(1-2):66-72. DOI: 10.1007/s001220050533
- Tesfaye K. Genetic diversity study of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) genotypes, Ethiopia. *Acta Universitatis Sapientiae, Agriculture and Environment*. 2017;9(1):44-54. DOI: 10.1515/ausae-2017-0004
- Vavilov N.I. Phytogeographic basis of plant breeding (Botaniko-geograficheskiye osnovy selektsii). In: N.I. Vavilov (ed.). *The Scientific Bases of Plant Breeding. Vol. 1. Plant Breeding as a Science (Teoreticheskiye osnovy selektsii rasteniy. T. 1. Selektsiya kak nauka)*. Moscow, Leningrad: Selkhozgiz; 1935. p.17-74. [in Russian] (Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции. В кн.: Теоретические основы селекции растений. Т. 1. Селекция как наука / под ред. Н.И. Вавилова. Москва, Ленинград: Сельхозгиз; 1935. С.17-74).
- Vavilov N.I., Chester K.S. Phytogeographic basis of plant breeding. In: *The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants. Selected writings of N.I. Vavilov, translated from the Russian by K. Starr Chester: Chronica Botanica, Vol. 13*. Waltham, Mass.: Chronica Botanica Co.; 1951. p.14-53.
- Wang Y.H., Bible P., Loganantharaj R. Identification of SSR markers associated with height using pool-based genome-wide association mapping in sorghum. *Molecular Breeding*. 2012;30(1):281-292. DOI: 10.1007/s11032-011-9617-3
- Wiersema J.H., Dahlberg J. The nomenclature of *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Gramineae). *Taxon*. 2007;56(3):941-946. DOI: 10.2307/25065876
- Yakushevsky E.S. Species composition of sorghum and its use in breeding (Vidovoy sostav sorgo i ego selektsionnoye ispolzovaniye). *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*. 1969;41(2):148-178. [in Russian] (Якушевский Е.С. Видовой состав сорго и его селекционное использование. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1969;41(2):148-178).
- Zheng L.Y., Guo X.S., He B., Sun L.J., Peng Y., Dong S.S. et al. Genome-wide patterns of genetic variation in sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *Genome Biology*. 2011;12(11):R114. DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-r114

УСТОЙЧИВОСТЬ ЗЕМЛЯНИКИ К ОСНОВНЫМ ГРИБНЫМ ФИТОПАТОГЕНАМ: R-ГЕНЫ И ИХ ДНК-МАРКЕРЫ

Храбров И.Э.^{1*}, Антонова О.Ю.¹, Шаповалов М.И.², Семёнова Л.Г.³

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; ✉ *ivan.khrabrov95@mail.ru, olgaant326@mail.ru

² Лаборатория биоэкологического мониторинга беспозвоночных животных Адыгей НИИ комплексных проблем АГУ, Адыгейский государственный университет, 385016 Россия, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Первомайская, 208; ✉ shapmaksim2017@yandex.ru

³ Майкопская опытная станция – филиал ВИР, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), 385746 Россия, Республика Адыгея, Майкопский район, п. Подгорный, ул. Научная, д. 1; ✉ semenov50@mail.ru

Садовая земляника *Fragaria × ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier (1785) – многолетнее травянистое растение из семейства розоцветных (*Rosaceae*), возделываемое по всему миру. На её долю приходится больше половины объема мирового производства ягод. В России ежегодно выращивается более 200 тонн земляники садовой, но по данным отечественных учёных у данной культуры потенциал продуктивности намного больше. На урожайность земляники негативно влияют различные патогены, в том числе грибные инфекции. К числу важнейших грибных заболеваний земляники относятся антракнозная гниль (вызывается несколькими видами грибов-аскомицетов рода *Colletotrichum* Corda), гниль рожка земляники (возбудитель – *Phytophthora cactorum* Lebert & Cohn), фитофторозная корневая гниль (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman), фузариоз (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Winks & Williams) и мучнистая роса (*Podosphaera aphanis* [*Sphaerotheca macularis*] (Wallr.) U. Braun & S. Takam). В обзоре рассмотрены актуальные сведения об известных генах и локусах количественных признаков (QTL), контролирующих устойчивость к данным фитопатогенам, и представлена информация об ассоциированных с ними молекулярных маркерах разных типов (SDRF, RAPD, AFLP, SSR, SCAR, SNP и т.д.) в том числе о маркерах, используемых в практической селекции для молекулярного скрининга коллекций земляники.

Ключевые слова: *Fragaria × ananassa*, гены устойчивости, QTL, грибные болезни, *Colletotrichum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *Podosphaera aphanis*.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-3-03>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer. Все авторы одобрили рукопись. / All authors approved the manuscript. Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

STRAWBERRY RESISTANCE TO THE MAJOR FUNGAL PHYTOPATHOGENS: R-GENES AND THEIR DNA MARKERS

Khrabrov I.E.^{1*}, Antonova O.Yu.¹, Shapovalov M.I.², Semenova L.G.³

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia; ✉ *ivan.khrabrov95@mail.ru, olgaant326@mail.ru

² Laboratory of Bio-Ecological Monitoring of Invertebrate Animals in Adygeya Republic at the Research Institute for Complex Problems, Adyge State University, 208 Pervomayskaya Street, Maikop 385016, Russia; ✉ shapmaksim2017@yandex.ru

³ Maikop Experiment Station of VIR, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 1 Nauchnaya Street, Maikop 385746, Russia; ✉ semenov50@mail.ru

The garden strawberry *Fragaria × ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier (1785) is a perennial herbaceous plant of the *Rosaceae* family; it is cultivated all around the world. It accounts for more than half of the global volume of berries production. In Russia, more than 160 tons of garden strawberries are grown annually, but according to Russian scientists, this crop has a much higher productivity potential. Various pathogens, including bacterial, viral and fungal infections, negatively affect the productivity of strawberry. Anthracnose (caused by *Colletotrichum* Corda), crown rot (*Phytophthora cactorum* Lebert & Cohn), red core disease (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman), fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Winks & Williams) and strawberry powdery mildew (*Podosphaera aphanis* [*Sphaerotheca macularis*] (Wallr.) U. Braun & S. Takam) are among the most important fungal diseases of strawberry. This review discusses the current data about the known genes and quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance to listed plant pathogens. The review also offers information about molecular markers of different types: SDRF, AFLP, SSR, SCAR, SNP, associated with these genes/QTLs and used in the molecular screening of strawberry collections for practical purposes.

Key words: strawberries, *Fragaria × ananassa*, R-genes, QTL, fungal diseases, *Colletotrichum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *Podosphaera aphanis*

Для цитирования: Храбров И.Э., Антонова О.Ю., Шаповалов М.И., Семёнова Л.Г. Устойчивость земляники к основным грибным фитопатогенам: R-гены и их ДНК-маркеры. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(3):30-40. DOI: <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-3-03>

For citation: Khrabrov I.E., Antonova O.Yu., Shapovalov M.I., Semenova L.G. Strawberry resistance to the major fungal phytopathogens: R-genes and their DNA markers. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(3):30-40. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-3-03>

ORCID:

Khrabrov I.E. <https://orcid.org/0000-0002-1877-9468>
Antonova O.Yu. <https://orcid.org/0000-0001-8334-8069>
Shapovalov M.I. <https://orcid.org/0000-0002-5351-2873>
Semenova L.G. <https://orcid.org/0000-0001-6266-1339>

УДК 634.75:577.2:631.52:632.4
Поступила в редакцию: 07.11.2019
Принята к публикации: 09.12.2019

Введение

Земляника садовая или ананасная – *Fragaria* × *ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier (1785) – многолетнее травянистое растение, обладающее исключительной пищевой ценностью с хорошими вкусовыми качествами ягод. Благодаря наличию не только сахаров, органических кислот и пектинов, но и комплекса микро-нутриентов она является перспективным объектом здорового питания. Наибольшей ценностью земляники обладает в качестве источника витаминов С, полифенольных соединений (антоцианы, гидроксикоричные кислоты), фолатов, а также минеральных веществ – калия, железа (Akimov et al., 2019).

Земляника садовая возделывается в 75 странах мира, на ее долю приходится свыше 2/3 объема мирового производства ягод. В России под землянику отводят до 30-40% площадей, занимаемых всеми ягодниками. В настоящее время производственный объем земляники в РФ достигает примерно 230 тысяч тонн и ежегодно возрастает в среднем на 3,7% (Govorova, Govorov, 2019). Потенциал продуктивности земляники ананасной очень высок, по мнению российских ученых он может достигать 112 т/га (Porova et al., 1990), однако реальная урожайность намного ниже – средняя урожайность в мире составляет 12,8 т/га; в США – 37,1 т/га, Испании – 37,7 т/га, Японии – 12,8 т/га, (Pshikhacheva, 2012), в России – 6-8 т/га в разные годы (Govorova, Govorov, 2019).

Отрицательное влияние на урожайность оказывает целый ряд неблагоприятных факторов и, в том числе, различные грибные инфекции. К числу важнейших грибных заболеваний земляники относятся (антракнозная гниль (возбудитель – *Colletotrichum acutatum* Simmonds), гниль рожка земляники (*Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröte), фитофторозная корневая гниль (фитофторозное увядание) (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman), фузариоз (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Winks et Williams) и мучнистая роса – *Podosphaera aphanis* (Wallr.) U. Braun & S. Takam [*Sphaerotheca macularis* (Wall. ex Fries) Jazz f. sp. *fragariae* (Peries)]). Поражение возделываемых сортов этими болезнями приводит к значительному снижению продуктивности плантаций (от 15 до 92 %), а массовое развитие грибных заболеваний способно приводить к 100 % гибели урожая (Govorova, 2004; Folta, Davis, 2006; Smith, 2008; Newton et al., 2010). В последнее время в связи с изменением климата, активным импортом посадочного материала, обменом им внутри страны и влиянием узкоспециализированных фунгицидов происходит расширение ареалов грибных патогенов земляники, а также появление новых видов/рас возбудителей. Поэтому задача создания новых сортов, устойчивых к грибным патогенам, является чрезвычайно актуальной. Огромную помощь при этом может оказать метод маркер-вспомогательной селекции, использующий ДНК-маркеры, ассоциированные с генами устой-

чивости на молекулярно-генетических картах.

Однако для молекулярно-генетического анализа *F.* × *ananassa* является сложным объектом. Этот октоплоидный вид ($2n = 8x = 56$) представляет собой межвидовой гибрид между американскими видами *F. chiloensis* (L.) Mill. и *F. virginiana* Duch, спонтанно возникший более 250 лет назад при их совместном выращивании в Европе (Darrow, 1966). Согласно современным представлениям, родительские виды были образованы путем слияния и взаимодействия геномов четырех диплоидных видов – предшественников – *F. vesca* L., *F. nipponica* Lindl., *F. iinumae* Makino, *F. viridis* Duch (Edger et al., 2019). На основании изучения сегрегации хромосом у *F.* × *ananassa* было предложено несколько вариантов геномных формул: вариант AABBBBCC, предполагающий один тетраплоидный и два диплоидных субгенома (Федорова, 1946), варианты AAA'A'BBBB и AAA'A'BBB'B', в которых два генома имели большую или меньшую степень дивергенции (Senanayake and Bringham, 1967; Bringham, 1990). Позднее было показано, что для большинства ядерных генов садовой земляники наблюдается дисомическое наследование (Ashley et al. 2003), то есть геном *F.* × *ananassa* сформирован четырьмя разными субгеномами, которые было предложено обозначать символами A, B, C и D. При этом субгеном, унаследованный от *F. vesca*, является «доминирующим», его последовательности более полно представлены в геноме *F.* × *ananassa* по сравнению с последовательностями других видов-предшественников – на 20.2% больше белок-кодирующих и на 14.2% lncRNA (long non-coding RNA) генов. Соответственно, порядок букв при обозначении субгеномов соответствует степени их близости к геному *F. vesca* (Edger et al., 2019). Размер генома *F.* × *ananassa* оценивается в 708–720 Mb (Akiyama et al., 2001), он полностью секвенирован с использованием технологий Next Generation Sequencing или NGS (Hirakawa et al., 2014; Edger et al., 2019).

Сложность генома *F.* × *ananassa* требует специальной стратегии для картирования генов, в том числе генов устойчивости. Ранее было предложено использовать маркеры SDRF- (Single Dose Restriction Fragment) (Wu et al., 1992). Под SDRF понимают фрагменты ДНК, присутствующие только в одной хромосоме только одного из родителей и сегрегирующие в соотношении 1:1 независимо от пloidности организма. При построении карт сцепления отдельно учитывают сегрегацию SDRF маркеров материнской формы (Aaaaaaaa × aaaaaaaa) и отцовской (aaaaaaa × Aaaaaaaa), в результате получают материнские и отцовские карты сцепления (Lerceteau-Köhle et al., 2003). Для каждого из субгеномов были также разработаны подробные карты хромосом при помощи микросателлитных маркеров (van Dijk et al., 2014). В настоящее время практически все работы по генотипированию и картированию у *F.* × *ananassa* основываются на технологии ДНК-микрочипирования. Чаще всего используют чип *IStraw90* Axiom® на базе

платформы Affymetrix®. ДНК-чипирование земляники позволяет проводить генетический анализ, включая создание карт сцепления высокой плотности, анализ GWAS® (genome – wide association studies – полногеномный поиск ассоциаций), идентификацию локусов количественных признаков, обеспечивая тем самым основу для молекулярной селекции этой высокоценной культуры (Bassil et al., 2015). В данном обзоре мы рассматриваем известные на настоящий момент у земляники гены устойчивости к грибным патогенам и ассоциированные с ними маркеры, в том числе пригодные для практического применения в MAS (маркер-опосредованная селекция).

Антракнозная (черная) гниль – патоген *Colletotrichum acutatum*

Болезнь вызывают несколько видов грибов-аскомицетов рода *Colletotrichum*: *C. fragariae* Brooks, *C. gloeosporioides* Penz. (Sacc.) Ston и *C. acutatum* (Kotova, Kungurtseva, 2014; Govorova, Govorov, 2019).

Наиболее часто растения земляники в Европе поражает *C. acutatum* (Govorova, Govorov, 2019). До недавнего времени в России возбудитель антракноза не был характерен для микобиоты земляники, однако в последние годы в связи с массовым завозом зарубежного посадочного материала *C. acutatum* выявляют на насаждениях земляники не только в южной зоне, но и в средней полосе РФ (Holod et al., 2018). Возможно также поражение земляники другим патогеном – *C. gloeosporioides* (Kotova, Kungurtseva, 2014). Антракнозная гниль наносит посадкам земляники большой ущерб, в некоторых случаях приводя к потере 80% урожая (Metlitsky et al., 2007). Большинство сортов земляники в разной степени восприимчивы к *C. acutatum* (Metlitsky et al., 2007; Leandro et al., 2001).

Для *C. acutatum* выделено значительное количество изолятов, которые относят к двум группам патогенности. В работе французских исследователей из 14 изолятов 10 были способны поражать сорта земляники «Addie», «Sequoia» и «Dover» (1 группа патогенности), в то время как 4 изолята группы патогенности 2 были вирулентны для сорта «Addie», но не поражали сорта «Sequoia» и «Dover» (Denoyes, Baudry, 1995).

Устойчивость к расам *C. acutatum* первой группы патогенности носит полигенный характер, что было показано в работе Denoyes-Rothan с соавторами (2004). Авторы использовали уже известную молекулярно-генетическую карту *F. × ananassa*, которая была разработана с использованием различных типов маркеров, в том числе маркеров SDRF (Lerceteau-Köhler et al., 2003). Материнская карта состояла из 263 маркеров (244 AFLP, 13 SSR и 6 SCAR), распределенных по 47 группам сцепления, на отцовской карте 322 маркера (279 AFLP, 26 SSR и 3 SCAR) распределились по 45 группам сцепления.

Было обнаружено 5 QTL устойчивости к *C. acutatum* первой группы патогенности (изолят 494a), из которых 3 QTL были локализованы в группах сцепления материнской карты и 2 QTL в группах сцепления отцовской карты (Denoyes-Rothan, et al., 2004). Недавно использование методов ДНК-микрочипирования и GWAS – анализа позволило выявить на хромосоме 6В основной локус *FaRca1*, контролирующей устойчивость к изолятам первой группы патогенности (02-163, 02-179 и 03-32) (Salinas et al., 2019). Изменчивость по гену *FaRca1* объясняла по меньшей мере 50% фенотипической дисперсии по признаку устойчивости к *C. acutatum*. Авторы выделили несколько SNP-маркеров, сцепленных с *FaRca1* (AX-89796486, AX-89838962 AX-89808208, AX-89838986 и AX-89896208), однако маркеров для практической MAS селекции на их основе разработано не было (Salinas et al., 2019).

Моногенная устойчивость у земляники выявлена к расам *C. acutatum* второй группы патогенности. Она контролируется доминантным геном *Rca2*. Картирование данного гена было проведено для популяции из 113 гибридов F_2 от скрещивания сорта «Capitola» и селекционного клона CF1116. Авторы применили AFLP-анализ, причем из совокупного числа фрагментов (789) были отобраны только 727, подходившие под критерии маркеров SDRF (смотри ранее). В результате были построены две карты: материнская (F) – покрытие 1,604 cM, 235 маркеров и отцовская (M) – 1,496 cM, 280 маркеров (Lerceteau-Köhler al., 2003). На картах методом сегрегационного bulk-анализа (BSA-Bulked segregant analysis) картировали ген *Rca2* и идентифицировали сцепленные с ним AFLP-маркеры mf1, mf2, mf3 и mf4. Два из них были конвертированы в ПЦР-маркеры STS-*Rca2*_240 и STS-*Rca2*_417. Ген *Rca2* был картирован на расстоянии 2,8 cM от маркера STS-*Rca2*_240 и 0,6 cM от маркера STS-*Rca2*_417 (Guerin et al., 2003; Lerceteau-Köhler et al., 2005).

Маркер STS-*Rca2*_240 активно использовался в молекулярном скрининге различных коллекций земляники в том числе и российскими исследователями (таблица). В работе И.В. Лукьянчука с соавторами (Lukyanchuk, 2018) проведен молекулярный скрининг сортов земляники как отечественной («Ласточка», «Привлекательная», «Урожайная ЦГЛ», «Фейерверк», «Флора», «Яркая»), так и зарубежной селекции, а также образцов дикорастущих видов рода *Fragaria* L. (*F. orientalis* Los., *F. moschata* Duch., *F. ovalis* Rydb., *F. virginiana* Rydb. ssp. *platypetala*). Диагностический фрагмент маркера STS-*Rca2*_240 присутствовал только у зарубежного сорта «Laetitia». А.С. Лыжин с соавторами (Lyzhin et al., 2019) проводили оценку аллельного состояния гена устойчивости к антракнозу *Rca2* для 24 российских и 15 зарубежных сортов. В результате ПЦР-анализа маркер STS-*Rca2*_240 был идентифицирован у двух зарубежных сортов «Elianny», «Troubadour» и у одного отечественного – «Сударушка» (Lyzhin et al., 2019).

Маркер STS-Rca2_417 применяют реже, несмотря на то, что показана его большая эффективность в выявлении устойчивых к *C. acutatum* сортов. Так, в работе E. Lerceteau-Köhler et al. (2005) из 28 устойчивых сортов 13 (46,4%) имели диагностические фрагменты обоих маркёров, и еще 8 (28,6%) – только маркера STS-Rca2_417. Связь с устойчивостью не была абсолютной – 7 устойчивых сортов (25,0%) вообще не детектировали диагностических фрагментов. Некоторые авторы (Miller-Butler et al., 2019) сообщают о полной неэффективности обоих маркеров для молекулярного скрининга, однако в данной работе отсутствие взаимосвязи устойчивости и маркера можно объяснить методическими проблемами – помимо диагностического фрагмента авторы выявляли у сортов земляники неспецифичные ПЦР-продукты различной длины (Miller-Butler et al., 2019).

Генетика устойчивости к *C. gloeosporioides* была изучена в работе Anciro с соавторами (2018) методом GWAS-анализа. На базе платформы Affymetrix® с использованием ДНК чипов IStraw90 Axiom®

и IStraw35 384HT Axiom® произведено SNP генотипирование 24 родительских линий и гибридов от различных комбинаций их скрещиваний – всего 1621 клон с известной устойчивостью. На полученной карте в группе сцепления LG6B был идентифицирован один основной локус *FaRCg1*, ассоциированный с 18-ю SNP-маркерами. Следует отметить, что на хромосоме LG6B картирован также основной ген устойчивости *FaRCa1* к другому возбудителю антракноза земляники – *C. acutatum* (Salinas et al., 2019). Вероятно, в этой области располагается кластер генов, контролирующих устойчивость к представителям рода *Colletotrichum*.

Ассоциированные с геном *FaRCg1* SNP-маркеры были конвертированы в маркеры для HRM-анализа (High-Resolution Melting или анализ кривых плавления с высоким разрешением). Максимальную связь с устойчивостью показали маркеры AX-89864339 (положение в LG6B 67.43 cM) и AX-89906235 (положение в LG6B 68.88 cM). В скрининге коллекций земляники эти маркеры пока не использовались, однако не исключено, что они ока-

Таблица. Результаты молекулярного скрининга коллекций сортов земляники с использованием маркеров STS-Rca2_240 и STS-Rca2_417 по данным литературы.

Table. Results of molecular screening of strawberry collections using STS-Rca2_240 and STS-Rca2_417 markers according to the literary sources.

№	Литературный источник	Изученный материал	Присутствие маркера STS-Rca2_240 у сорта	Присутствие маркера STS-Rca2_417 у сорта
1	Lukyanchuk et al., 2018	6 отечественных сортов, 12 зарубежных сортов.	«Laetitia»	Не изучали
2	Lyzhin et al., 2019	24 отечественных сорта, 15 зарубежных сортов.	«Elianny», «Troubadour», «Сударушка»	Не изучали
3	Lerceteau-Köhler et al., 2005	43 сорта: 28 устойчивых (R) 14 поражаемых (S) 1 умеренно устойчивый (R/S)	13 сортов. Совпадение с устойчивостью 62,8 %	22 сорта. Совпадение с устойчивостью 81,4%
4	Miller-Butler et al., 2019	31 сорт: 6 устойчивых (R) 25 поражаемых (S)	22 сорта. Маркер признан неэффективным.	21 сорт. Маркер признан неэффективным.
5	Njuguna, 2010	112 сортов.	36 сортов. Данные по устойчивости не приведены	Не изучали
6	Sturzeanu et al., 2016	6 сортов.	«Benton» совпадение с устойчивостью 100 %	Не изучали
7	Sturzeanu et al., 2017	17 сортов	7 сортов. Совпадение с устойчивостью 57,1 %	Не изучали

жуются эффективными для выявления устойчивых форм (Anciro et al., 2018).

Фитофтороз (фитофторозное увядание)

Фитофтороз, или фитофторозное увядание земляники, вызывают псевдогрибы из рода *Phytophthora* de Bary, относящегося к семейству *Pythiaceae* Pringsh, отдел *Oomycota* G. Winter. На землянике паразитируют два вида этого рода. Первый – *Ph. cactorum* вызывает гниль рожка земляники, заболевание также называют фитофторозной кожистой гнилью. Другим представителем рода *Phytophthora*, наносящим большой вред плантациям земляники, является возбудитель фитофторозной корневой гнили *Ph. fragariae* var. *fragariae* (Govorova, Govorov, 2019).

Гниль рожка земляники – патоген *Phytophthora cactorum*

Впервые *Ph. cactorum* был описан как патоген кактусов в 1870 году. Вид имеет широкий спектр хозяев – более 250 видов растений, в том числе и садовая земляника. Методом AFLP-анализа идентифицировано значительное число изолятов *Ph. cactorum* (Eikemo et al., 2004), при этом изоляты, поражающие землянику, отличаются по своему генетическому составу от паразитирующих на других культурах (Eikemo et al., 2004; Bhat et al., 2006).

На землянике *Ph. cactorum* впервые был отмечен в Германии в 1952 году (Deutschmann, 1954). К настоящему времени болезнь широко распространена не только за рубежом, но и в нашей стране – она отмечена в большинстве регионов, где выращивают землянику – в 17 из 23 (Golovin, 2010).

Патоген вызывает корневую гниль земляники, гниение и дисфункцию сосудистой системы, а также гниль плодов. Он наносит большой ущерб как плантациям, так и маточникам (Govorova, Govorov, 2019); в Краснодарском крае, по данным Говоровой Г.Ф., от этого заболевания гибнет 5-30 % растений, а поражение плодов в зависимости от восприимчивости сорта и погодных условий колеблется от 3,8 до 91,7 % (Govorova, 1992).

Устойчивые к гнили рожка земляники формы обнаруживаются среди сортов садовой земляники, в популяциях диких диплоидных видов и полиплоидных видов *F. chiloensis* и *F. virginiana* – предполагаемых предков *F. × ananassa* (Harrison et al., 1998; Eikemo et al., 2010). В работах многих авторов было показано, что устойчивость у *F. × ananassa* контролируется полигенно, при этом характер устойчивости не зависит от расового состава патогена и не укладывается в модель наличия одного основного гена и нескольких генов-модификаторов (Denoyes-Rothan et al., 2004; Shaw et al., 2006, 2008; Nellist et al., 2019).

Denoyes-Rothan с соавторами (2004) с использова-

нием картирующей популяции от скрещивания «Cari-tola» × «CF116» (185 растений) выявили в совокупности 5 QTL устойчивости к *Ph. cactorum*. Два QTL были локализованы на группах сцепления материнской карты и три – на группах сцепления отцовской карты (Denoyes-Rothan et al., 2004; Lerceteau-Köhler et al., 2004). Аддитивное влияние нескольких генов было показано и при изучении сегрегации устойчивости в популяциях потомков 50 комбинаций скрещиваний селекционных сортов (Shaw et al., 2008).

Mangandi с соавторами (2017) провели исследование устойчивости *F. × ananassa* к гнили рожка земляники с использованием комплексных популяций (более 1100 семян из 139 семей), полученных при скрещивании 61 сорта. Все родительские формы и семена генотипировали на базе платформы Affymetrix® с использованием ДНК чипов IStraw90 Axiom®. Основным локус устойчивости к *Ph. cactorum* – *FaRPe2* – был картирован в группе сцепления LG7D. В этой области выявили 19 связанных с устойчивостью SNPs, сочетания аллелей которых формировали 14 уникальных гаплотипов. Четыре из них (¹H-H4) были широко распространены в протестированных популяциях. Гаплотипы ¹H и H4 определяли восприимчивость к патогену, а гаплотипы H2 и H3 – устойчивость, при этом H2 и H3 доминировали над ¹H и H4. Гаплотипы H2 и H3 были маркированы специфическими SNP-вариантами. Совместная сегрегация этих аллельных вариантов с устойчивостью была показана у гибридов комбинации «Holiday» × «Korona», в которой сорт «Holiday» имел гаплотип H3, а сорт «Korona» – H2. Таким образом, данные SNP-маркеры могут быть использованы для проведения молекулярного скрининга коллекций земляники (Mangandi et al., 2017).

Еще три QTL, связанные с устойчивостью к *Ph. cactorum* – *FaRPe6C*, *FaRPe6D* и *FaRPe7D* – были обнаружены у потомков (181 генотип) двуродительского скрещивания «Emily» × «Fenella», в котором сорт «Fenella» проявлял устойчивость к гнили рожка земляники. В работе была использована платформа Affymetrix® с применением микрочипов IStraw90 Axiom® Array28 и Axiom® IStraw35 384HT. Молекулярно-генетическая карта IStraw90 состояла из 11 598 SNP-маркеров, распределенных по 28 группам сцепления, соответствующим каждой из семи хромосом в четырех субгеномах *F. × ananassa*. Карта Straw35 насчитывала 8 348 SNP-маркеров, также распределенных по 28 хромосомам. QTL *FaRPe6C*, *FaRPe6D* и *FaRPe7D* – были расположены в группах сцепления 6C, 6D и 7D в непосредственной близости от SNP-маркеров Affx88882258, Affx88880166 и Affx88902178 соответственно. Еще несколько SNPs было выявлено при помощи GWAS-анализа 114 генотипов земляники с известной устойчивостью к *Ph. cactorum* – два маркера (Affx88897773 и Affx88897860B) в группе LG7A и по одному маркеру в группах LG5D (Affx88859864) и LG7D (Affx88900641). Эти маркеры не были связаны с QTL, выделившимися при анализе потомков двуродительских скрещиваний (Nellist et al., 2019). Насколько нам известно, ни один из этих SNP-вариантов в настоящее время

не был конвертирован в маркеры для использования в молекулярной селекции.

Фитофторозная корневая гниль – патоген *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*.

Заболевание было впервые описано в Шотландии в районе Ланкашира в 1920 году, поэтому первоначально оно называлось Ланкаширская болезнь. В настоящее время этот вид фитофторозного увядания встречается практически по всему миру (Whitaker, 2011). В России патоген был впервые обнаружен и идентифицирован Г.Ф. Говоровой в 1962 году на Северном Кавказе (Govorova, 1964).

Для зараженных растений характерно разрушение корневой системы. Отгнивание кончиков корней сообщает им характерный вид «крысиных хвостов». Наземная часть растения образует мало побегов, молодые листья становятся сине-зеленого цвета, а старые приобретают красно-желтую или коричневую окраску. Слабо пораженные растения способны к плодоношению, однако происходит резкое снижение урожайности (Govorova, Govorov, 2019). Визуальная диагностика патогена затруднена сходством симптомов поражения с воздействием стрессовых факторов абиотической природы (De los Santos et al., 2004; Alexandrov et al., 2007).

В работе van de Weg (1989) на основе анализа заражения сортов земляники различными изолятами *Ph. fragariae* var. *fragariae* было показано, что устойчивость к корневой гнили соответствует концепции «ген на ген». Позднее у земляники идентифицировали 5 генов, контролирующих устойчивость к генам *Avr1–Avr5*, которые присутствовали у 11 изолятов патогена различного происхождения (van de Weg 1997a). В европейских селекционных программах устойчивость к корневой гнили определяется в основном присутствием генов *Rpf1*, *Rpf2* и *Rpf3*, сорта селекции США также несут ген *Rpf1* в комбинации с *Rpf2 u/или Rpf3* (van de Weg, 1997a, b).

Ген *Rpf1* контролирует устойчивость не менее чем к 16 расам *Ph. fragariae* var. *fragariae*, включая североамериканские изоляты A1, A2, A3, A4, A6, A9, A10, NS1 и NS2 (Nickerson, Murray 1993; Van de Weg 1997a). В работе Haymes с соавторами (1997) функциональный аллель гена *Rpf1* был ассоциирован с рядом RAPD-маркеров (OPO-16C₄₃₈, OPO-8A₁₄₅₀, OPC-8D₅₁₀), позднее полиморфные RAPD-фрагменты были конвертированы в SCAR-маркеры SCAR-RIA и SCAR-RIB (Haymes et al., 2000). Маркер SCAR-RIA при скрининге сортов и селекционных клонов земляники продемонстрировал хорошую связь с устойчивостью (Haymes et al., 2000; Njuguna, 2010; Sturzeanu et al., 2016, 2017), которая, однако, не была абсолютной. Например, Haymes с соавторами (2000) выявили диагностический фрагмент 285 пн только у 23 из 34 устойчивых к корневой гнили генотипов, при этом маркер присутствовал у поражаемого сорта «Cambridge Vigour». Аналогично, среди 14 сортов, проскринированных в работе W. Njuguna (2010) (всего 112 образцов) и имевших диагностический фрагмент, присут-

ствовал восприимчивый сорт «Aberdeen». С другой стороны, маркер SCAR-RIA не был выявлен у устойчивых к корневой гнили сортов «Allstar», «Darrow» и «MD 683».

Отечественные исследователи также использовали маркер SCAR-RIA для определения доминантой аллели гена *Rpf1*. Лукьянчук с соавторами (Lukyanchuk et al., 2018) провели анализ 22 образцов земляники различного эколого-географического происхождения из коллекции ФНЦ им. И.В. Мичурина, в том числе 18 сортов российской и зарубежной селекции. Диагностический фрагмент маркера SCAR-RIA (285 пн), не был детектирован ни в одном из изученных сортов, что предположительно свидетельствует о рецессивном гомозиготном состоянии гена *Rpf1* у изучаемых генотипов (Lukyanchuk et al., 2018).

Другие гены устойчивости к *Ph. fragariae* var. *fragariae* изучены слабо. Ген *Rpf2* присутствует в таких сортах как «Climax», «Redgauntlet», «Siletz» и «Sparkle» (Van de Weg, 1997b), насколько нам известно, он не картирован. Гены *Rpf3* и *Rpf6* у устойчивого сорта «Yalova-4» были картированы при помощи AFLP-анализа и ассоциированы с маркерами E36M59H и E39M51B соответственно (Haymes et al., 1998; Hokanson, Maas, 2010). Однако конвертация полиморфных AFLP-фрагментов в маркеры для практического молекулярного скрининга не проводилась.

Мучнистая роса – патоген *Podosphaera aphanis* [*S. phaeotheca macularis*]

Мучнистая роса земляники, вызываемая облигатным патогеном *P. aphanis* из рода аскомицетных грибов *Podosphaera* Kunze (семейство *Erysiphaceae*), является одним из наиболее вредоносных заболеваний этой культуры. В США потери урожая у восприимчивых сортов превышают 60% (Horn et al., 1972), в России потери урожая достигают до 100%, могут гибнуть и сами растения (Govorova, Govorov, 2004).

Устойчивость земляники к мучнистой росе считается комплексным признаком, находящимся под контролем нескольких генов (Darrow, 1966; Зубов, Петрова, 1973; Зубов, 1992; Simpson, 1987). В разных работах наследуемость этого признака – *H2* – оценивают в пределах 0.44–0.71 (Nelson et al., 1995), 0.44–0.50 (Davik, Honne, 2005), 0.46–0.56 (Lifshitz et al., 2007). При этом на степень проявления признака влияют как аддитивные, так и неаддитивные компоненты (Simpson 1987; Davik and Honne 2005). Существуют данные о влиянии на устойчивость цитоплазматических генов (Harland, King, 1957), хотя в других работах эта точка зрения не находит подтверждения (Davik, Honne, 2005; Govorova, Govorov, 2019). Кроме того, выраженность признака может зависеть от плейотропного проявления других генов, например, сильная положительная корреляция ($r = 0,86 \pm 0,01$) была выявлена между устойчивостью к *P. aphanis* и толщиной кутикулы листьев (Зубов, 1992).

В связи со сложностью признака, до недавнего времени генетика устойчивости *F. × ananassa* к мучнистой росе оставалась слабо изученной. Новые возможности в этой области появились с развитием методов NGS и ДНК-чипирования. В работе Н. Cockerton с соавторами (2018) QTL устойчивости к мучнистой росе были картированы при помощи платформы Affymetrix® с использованием чипов Axiom® iStraw90 (около 90000 SNP-маркеров). При генотипировании двух расщепляющихся популяций – потомков скрещиваний «Emily» × «Fenella» и «Redgauntlet» × «Napil» в совокупности было выявлено 12 количественных локусов устойчивости, однако в каждой из изученных комбинаций выявленные QTL были различными. Наиболее значимым для комбинации «Emily» × «Fenella» оказался локус *FarPa1C* (хромосома 1C), ассоциированный с маркером Affx.88811437, в то время как в комбинации «Redgauntlet» × «Napil» – локус *FarPa6D2* (хромосома 6D) и ближайший к нему маркер – Affx.88904022. Большинство QTL при объединении в одном генотипе демонстрировали кумулятивный эффект (Cockerton et al., 2018).

В последнем исследовании Sargent с соавторами (2019) популяция из 145 гибридных семян на основе скрещивания «Sonata» × «Babette» была генотипирована при помощи маркеров ddRAD (double digest Restriction-site Associated DNA) и SNP из массива Axiom® iStraw90k (i90k). Авторам удалось выявить три значимых QTL устойчивости к мучнистой росе – *FxaPMR7A*, *FxaPMR7X2* и *FxaPMR5b*, два из них были идентифицированы в полевых экспериментах и один – в опытах с тепличными растениями. В названиях QTL отражены группы сцепления, в которых они картированы, при этом названия субгеномов (A, b, X1 и X2) даны в соответствии с картой, ранее разработанной этой группой авторов (Sargent et al., 2016). Локусы *FxaPMR7A*, *FxaPMR7X2* и *FxaPMR5b* ассоциированы с маркерами: 8082 (LOD = 9.74, процент объясненной дисперсии 34.2%), AX-89800832 (LOD = 5.17, процент объясненной дисперсии 19%) и AX-89836603 (LOD = 4.97, процент объясненной дисперсии 18.3%) соответственно, где LOD – Levels Of Detail или уровни детализации. Путем привязки перечисленных маркеров к полногеномному сиквенсу *F. vesca* v4.0 удалось определить положение QTL на физической карте и определить кандидаты в гены устойчивости. Так, в соответствующем локусу *FxaPMR7A* районе хромосомы 7A был идентифицирован кластер генов, относящихся к классу TIR-NBS-LRR (Sargent et al., 2019). Однако маркеры для практического скрининга пока не разработаны.

Вероятно, слабое развитие генетики устойчивости земляники к мучнистой росе способствовало началу работ в другом направлении – блокировании *S*-генов «восприимчивости» (susceptibility). Белковые продукты этих генов необходимы для проникновения гифов гриба в растение, соответственно, их отсутствие затрудняет это проникновение и тем самым способствует устой-

чивости к патогену. Устойчивость за счет инактивации *S*-генов носит рецессивный характер, при этом обеспечивается защита растения одновременно от нескольких рас патогена, или даже от разных патогенов. Из числа *S*-генов у различных культур наиболее изучен ген *MLO* (mildew resistance locus). Впервые он был идентифицирован у ячменя (Büschges et al., 1997). Впоследствии его обнаружили у целого ряда культурных растений – ячмень, томат, горох, кабачок и т.д. Гены *MLO* кодируют специфичные белки растений, молекулы которых имеют семь трансмембранных спиралей и С-терминальный кальмодулин-связывающий домен. Идентификация *MLO*-подобных последовательностей была проведена и для земляники (Jambagi and Dunwell, 2017). Для этого использовали известную последовательность гена *MLO* дикой сливы *Prunus americana* Marsh., поиск ее гомологов выявил в геноме *F. vesca* не менее 16 *MLO*-генов (*FvMLO*). RNA-seq-анализ (секвенирование РНК) двух сортов земляники показал, что 12 из этих генов экспрессируются при заражении растений земляники мучнистой росой. Авторы делают вывод о возможности создавать устойчивые к мучнистой росе формы, подавляя *MLO*-гены земляники методами генной инженерии и/или геномного редактирования (Jambagi, Dunwell, 2017). Действительно, при трансформации растений *F. × ananassa* конструкциями, содержащими в двух разных ориентациях ген *PpMlo1* персика, экспрессия антисмысловой последовательности данного гена в трансгенных линиях земляники придавала им устойчивость к мучнистой росе (Jiwan et al. 2013).

Фузариозное увядание – патоген *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*.

Фузариозное увядание или фузариоз – заболевание культурных и диких растений, вызываемое анаморфными аскомицетовыми грибами из рода *Fusarium* Link (семейство Nectriaceae). Возбудитель фузариоза земляники *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* был впервые описан в Австралии в 1965 году. Заражение растений может приводить к значительным потерям урожая (до 50%) и гибели розеток (Govorova, Govorov, 2019). Меры борьбы до недавнего времени включали обработку почвы фунгицидами, при этом наиболее часто использовали метилбромид в сочетании с хлорпикрином (Lloyd, Gordon, 2016). Эти химикаты, однако, были запрещены как разрушающие озоновый слой атмосферы, а равноценная замена им пока отсутствует. Поэтому усилия селекционеров разных стран направлены на создание устойчивых к фузариозу сортов (Takahashi et al., 2003; Paynter et al., 2014).

Однако устойчивость земляники к фузариозу остается мало изученной, генетические факторы контроля пока не определены, а данные разных исследователей о наследовании признака противоречат друг другу.

М. Paynter с соавторами (2014) при изучении 14 расщепляющихся популяций потомков от самоопыления и попарного скрещивания четырех сортов *F. ananassa*, (два из которых – «Festival» и «Sugarbaby» – были устойчивы к возбудителю фузариоза) сделали вывод в пользу количественного характера устойчивости с высокой аддитивной составляющей. Японские ученые (Mori et al., 2005) в популяциях, полученных от скрещивания «Asuka Wave» × «Sanchiigo» наблюдали сегрегацию одного гена, сопровождающуюся значительной фенотипической дисперсией внутри групп устойчивых и поражаемых генотипов.

Значительный вклад в решение этого вопроса вносит недавнее исследование Pincot с соавторами (2018). Методом GWAS-анализа были изучены 565 образцов коллекции земляники, а также расщепляющиеся популяции потомков от самоопыления сортов «Fronteras» и «Portola». Для генотипирования был использован микрочип Affymetrix® IStraw35 Axiom, всего было проанализировано 14408 SNP-маркеров. Авторы идентифицировали один доминантный ген *Fw1* и картировали его в группе сцепления 2C; результаты картирования для двух расщепляющихся популяций совпадали. Скрининг коллекции образцов земляники показал, что именно ген *Fw1* обеспечивает устойчивость к *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* у подавляющего большинства современных сортов (Pincot et al., 2018).

Ген *Fw1* был ассоциирован с 11 SNP-маркерами, один из которых – AX-166521396 – находился в неравновесном сцеплении с устойчивостью. В последовательности маркера AX-166521396 для доминантной аллели *Fw1* (устойчивость) был характерен SNP-вариант А (аденин), а для рецессивной аллели (восприимчивость) – SNP-вариант G (гуанин). С помощью маркера AX-166521396 оказалось возможным предсказать фенотипы устойчивости к фузариозному увяданию у 97% протестированных образцов: большинство генотипов А/А и А/Г были устойчивыми, тогда как большинство генотипов G/G восприимчивыми. Только семь генотипов G/G были устойчивы и, вероятно, содержали другие, еще не идентифицированные гены устойчивости к *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*. Таким образом, AX-166521396 оказался перспективным для использования в MAS (Pincot et al., 2018).

Заключение

Развитие методов молекулярной биологии на современном этапе делает возможным значительное ускорение селекционного процесса за счет использования маркеров функциональных аллелей генов хозяйственно-ценных признаков и, в частности, генов устойчивости к патогенам. Для садовой земляники, имеющей сложный октоплоидный геном, только технология молекулярных маркеров

позволяет создавать генетические карты и локализовать на них гены устойчивости. Особенно большие успехи были достигнуты в последние годы благодаря методам секвенирования нового поколения – картированы гены устойчивости к *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *Ph. cactorum* и другим заболеваниям, на физической карте генома земляники определены гены-кандидаты, потенциально контролирующие устойчивость, выявлены ассоциированные с устойчивостью маркеры. Однако инструментарий для практического проведения молекулярного скрининга у земляники все еще ограничен. На практике используют небольшое число маркеров – SCAR маркеры гена *Rca2* (устойчивость к антракнозу) и гена *Rpfl* – (устойчивость к *Ph. fragariae* var. *fragariae*). Для генов *FaRCa1* (устойчивость к *C. gloeosporioides*) и *Fw1* (устойчивость к *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*) разработаны соответственно HRM- и SNP-маркеры, но данных по их использованию в MAS пока не приводится. Расширение числа маркеров для молекулярного скрининга земляники, разработка маркеров недавно картированных методами NGS-анализа генов *FxaPMR* (устойчивость к мучнистой росе), *FaRPe* (устойчивость к гнили рожка) и других – задачи работы будущих исследователей.

*Работа выполнена в рамках
тематического плана 0481-2019-0002.*

References / Литература

- Akimov M.Yu., Zhdanova E.V., Makarov V.N., Perova I.B., Shevyakova L.V., Vrzhesinskaya O.A. et al. Nutrient value of fruit in promising strawberry varieties. *Problems of Nutrition*. 2019;88(2): 64-72. [in Russian] (Акимов М.Ю., Жбанова Е.В., Макаров В.Н., Перова И.Б., Шевякова Л.В., Вржесинская О.А. и др. Пищевая ценность плодов перспективных сортов земляники. *Вопросы питания*. 2019;88(2):64-72). DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10019
- Akiyama Y., Yamamoto Y., Ohmido N., Oshima M., Fukui K. Estimation of the nuclear DNA content of strawberries (*Fragaria* spp.) compared with *Arabidopsis thaliana* by using dual system flow cytometry. *Cytologia*. 2001;66(2):431-436. DOI: 10.1508/cytologia.66.431
- Aleksandrov I.N., Skripka O.V., Dudchenko I.P., Surina T.A., Nikiforov S.V. Red stele root rot in strawberry. *Zashchita i karantin rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2007;5:3234. [in Russian] (Александров И.Н., Скрипка О.В., Дудченко И.П., Сурина Т.А., Никифоров С.В. Фитофтороз земляники. *Защита и карантин растений*. 2007;5:3234).
- Anciro A., Mangandi J., Verma S., Peres N., Whitaker V.M., Lee S. *FaRCgl*: a quantitative trait locus conferring resistance to *Colletotrichum* crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in octoploid strawberry. *Theor Appl Genet*. 2018;131(10):2167-2177. DOI: 10.1007/s00122-018-3145-z
- Ashley M.V., Wilk J.A., Styan S.M.N., Craft K.J., Jones K.L., Feldheim K.A. et al. High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae). *Theor Appl Genet*. 2003;107(7):1201-1207. DOI: 10.1007/s00122-003-1370-5
- Bassil N.V., Davis T.M., Zhang H., Ficklin S., Mittmann M., Webster T. et al. Development and preliminary evaluation of a 90 K Axiom® SNP array for the allo-octoploid cultivated strawberry *Fragaria* × *ananassa*. *BMC Genomics*. 2015;16:155. DOI: 10.1186/s12864-015-1310-1
- Bhat R.G., Colowit P.M., Tai T.H., Aradhya M.K., Browne G.T. Genetic and pathogenic variability in *Phytophthora cactorum* affecting fruit and nut crops in California. *Plant Disease*. 2006;90(2):161-

169. DOI: 10.1094/PD-90-0161
- Bringham R.S. Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. *HortScience*. 1990;25(8):879-881. DOI: 10.21273/HORTSCI.25.8.879
- Büschges R., Hollricher K., Panstruga R., Simons G., Wolter M., Frijters A. et al. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*. 1997;88(5):695-705. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81912-1
- Cockerton H.M., Vickerstaff R.J., Karlström A., Wilson F., Sobczyk M., He J.Q. et al. Identification of powdery mildew resistance QTL in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Theor Appl Genet*. 2018;131(9):1995-2007. DOI: 10.1007/s00122-018-3128-0
- Darrow G.M. The Strawberry. History, Breeding and Physiology. New York: Holt, Rinehart & Winston; 1966.
- Davik J., Honne B.I. Genetic variance and breeding values for resistance to a wind-borne disease [*Sphaerotheca macularis* (Wallr. ex Fr.)] in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) estimated by exploring mixed and spatial models and pedigree information. *Theor Appl Genet*. 2005;111(2):256-264. DOI: 10.1007/s00122-005-2019-3
- De los Santos B., Barrau C., Romero F. Strawberry fungal diseases. In: R. Dris, R. Niskanen, S.M. Jain (eds). *Crop management and post-harvest handling of horticultural products. Vol. 4. Diseases and disorders of Fruits and vegetables*. Enfield: Science Publishers; 2004. p.233268.
- Denoyes B., Baudry A. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. *Phytopathology*. 1995;85(1):53-57. DOI: 10.1094/Phyto-85-53
- Denoyes-Rothan B., Lerceteau-Köhler E., Guérin G., Bosseur S., Bariac J., Martin E. et al. QTL analysis for resistance to *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum* in octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Acta Hort*. 2004;663:147-152. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.663.19
- Deutschmann F. Eine Wurzelfäule an Erdbeeren, hervorgerufen durch *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroet. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*. 1954;6:7-9. [in German]
- Edger P.P., Poorten T.J., VanBuren R., Hardigan M.A., Colle M., McKain M.R. et al. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nat Genet*. 2019;51:541-547. DOI: 10.1038/s41588-019-0356-4
- Eikemo H., Brurberg M.B., Davik J. Resistance to *Phytophthora cactorum* in diploid *Fragaria* species. *HortScience*. 2010;45(2):193-197. DOI: 10.21273/HORTSCI.45.2.193
- Eikemo H., Klemsdal S.S., Riisberg I., Bonants P., Stensvand A., Tronsmo A.M. Genetic variation between *Phytophthora cactorum* isolates differing in their ability to cause crown rot in strawberry. *Mycological Research*. 2004;108(3):317-324. DOI: 10.1017/S0953756204009244
- Federova N.Y. Crossability and phylogenetic relationships in the main European species of *Fragaria* (Skreshchivayemost i filogeneticheskiye svyazi osnovnykh yevropeyskikh vidov roda *Fragaria*). *Doklady AN SSSR = Proceedings of the USSR Academy of Sciences*. 1946;52(6):545-547. [in Russian] (Федорова Н.Я. Скрещиваемость и филогенетические связи основных европейских видов рода *Fragaria*. Доклады АН СССР. 1946;52(6):545-547).
- Folta K.M., Davis T.M. Strawberry genes and genomics. *Crit Rev Plant Sci*. 2006;25(5):399-415. DOI: 10.1080/07352680600824831
- Gelvonauskienė D., Rugienius R., Šikšnianas T., Stanienė G., Sasnauskas A., Stanys V. Screening of apple and strawberry plants carrying fungal disease resistance oligogenes using molecular markers. *Žemdirbystė = Agriculture*. 2007;94(4):139-145.
- Golovin S.E. Root and rhizome rots of fruit and berry crops, diagnosis and control measures (Kornevye i prikornevye gnili plodovykh i yagodnykh kultur, diagnostika i mery borby) [dissertation]. Moscow; 2010. [in Russian] (Головин С.Е. Корневые и прикорневые гнили плодовых и ягодных культур, диагностика и меры борьбы: дис. ... д-ра биол. наук. Москва; 2010). URL: <https://www.dissercat.com/content/kornevye-i-prikornevye-gnili-plodovykh-i-yagodnykh-kultur-diagnostika-i-mery-borby> [дата обращения: 01.11.19].
- Govorova G.F. Strawberries breeding for disease resistance in the North Caucasus (Seleksiya zemlyaniki na ustoychivost k boleznyam v usloviyah Severnogo Kavkaza) [dissertation]. St. Petersburg; 1992. [in Russian] (Говорова Г.Ф. Селекция земляники на устойчивость к болезням в условиях Северного Кавказа: дис. ... д-ра с.-х. наук. Санкт-Петербург; 1992). URL: <http://www.dslib.net/semeno-vodstvo/selekcija-zemljaniki-na-ustoychivost-k-boleznyam-v-usloviyah-severnogo-kavkaza.html> [дата обращения: 25.10.19].
- Govorova G.F. Strawberry disease caused by *Phytophthora fragariae* Hickm. (Zabolevaniye zemlyaniki, vyzyvaемое грибом *Phytophthora fragariae* Hickm.). *Byulleten GBS AN SSSR = Bulletin of the Main Botanical Garden of the USSR Academy of Sciences*. 1964;54:105-110. [in Russian] (Говорова Г.Ф. Заболевание земляники, вызываемое грибом *Phytophthora fragariae* Hickm. Бюллетень ГБС АН СССР. 1964;54:105-110).
- Govorova G.F., Govorov D.N. Fungal diseases of *Fragaria* spp. (Gribnye bolezni zemlyaniki i klubniki). Moscow: Prospekt; 2019. [in Russian] (Говорова Г.Ф., Говоров Д.Н. Грибные болезни земляники и клубники. Москва: Проспект; 2019).
- Govorova G.F., Govorov D.N. Strawberries: past, present, future (Zemlyanika: proshlone, nastoyashchene, budushchene). Moscow: Rosinformagorotekh; 2004. [in Russian] (Говорова Г.Ф., Говоров Д.Н. Земляника: прошлое, настоящее, будущее. Москва: Росинформагортех; 2004).
- Guérin G., Lerceteau-Köhler E., Laigret F., Roudeillac P., Denoyes-Rothan B. Development of a SCAR marker linked to dominant gene conferring resistance to *Colletotrichum acutatum* in strawberry. *Acta Hort*. 2003;626:85-91. DOI: 10.17660/ActaHortic.2003.626.10
- Harland S.C., King E. Inheritance of mildew resistance in *Fragaria* with special reference to cytoplasmic effects. *Heredity*. 1957;11:287.
- Harrison R.E., Luby J.J., Furnier G.R., Hancock J.F., Cooley D. Variation for susceptibility to crown rot and powdery mildew in wild strawberry from North America. *Acta Hort*. 1998;484:43-48. DOI: 10.17660/ActaHortic.1998.484.3
- Haymes K.M., Henken B., Davis T.M., van de Weg W.E. Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (*Rpf1*) in the cultivated strawberry. *Theor Appl Genet*. 1997;94(8):1097-1101. DOI: 10.1007/s001220050521
- Haymes K.M., Hokanson S.C., Salazar K., Maas J.H. Molecular markers linked to *Phytophthora fragariae* resistance genes in strawberry. *HortScience*. 1998;33:500.
- Haymes K.M., van de Weg W.E., Arens P., Maas J., Vosman B., Den Nijs A.P.M. Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry genotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2000;125(3):330-339. DOI: 10.21273/JASHS.125.3.330
- Hirakawa H., Shirasawa K., Kosugi S., Tashiro K., Nakayama S., Yamada M. et al. Dissection of the octoploid strawberry genome by deep sequencing of the genomes of *Fragaria* species. *DNA Research*. 2014;21(2):169-181. DOI: 10.1093/dnares/dst049
- Hokanson S.C., Maas J.L. Strawberry biotechnology. In: Janick J. (ed.). *Plant breeding reviews*. Oxford, UK; 2010. p.139-180.
- Holod N.A., Kashchits Y.P., Dobrenkov E.A., Semenova L.G. Evaluation of stability of strawberry varieties to anthracnose black rot in the southern region (Otsenka ustoychivosti sortov zemlyaniki sadovoy k antraknoznoy chernoyn gnili v yuzhnom regione). *Plodovodstvo i vinogradarstvo yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South Russia*. 2018;51(3):140-148 [in Russian] (Холод Н.А., Кашиц Ю.П., Добренков Е.А., Семенова Л.Г. Оценка устойчивости сортов земляники садовой к антракнозной черной гнили в южном регионе. Плодоводство и виноградарство юга России. 2018;51(3):140-148. DOI: 10.30679/2219-5335-2018-3-51-137-145).
- Horn N.L., Carver R.B., Burnside K.R. Powdery mildew of strawberry. *Plant Disease Reporter*. 1972;56:368.
- Jambagi S., Dunwell J.M. Identification and expression analysis of *Fragaria vesca* MLO genes involved in interaction with powdery mildew (*Podosphaera aphanis*). *Journal of Advances in Plant Biology*. 2017;1(1):40-54. DOI: 10.14302/issn.2638-4469.japb-17-1838.
- Jiwan D., Roalson E.H., Main D., Dhingra A. Antisense expression of peach mildew resistance locus O (*PpMlo1*) gene confers cross-species resistance to powdery mildew in *Fragaria* × *ananassa*. *Transgenic Research*. 2013;22(6):1119-1131. DOI: 10.1007/s11248-013-9715-6.
- Kotova V.V., Kungurtseva O.V. Anthracnose of agricultural plants (Antraknoz selskhozayajstvennykh rasteniy). St. Petersburg: VIZR; 2014. 132 p. (Котова В.В., Кунгурцева О.В. Антракноз сельскохозяйственных растений. Санкт-Петербург: ВИЗР; 2014. 132 с.).

- Leandro L.F.S., Gleason M.L., Nutter F.W.Jr., Wegulo S.N., Dixon P.M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology*. 2001;91(7):659-664. DOI: 10.1094/PHYTO.2001.91.7.659.
- Lerceteau-Köhler E., Guerin G., Denoyes-Rothan B. Identification of SCAR marker linked to *Rca2* anthracnose resistance gene and their assessment in strawberry germplasm. *Theor Appl Genet*. 2005;111:862-870. DOI: 10.1007/s00122-005-0008-1.
- Lerceteau-Köhler E., Moing A., Guérin G., Maucourt M., Renaud C., Rolin D., Roudeillac P., Denoyes-Rothan B. QTL analysis for fruit quality traits and resistance to *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum* in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Acta Hort*. 2004;649:93-98. DOI: 10.17660/ActaHortic.649.16.
- Lerceteau-Köhler E., Roudeillac P., Markocic M., Guerin G., Praud K., Denoyes-Rothan B. The use of molecular markers for durable resistance breeding in the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Acta Hort*. 2003;567(2):615-618. DOI: 10.17660/ActaHortic.567.2.615.
- Lifshitz C., David N., Shalit N., Slotzky S., Tanami Z., Elad Y., Dai N. Inheritance of powdery mildew resistance in strawberry lines from the Israeli germplasm collection. *NASS/NASGA Proceedings*. 2007;74-76. Available from: <https://mafiadoc.com/inheritance-of-powdery-mildew-resistance-in-strawberry-lines-from-5b811b92097c47a1538b475a.html> [accessed December 22, 2019].
- Lloyd M., Gordon T.R. Growing for the future: collective action, land stewardship and soilborne pathogens in California strawberry production. *California Agriculture*. 2016;70(3):101-103. DOI: 10.3733/ca.2016a0009.
- Lukyanchuk I.V., Lyzhin A.S., Kozlova I.I. Analysis of the genetic collection of strawberries (*Fragaria* L.) for the *Rca2* and *Rpfl* genes with molecular markers (Analiz geneticheskoy kollektsii klubniki (*Fragaria* L.) dlya genov *Rca2* i *Rpfl* s molekulyarnymi markerami). *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(7):795-799 [in Russian] (Лукьянчук И.В., Лыжин А.С., Козлова И.И. Анализ генетической коллекции клубники (*Fragaria* L.) для генов *Rca2* и *Rpfl* с молекулярными маркерами. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(7):795-799). DOI: 10.18699/VJ18.423.
- Lyzhin A.S., Lukyanchuk I.V., Zhananova E.V. Polymorphism of strawberry varieties (*Fragaria × ananassa*) according to the *Rca2* anthracnose resistance gene (Polimorfizm sortov zemlyaniki (*Fragaria × ananassa*) po genu ustoychivosti k antraknozu *Rca2*). *Proceedings on applied botany, genetics and breeding*. 2019;180(1):73-77 [in Russian] (Лыжин А.С., Лукьянчук И.В., Жбанова Е.В. Полиморфизм сортов земляники (*Fragaria × ananassa*) по гену устойчивости к антракнозу *Rca2*. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(1):73-77). DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77.
- Mangandi J., Verma S., Osorio L.F., Peres N.A., van de Weg E., Whitaker V.M. Pedigree-based analysis in a multiparental population of octoploid strawberry reveals QTL alleles conferring resistance to *Phytophthora cactorum*. *G3-Genes/Genomes/Genetics*. 2017;7(6):1707-1719. DOI: 10.1534/g3.117.042119.
- Metlitsky O.Z., Golovin S.E., Undritsova I.A., Kholod N.A. Anthracnose of garden strawberries (Antraknoz sadovoy zemlyaniki). *Agro XXI*. 2007;4-6:40-41. [in Russian] (Метлицкий О.З., Головин С.Е., Ундритцова И.А., Холод Н.А. Антракноз садовой земляники. *Агро XXI*. 2007;4-6:40-41).
- Miller-Butler M.A., Smith B.J., Kreiser B.R., Blythe E.K. Comparison of anthracnose resistance with the presence of two SCAR markers associated with the *Rca2* gene in strawberry. *HortScience*. 2019;54(5):793-798. DOI: 10.21273/HORTSCI13805-18.
- Mori T., Kitamura H., Kuroda K. Varietal Differences in Fusarium Wilt-resistance in Strawberry Cultivars and the Segregation of this Trait in F₂ hybrids. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 2005;74(1):57-59. DOI: 10.2503/jjshs.74.57.
- Nellist C.F., Vickerstaff R.J., Sobczyk M.K., Marina-Montes C., Wilson F.M., Simpson D.W., Whitehouse A.B., Harrison R.J. Quantitative trait loci controlling *Phytophthora cactorum* resistance in the cultivated octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Horticulture Research*. 2019;6:60. DOI:10.1038/s41438-019-0136-4.
- Nelson M.D., Gubler W.D., Shaw D.D. Inheritance of powdery mildew resistance in greenhouse-grown versus field-grown Californian strawberry progenies. *Phytopathology*. 1995;85:421-424. DOI: 10.1094/Phyto-85-421.
- Newton A.C., Duncan J.M., Augustin N.H., Guy D.C., Cooke D.E.L. Survival, distribution and genetic variability of inoculum of the strawberry red core pathogen, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, in soil. *Plant Pathology*. 2010;59(3):472-479. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02273.x.
- Nickerson N.L., Murray R.A. Races of the red stele root rot fungus, *Phytophthora fragariae*, in Nova Scotia. *Adv Strawberry Res.* 1993;12:12-15.
- Njuguna W. Development and use of molecular tools in *Fragaria*. Corvallis, Oregon, USA: Oregon State University; 2010.
- Paynter M.L., de Faveri J., Herrington M.E. Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and predicted breeding values in strawberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2014;139(2):178-184. DOI: 10.21273/JASHS.139.2.178.
- Pincot D.D.A., Poorten T.J., Hardigan M.A., Harshman J.M., Acharya C.B., Cole G.S., Gordon T.R., Stueven M., Edger P.P., Knapp S.J. Genome-wide association mapping uncovers *Fwl*, a dominant gene conferring resistance to fusarium wilt in strawberry. *G3-Genes/Genomes/Genetics*. 2018;8(5):1817-1828. DOI: 10.1534/g3.118.200129.
- Popova I.V., Reznik S.M., Vereshchagina M.A. Results of strawberries breeding for resistance to powdery mildew in the conditions of the Non-Black Soil Belt of the RSFSR (Rezultaty selekcii zemlyaniki na ustojchivost k muchnistoj rose v usloviyah Nechernozemnoj zony RSFSR). *Novoe v yagodovodstve Nechernozemya = New in berry growing in the Non-Black Soil Belt*. 1990;13:25 [in Russian] (Попова И.В., Резник С.М., Верещагина М.А. Результаты селекции земляники на устойчивость к мучнистой росе в условиях Нечерноземной зоны РСФСР. *Новое в ягодоводстве Нечерноземья*. 1990;13:25).
- Pshikhacheva Z.U. Sources for strawberry breeding for the traits of productivity and quality of berries (Istochniki dlya selekcii zemlyaniki na priznaki produktivnosti i kachestva jagod) [dissertation]. Krasnodar; 2012. [in Russian] (Пшихачева З.У. Источники для селекции земляники на признаки продуктивности и качества ягод: дис. ... канд. с.-х. наук. Краснодар; 2012). URL: <https://www.dissercat.com/content/istochniki-dlya-selekcii-zemlyaniki-na-priznaki-produktivnosti-i-kachestva-yagod> [дата обращения: 18.10.19].
- Rugienius R., Siksnianas T., Stanys V., Gelvonauskienė D., Bendokas V. Use of RAPD and SCAR markers for identification of strawberry genotypes carrying red stele (*Phytophthora fragariae*) resistance gene *Rpfl*. *Agronomy Research*. 2006;4:335-339.
- Salinas N., Verma S., Peres N., Whitaker V.M. *FaRCa1*: a major subgenome-specific locus conferring resistance to *Colletotrichum acutatum* in strawberry. *Theor Appl Genet*. 2019;132:1109-1120. DOI: 10.1007/s00122-018-3263-7.
- Sargent D.J., Buti M., Šurbanovski N., Brurberg M.B., Alsheikh M., Kent M.P., Davik J. Identification of QTLs for powdery mildew (*Podosphaera aphanis*; syn. *Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*) susceptibility in cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*). *PLOS ONE*. 2019;14(9):e0222829. DOI: 10.1371/journal.pone.0222829.
- Sargent D.J., Yang Y., Surbanovski N., Bianco L., Buti M., Velasco R., Giongo L., Davis T.M. HaploSNP affinities and linkage map positions illuminate subgenome composition in the octoploid, cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Plant Science*. 2016;242:140-150. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.07.004.
- Sasnauskas A., Rugienius R., Gelvonauskienė D., Zaluskaitė I., Stanienė G., Siksnianas T., Stanys V., Bobinas C. (2007) Screening of strawberries with the red stele (*Phytophthora fragariae*) resistance gene *Rpfl* using sequence specific DNA markers. *Acta Hort*. 2007;760:165169. DOI: 10.17660/ActaHortic.2007.760.21.
- Senanayake Y.D.A., Bringham R.S. Origin of *Fragaria* polyploids. I. Cytological analysis. *American Journal of Botany*. 1967;54:221-228.

- Shaw D.V., Hansen J., Browne G.T. Genotypic variation for resistance to *Phytophthora cactorum* in a California strawberry breeding population. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 2006;131(5):687–690. DOI: 0.21273/JASHS.131.5.687.
- Shaw D.V., Hansen J., Browne G.T., Shaw S.M. Components of genetic variation for resistance of strawberry to *Phytophthora cactorum* estimated using segregating seedling populations and their parent genotypes. *Plant Pathology*. 2008;57(2):210–215. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01773.x.
- Simpson D.W. The inheritance of mildew resistance in everbearing and day-neutral strawberry seedlings. *Journal of Horticultural Science*. 1987;62:329–334. DOI: 10.1080/14620316.1987.11515788.
- Smith B.J. Epidemiology and pathology of strawberry anthracnose: a North American perspective. *Horticultural Science*. 2008;43(1):6973. zSturzeanu M., Calinescu M., Fralova L., Klakotskaya N., Ancu I., Sumedrea M., Marin F.C. Assessing some strawberry genotypes used in breeding programs for increasing resistance to diseases. *Fruit Growing Research*. 2017;33:29–34. Available from: <http://publications.icdp.ro/publicatii/lucrari%202017/I.4.%20Sirbu.pdf> [accessed December 22, 2019].
- Sturzeanu M., Coman M., Ciuca M., Ancu I., Cristina D., Turcu A.G. Molecular characterization of allelic status of the *Rpf1* and *Rca2* genes in six cultivars of strawberries. *Acta Hort.* 2016;1139:107–111. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1139.19.
- Takahashi H., Yoshida Y., Kanda H., Furuya H., Matsumoto T. Breeding of Fusarium wilt-resistant strawberry cultivar suitable for field culture in Northern Japan. *Acta Hort.* 2003;626:113–118. DOI: 10.17660/ActaHortic.2003.626.15.
- van de Weg W.E. Cultivar-race interactions of the strawberry-*Phytophthora fragariae* system with regard to a gene-for-gene model. *Acta Hort.* 1989;265:203–206. DOI: 10.17660/acta-hortic.1989.265.29.
- van de Weg W.E. A gene-for-gene model to explain interactions between cultivars of strawberry and races of *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*. *Theor Appl Genet.* 1997a;94(3-4):445–451. DOI: 10.1007/s001.220.050435.
- van de Weg W.E. Resistance to *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in strawberry: the *Rpf2* gene. *Theor Appl Genet.* 1997b;94(8):1092–1096. DOI: 10.1007/s001.220.050520.
- van Dijk T., Pagliarini G., Pikunova A., Noordijk Y., Yilmaz-Temel H., Meulenbroek B., Visse R.G.F., van de Weg W.E. Genomic rearrangements and signatures of breeding in the allo-octoploid strawberry as revealed through an allele dose based SSR linkage map. *BMC Plant Biology*. 2014;14:55. DOI: 10.1186/1471-2229-14-55.
- Whitaker V.M. Applications of molecular markers in strawberry. *Journal of Berry Research*. 2011;1:115–127. DOI: 10.3233/BR2011-013.
- Wu K.K., Burnquist W., Sorrells M.E., Tew T.L., Moore P.H., Tanksley S.D. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor Appl Genet.* 1992;83(3):294–300. DOI: 10.1007/BF00224274.
- Zubov A.A. Genetic features and breeding of strawberries (Geneticheskie osobennosti i selekcija zemljaniki) [dissertation]. Michurinsk; 1992 [in Russian] (Зубов А.А. Генетические особенности и селекция земляники: дис. ... д-ра с.-х. наук. Мичуринск; 1992). URL: <http://earthpapers.net/geneticheskie-osobennosti-i-selektsiya-zemlyaniki> [дата обращения: 26.10.19].
- Zubov A.A., Petrova V.M. On the method of strawberries breeding for resistance to powdery mildew (O metodike selektsii zemlyaniki na ustoychivost k muchnistoy rose). *Vestnik selskohozyaystvennoy nauki = Bulletin of Agricultural Sciences*. 1973;1(2):99–153. [in Russian] (Зубов А.А., Петрова В.М. О методике селекции земляники на устойчивость к мучнистой росе. *Вестник с.-х. науки*. 1973;1(2):99–153).

УЛУЧШЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЗЕРНОВОГО СОРГО НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ СОВРЕМЕННОЙ ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Эльконин Л.А.^{1*}, Панин В.М.¹, Кенжегулов О.А.¹,
Герашенков Г.А.²

¹ Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока,
410010 Россия, г. Саратов, ул. Тулайкова, д. 7;
✉ *elkonin@gmail.com

² Институт биохимии и генетики,
Уфимский федеральный исследовательский центр РАН,
450054 Россия, г. Уфа, просп. 60-летия Октября, д. 71;

Представлен обзор работ по использованию методов генетической инженерии и геномного редактирования для улучшения питательной ценности зерна сорго. За последние 5-7 лет в результате экспериментов, выполненных несколькими группами исследователей, созданы трансгенные линии, несущие генетические конструкции для РНК-сайленсинга разных подклассов кафринов (проламинов зерна сорго). В экспериментах по геномному редактированию с использованием системы CRISPR/Cas9 получены мутанты с делециями и инсерциями в сигнальной последовательности гена, кодирующего 22 кДа α -кафрин сорго. Такие линии и мутанты характеризуются улучшенной перевариваемостью белков зерна в системе *in vitro*, измененной ультраструктурой белковых телец и повышенным содержанием лизина. РНК-сайленсинг α -кафрина повышал перевариваемость белков сырой муки, а также муки, подвергшейся кипячению, тогда как сайленсинг γ -кафрина приводил к улучшению перевариваемости белков только сырой муки. Зерновки линий с сайленсингом α -кафрина имеют мучнистый тип эндосперма, что снижает их ценность для прямого коммерческого использования поскольку рыхлый мучнистый эндосперм уменьшает механическую прочность зерновок и способствует их контаминации микрофлорой; однако эти линии могут быть использованы в качестве доноров высокой перевариваемости запасных белков при скрещивании с линиями сорго, адаптированными к местным условиям, для улучшения их питательной ценности. Зерновки линий с сайленсингом γ -кафрина характеризуются разными типами эндосперма: мучнистым, стекловидным или модифицированным типом с вкраплениями стекловидного эндосперма в мучнистый. Этот факт указывает на возможность получения агрономически-ценных линий сорго с высокой перевариваемостью кафринов и твердым эндоспермом. Повышенное содержание лизина в зерновках линий сорго с подавленным синтезом кафринов может быть связано с балансировкой уровня белка в эндосперме за счет синтеза других белков, в том числе, с более высоким содержанием незаменимых аминокислот. Наряду с улучшением перевариваемости кафринов, генно-инженерный подход позволил создать линии сорго с увеличенным содержанием в зерне провитамина А и его повышенной стабильностью при хранении. Результаты работ свидетельствуют о перспективности использования методов РНК-интерференции и геномного редактирования для создания линий сорго с улучшенной питательной ценностью зерна.

Ключевые слова: кафрины, РНК-сайленсинг, геномное редактирование, перевариваемость белка *in vitro*, эндосперм, *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-3-06>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer. Все авторы одобрили рукопись. / All authors approved the manuscript. Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

IMPROVEMENT OF GRAIN SORGHUM NUTRITIVE PROPERTIES USING MODERN GENETIC AND BIOTECHNOLOGICAL METHODS

Elkonin L.A.^{1*}, Panin V.M.¹, Kenzhegulov O.A.¹,
Gerashchenkov G.A.²

¹ Agricultural Research Institute of South-East Region,
7, Tulaiakov St., Saratov, 410010, Russia,
✉ *elkonin@gmail.com

² Institute of Biochemistry and Genetics,
Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
71, October 60th Anniversary Ave., Ufa, 450054, Russia

The paper presents a review of the studies on the use of genetic engineering and genome editing tools for improving nutritional properties of sorghum grain. As a result of experiments performed over the past 5-7 years by several research groups, the created transgenic lines carry genetic constructs for RNA silencing of different kafirin sub-classes (prolamins of sorghum grain). The CRISPR/Cas9 genome editing experiments have yielded mutants with deletions and insertions in the signal sequence of the gene encoding the 22 kDa α -kafirin in sorghum. These lines and mutants were characterized by improved *in vitro* digestibility of grain proteins, altered ultrastructure of protein bodies and an increased content of lysine. RNA silencing of α -kafirin increased the digestibility of proteins of both raw and cooked flour, while silencing of γ -kafirin led to improved digestibility of proteins of only raw flour. The lines with α -kafirin silencing have kernels with the floury endosperm type that discourages their direct commercial use because of fragility and reduced tolerance to fungal contamination; however, these lines can be used as donors of high digestibility trait when crossed with sorghum lines adapted to local conditions to improve their nutritional value. Kernels of the lines with γ -kafirin silencing may have different endosperm types: floury, vitreous, or a modified type with vitreous endosperm interspersed in the floury endosperm. This fact indicates the possibility of producing agronomically important sorghum lines with high kafirin digestibility and hard endosperm. The increased lysine level in kernels of sorghum lines with the suppressed synthesis of kafirins may be caused by rebalancing of protein synthesis in endosperm of developing kernels due to the synthesis of other proteins, including those with a higher content of essential amino acids. Alongside with improving the digestibility of kafirins, the genetic engineering approach allowed the creation of sorghum lines with a high content of provitamin A in grain and its increased stability during long-term storage. The results of these works show that it is promising to use RNA-interference and genome editing for creating sorghum lines with improved nutritional value of grain.

Key words: kafirins, RNA silencing, genome editing, *in vitro* protein digestibility, endosperm, *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

Для цитирования: Эльконин Л.А., Панин В.М., Кенжегулов О.А., Герашенков Г.А. Улучшение питательных свойств зернового сорго на основе методов современной генетики и биотехнологии. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(3):41-48. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-06

For citation: Elkonin L.A., Panin V.M., Kenzhegulov O.A., Gerashchenkov G.A. Improvement of grain sorghum nutritive properties using modern genetic and biotechnological methods. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(3):41-48. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-06

ORCID:

Elkonin L.A. <https://orcid.org/0000-0003-3806-5697>

УДК 581.169(063):633.174

Поступила в редакцию: 18.11.2019

Принята к публикации: 29.12.2019

Введение

Улучшение питательной ценности зерна – одно из наиболее актуальных направлений селекции злаков. Эта задача особенно важна для сорго – высокоурожайной жаростойкой и засухоустойчивой культуры, зерно которой обладает значительным содержанием белка (в среднем, 10-12%, а у некоторых линий до 15%) и крахмала (в среднем, 70-72%, а у некоторых линий до 78%) (Bean et al., 2018). Сорго входит в число пяти наиболее широко возделываемых злаковых культур мирового сельскохозяйственного производства и является источником питания для сотен миллионов людей во многих странах мира (Mudge et al., 2016). В связи с глобальным потеплением климата и связанной с ним устойчивой тенденцией к увеличению среднегодовой температуры Земли на протяжении последних 150 лет (Hansen et al., 2006), значение этой культуры будет неуклонно возрастать. Кроме того, благодаря отсутствию в составе запасных белков сорго глютеинов, его зерно может использоваться для приготовления продуктов питания для людей, больных целиакией (непереносимостью глютенa) и вынужденных соблюдать безглютеновую диету.

Однако большинство существующих сортов и гибридов сорго характеризуются более низкой питательной ценностью по сравнению с другими зерновыми культурами. Так, перевариваемость белков зерна сорго в желудке у крупного рогатого скота составляет 63-65%, тогда как у кукурузы этот показатель достигает 76%, а у ячменя и пшеницы – 95-98% (Godwin et al., 2009). В основе низкой питательной ценности сорго лежит устойчивость запасных белков зерна (кафиринов) к действию протеаз, а также низкая питательная ценность самих кафиринов, содержащих незначительное количество незаменимых аминокислот (Oria et al., 1995; Henley et al., 2010; Bean et al., 2018). Такая устойчивость кафиринов к протеолитическому расщеплению не только снижает их усвояемость животными и человеком, но и уменьшает перевариваемость крахмала зерна и муки сорго, поскольку непереваренные кафирины препятствуют полноценному амилолитическому расщеплению крахмальных гранул (Zhang, Namaker, 1998; Ezeogu et al., 2005; Wong et al., 2009).

Устойчивость кафиринов к протеолитическому расщеплению имеет многофакторную природу. В ее основе лежит (1) аминокислотный состав кафиринов, богатых серосодержащими аминокислотами, способными образовывать внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи, «цементирующие» молекулы белков; (2) взаимодействие кафиринов с некафириновыми белками и небелковыми компонентами, в частности, с таннинами, снижающими активность протеаз, и полисахаридами, входящими в состав крахмальных гранул клеток эндосперма; (3) пространственная организация различных кафиринов в белковых телах клеток эндосперма; (4) способность γ -кафирина к формированию олиго- и полимеров с высокой

молекулярной массой, устойчивых к расщеплению протеазами (Belton et al., 2006; De Mesa-Stonestreet et al., 2010).

Как известно, у злаков запасные белки, накапливающиеся в клетках эндосперма в процессе созревания зерновок, депонируются в специальных структурах – белковых тельцах, формирующихся из мембран эндоплазматического ретикулюма (Shewry, 2007). У сорго процесс формирования белковых телец начинается с накопления в них проламинов: γ - и β -кафиринов (28 и 18 kDa, соответственно). В дальнейшем, запускается синтез α -кафиринов (25 и 22 kDa), составляющих основную массу (до 80%) кафиринов. При этом происходит депонирование α -кафиринов во внутренних слоях белковых телец, что отодвигает γ -кафиринов в периферийную зону. Считается, что γ -кафиринов, имеющий в своем составе значительную долю цистеина, образующего внутримолекулярные S-S связи, отличается наиболее высокой устойчивостью к протеолитическому расщеплению. Занимая периферийное положение в белковых тельцах клеток эндосперма, γ -кафиринов блокирует доступ протеаз к α -кафиринам, которые располагаются внутри белковых телец (Belton et al., 2006; De Mesa-Stonestreet et al., 2010; Bean et al., 2018).

Важным аргументом в пользу этой гипотезы стали данные, полученные при исследовании мутанта P721Q, индуцированного с помощью химического мутагенеза и характеризующегося повышенной перевариваемостью кафиринов (Mohan, 1975 цит. по Weaver et al., 1998). У этого мутанта белковые тельца клеток эндосперма имеют неправильную форму, отличаясь значительными впадинами и инвагинациями. При этом, γ -кафиринов располагался только на дне таких впадин, не образуя непрерывного слоя, затрудняющего доступ протеаз к α -кафиринам (Weaver et al., 1998; Oria et al., 2000). Данная мутация ведет к формированию зерновок с мучнистым типом эндосперма и повышенным содержанием лизина, в связи с чем для ее обозначения был введен символ *hdhl* (*high digestibility high lysine*). Последующие исследования, однако, позволили установить, что ген, кодирующий 22 кДа α -кафиринов, присутствует в геноме сорго в количестве 10 копий, которые образуют генный кластер в хромосоме 5. Было показано, что у мутанта P721Q в нуклеотидной последовательности одной из этих 10 копий имеется точковая мутация в сигнальной последовательности, ответственной за упаковку α -кафирина внутри белкового тельца (Wu et al., 2013). Очевидно, что эта мутация изменяет ультраструктуру белковых телец, повышая их перевариваемость.

Решение проблемы улучшения перевариваемости запасных белков и питательной ценности зерна сорго возможно с помощью различных методов современной генетики и биотехнологии: экспериментальной индукции мутантов с нарушенным синтезом или измененным аминокислотным составом кафиринов (Mehlo et al., 2013); выявления существующих в природе аллельных вариантов кафиринов (Laidlaw et al., 2010; Cremer et al., 2014;

Chiquito-Almanza et al., 2016); введения генетических конструкций, вызывающих сайленсинг генов γ - и/или α -кафиринов (Da Silva et al., 2011a; Kumar et al., 2012; Elkonin et al., 2016; Grootboom et al., 2014); редактирования нуклеотидных последовательностей генов γ - и/или α -кафиринов с целью их нокаута (Li et al., 2018). Кроме того, улучшение питательной ценности может быть достигнуто путем введения генетических конструкций, кодирующих синтез белков с повышенным содержанием лизина или усиливающих синтез или нарушающих катаболизм аминокислот или витаминов. Данный обзор посвящен анализу работ, в которых на основе использования таких подходов были получены новые генотипы сорго с улучшенной питательной ценностью.

Повышение перевариваемости кафиринов на основе технологии РНК-интерференции

Как известно, в основе технологии РНК-интерференции лежит взаимодействие коротких РНК, транскрибированных с введенных в геном генетических конструкций, и мРНК целевых генов, функционирование которых желательно подавить. Двухцепочные РНК, возникающие в результате такого взаимодействия, подвергаются ферментативному гидролизу, что ведет к разрушению мРНК целевого гена и, тем самым, к подавлению его экспрессии.

В последние годы технология РНК-интерференции интенсивно использовалась для подавления синтеза запасных белков у разных видов злаков (см. обзор: Elkonin et al., 2016a). Эти эксперименты способствовали получению новой информации о механизмах формирования белковых телец, а также роли различных классов проламинов и глютеинов в развитии эндосперма и их влиянии на технологические свойства муки и теста.

У сорго интенсивные исследования по индукции РНК-сайленсинга генов кафирина были предприняты несколькими исследовательскими группами (Da Silva et al., 2011; Kumar et al., 2012; Grootboom et al., 2014). Основной целью этих экспериментов было улучшение перевариваемости протеазами в результате подавления синтеза различных подклассов кафиринов. При этом, в зависимости от структуры генетической конструкции уровень перевариваемости кафиринов значительно различался (см. Таблицу). Так, генетические конструкции, созданные в процессе реализации проекта ABS (Africa Biofortified Sorghum) содержали инвертированные повторы нескольких генов кафиринов (α -, γ -, δ -), разделенных последовательностью интрона гена алкогольдегидрогеназы (*ADHI*) (DaSilva et al., 2011). мРНК, транскрибированная с такой конструкции, образует двухцепочную «шпильку» и подвергается распаду. Созданные конструкции управлялись промотором 19-kDa α -зеина кукурузы. В другом исследовании (Kumar et al., 2012)

генетическая конструкция, использованная для индукции сайленсинга γ -кафирина, состояла из полной последовательности гена γ -кафирина под контролем собственного промотора. В качестве терминатора использовали последовательность гена рибозима вируса табачной мозаики, экспрессия которого должна была разрушать мРНК γ -кафирина. В другой конструкции для индукции сайленсинга α -кафирина, использовали инвертированные повторы α -кафирина, разделенные последовательностью интрона гена арабидопсиса, кодирующего белок сплайсосомы D1; эта конструкция управлялась промотором α -кафирина (Kumar et al., 2012). Позже для получения трансгенных растений сорго с сайленсингом кафиринов была использована другая сложная конструкция, состоящая из инвертированных фрагментов генов $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - и δ -кафиринов (Grootboom et al., 2014).

В экспериментах каждой из этих групп были получены линии трансгенного сорго с подавленным синтезом γ - и/или α -кафиринов и эндоспермом мучнистого типа. К сожалению, наличие мучнистого эндосперма является существенным недостатком полученных линий, поскольку отсутствие стекловидного слоя увеличивает хрупкость зерновки и снижает ее устойчивость к поражению грибными заболеваниями.

В наших экспериментах для индукции сайленсинга гена γ -кафирина, была использована генетическая конструкция, управлявшаяся 35S-промотором, в которой инвертированные фрагменты γ -кафирина были разделены между собой интроном гена убиквитина кукурузы (*ubi1*) (Elkonin et al., 2016b). Использование такой конструкции позволило получить трансгенные растения, которые имели зерновки с разными типами эндосперма: наблюдался либо обычный эндосперм с толстым или тонким стекловидным слоем, мучнистый эндосперм или модифицированный тип эндосперма, в котором стекловидный слой развивался в виде секторов или пятен, окруженных мучнистым эндоспермом. Эти зерновки по текстуре эндосперма напоминали зерновки рекомбинантных линий сорго, полученных путем гибридизации мутанта *hdhl* с линиями сорго с обычным стекловидным типом эндоспермом (Tesso et al., 2006). Ранее трансгенные растения с вкраплениями стекловидного эндосперма, окруженными мучнистым эндоспермом, наблюдали также у трансгенной линии сорта Tх430, содержащей генетическую конструкцию для сайленсинга α - и γ -кафиринов (DaSilva et al., 2011). В то же время, ко-супрессия подклассов δ -кафирина и γ -кафиринов не изменяла фенотип эндосперма у этого сорта. По-видимому, образование разных типов эндосперма обусловлено особенностями экспрессии генетических конструкций в геноме реципиентной линии.

Наиболее важным следствием сайленсинга кафиринов у трансгенных растений сорго является повышенная перевариваемость кафиринов, которая наблюдалась при обработке муки пепсином. Так, трансгенные растения сорта Tх430, несущие генетическую конструк-

цию для сайленсинга α - и γ -кафирина, характеризовались улучшенной перевариваемостью белков в системе *in vitro*, при этом уровень перевариваемости при обработке пепсином сырой муки и муки, подвергшейся процедуре варки, составлял, соответственно, 78% и 61%, тогда как в нетрансгенном контроле эти показатели варьировали в пределах 40-50% и 34-40% соответственно (DaSilva, 2012). Генетическая конструкция для сайленсинга δ - и γ -кафиринов также вызывала улучшение перевариваемости сырой муки, но не влияла на перевариваемость муки, подвергшейся процедуре варки. В экспериментах Т. Кумара с соавт. (Kumar et al., 2012), мука из зерновок трансгенных растений, несущих генетическую конструкцию для подавления γ -кафирина, подвергшаяся процедуре варки, не отличалась от нетрансгенного контроля, тогда как подавление α -кафирина улучшало перевариваемость такой муки.

Трансгенные растения, полученные в наших экспериментах с использованием генетической конструкции для сайленсинга γ -кафирина, также имели значительно улучшенную перевариваемость белков муки в системе *in vitro* (Elkonin et al., 2016b). Сравнение электрофоретических спектров до и после расщепления пепсином показало, что в трансгенном растении количество непереваренных мономеров α -кафирина и общего непереваренного белка было значительно меньше (в 1,7-1,9 раза, согласно количественному анализу SDS-PAGE), чем у исходной нетрансгенной линии. Уровень перевариваемости достигал 85,4%, тогда как в исходной линии это значение составляло около 60%. Примечательно, что у зерновок трансгенного растения № 94-3-08 (T_2) с толстым стекловидным эндоспермом различия в переваривании кафиринов были более выраженными: количество непереваренных мономеров было в 17,5 раз меньше, а количество общего непереваренного белка – в 4,7 раза меньше, чем в исходной линии, при этом уровень перевариваемости достигал 92%.

Растения из поколения T_3 наследовали улучшенную перевариваемость кафиринов. У этих растений зерновки имели либо мучнистый, либо модифицированный тип эндосперма, либо эндосперм с хорошо выраженным стекловидным слоем. Уровень перевариваемости белков эндосперма у этих растений составлял 83-90%, значительно превышая аналогичный показатель у исходной нетрансгенной линии. По-видимому, снижение уровня γ -кафирина повышает перевариваемость α -кафиринов. Это увеличение может быть связано с химическими причинами (снижение количества полимеров) и/или физическими причинами (изменение пространственного расположения α -кафиринов в белковых телах, которые увеличивают их доступность для расщепления пепсином). Эффект повышенной перевариваемости кафиринов наблюдался также у растений из поколения T_4 , однако в некоторых случаях он исчезал, возможно, из-за нестабильности введенной генетической конструкции, либо из-за ее сайленсинга (см. ниже).

Балансировка протеома зерновки и улучшение ее питательной ценности

Важным следствием сайленсинга генов проламинов у злаков является усиление синтеза других белков, в том числе, с более высоким содержанием незаменимых аминокислот, лизина и треонина. Так, у растений трансгенной кукурузы с сайленсингом α -зеинов наблюдалось удвоенное содержание незаменимых аминокислот триптофана и лизина (Huang et al., 2006). На рисе было показано, что сайленсинг генов 13 кДа-проламина увеличивает общее содержание лизина до 56% в результате компенсаторного повышения синтеза лизин-богатого глобулина, глобулинов и шаперонов (Kawakatsu et al., 2010). Значительное увеличение содержания лизина (до 3,3 г/100 г белка, по сравнению с 2,1 г/100 г белка в нетрансгенном контроле) было обнаружено у трансгенных растений сорго, несущих сложные генетические конструкции для РНК-сайленсинга α -, γ -, δ -кафиринов и гена лизин-кетоглутарат-редуктазы, контролирующего катаболизм свободного лизина (DaSilva, 2012).

У полученных нами трансгенных растений, характеризующихся высокой перевариваемостью кафиринов в системе *in vitro*, общее содержание аминокислот в зерновках растений поколения T_2 снизилось на 22,8-40,2% по сравнению с исходной, нетрансгенной линией (Elkonin et al., 2016b). В то же время, относительное содержание двух основных незаменимых аминокислот, лизина и треонина, значительно увеличилось. Доля лизина увеличилась в 1,6-1,7 раза: с 1,54% от общего содержания аминокислот в муке исходной нетрансгенной линии до 2,41-2,63% у трансгенных растений. Такое увеличение в сочетании со значительным снижением общего уровня аминокислот, по-видимому, было вызвано снижением содержания α -кафиринов, бедных лизином и треонином, тогда как синтез других белков оказался не нарушен. Соответственно, относительные пропорции лизина и треонина увеличились. Возможно, подавление синтеза γ -кафирина препятствует накоплению α -кафиринов, но не влияет на синтез других белков, более богатых лизином и треонином.

Восстановление белкового баланса эндосперма является частым явлением у трансгенных растений с генетическими конструкциями для РНК-сайленсинга запасных белков семян. Было высказано предположение, что кукуруза имеет компенсаторный механизм, который чувствителен к содержанию белка, при этом, нарушение синтеза зеина в развивающихся зерновках усиливает трансляцию других мРНК (Wu, Messing, 2014). Примечательно, что у трансгенных растений сои с подавленным синтезом основных запасных белков, в семенах сохранялся почти идентичный уровень общего белка, свойственный нетрансформированным сортам сои (Schmidt et al., 2011). Эти данные свидетельствуют о том, что восстановление баланса протеома может быть довольно распространенным явлением, обеспечивающим постоянный приток азота во время созревания семян.

Нестабильность генетической конструкции для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина

В наших экспериментах мы обнаружили, что потомство трансгенных растений с высокой перевариваемостью белков эндосперма в системе *in vitro* иногда теряет этот признак. Даже разные метелки одного и того же растения имели разные значения перевариваемости. ПЦР-анализ растений поздних поколений (T_4 , T_5) пока-

зал, что в ходе онтогенеза у некоторых растений происходит элиминация конструкции для РНК-сайленсинга. Тем не менее, у других растений из того же потомства конструкция была стабильной. Кроме того, у растений из поколений T_4 была обнаружена элиминация *nos*-промотора, управляющего экспрессией маркерного гена *bar*, присутствовавшего в генетической конструкции для сайленсинга гена γ -кафирина (рисунок). Таким образом, эти растения фактически оказались функционально безмаркерными трансгенными растениями.

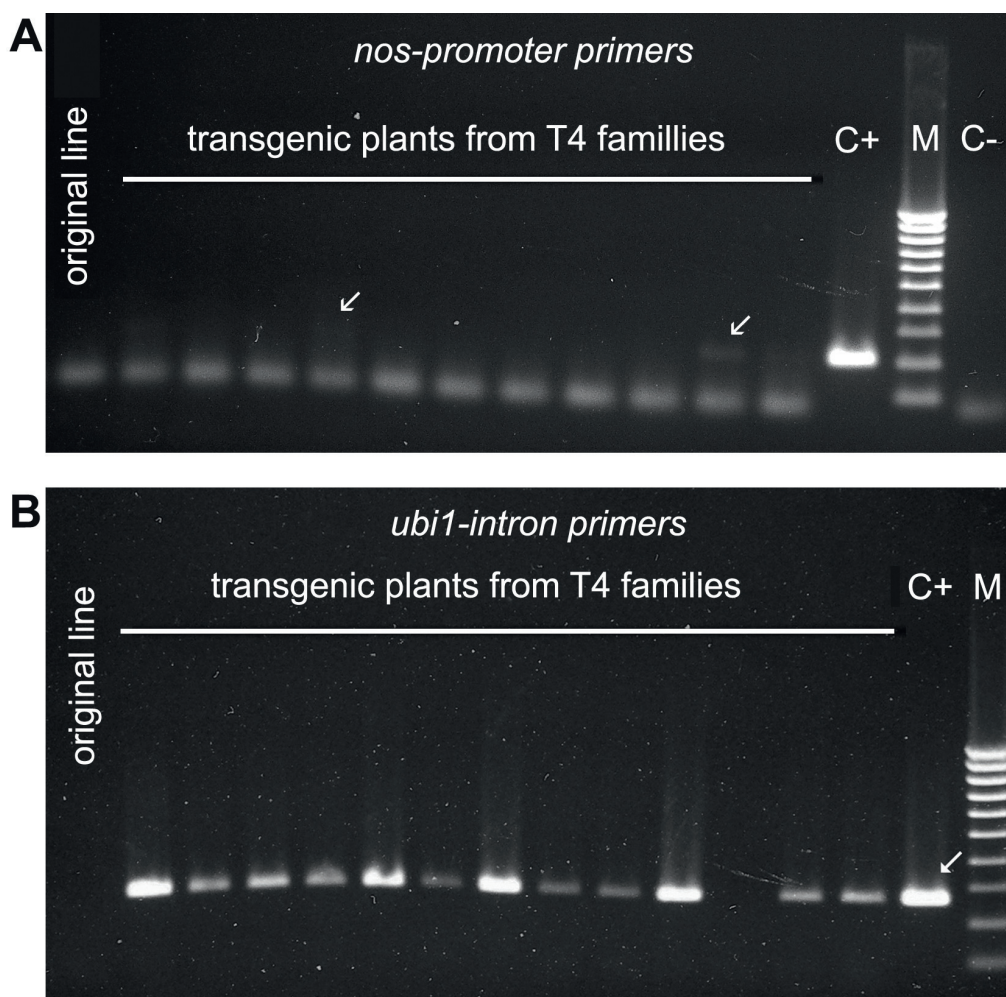


Рис. ПЦР-анализ трансгенных растений сорго (поколение T_4), несущих генетическую конструкцию для сайленсинга γ -кафирина (Elkonin et al., 2016b) с праймерами, амплифицирующими фрагмент *nos*-промотора, расположенного в составе конструкции перед маркерным геном *bar* (A), и *ubi1*-интрона, расположенного в конструкции между инвертированными фрагментами гена γ -кафирина (B). C+ ДНК *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pNRKAF (положительный контроль); C – отрицательный контроль (нет ДНК); M – маркеры длины фрагментов ДНК. Специфические фрагменты отмечены стрелками.

Fig. PCR analysis of transgenic sorghum plants (T_4 generation) carrying a genetic construct for silencing γ -kafirin (Elkonin et al., 2016b) with primers amplifying a *nos* promoter fragment located in the construct in front of the *bar* marker gene (A) and *ubi1*-intron located in the construct between the inverted fragments of the γ -kafirin gene (B). C+ DNA of *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pNRKAF (positive control); C – negative control (no DNA); M – markers of DNA fragment length. Specific fragments are marked with arrows.

Редактирование нуклеотидных последовательностей генов кафиринов

В приведенных выше примерах подавление синтеза кафиринов осуществляется посредством механизма РНК-сайленсинга, включающего синтез коротких интерферирующих РНК (siРНК), последующего расщепления мРНК гена-мишени и ингибирования трансляции – то-есть, в результате функционирования ряда важных эпигенетических механизмов. Однако известно, что эпигенетические механизмы у растений проявляют высокую чувствительность к условиям выращивания и факторам окружающей среды (температура, влажность почвы и воздух и т.д.). Сообщалось, что температура может оказывать существенное влияние на РНК-сайленсинг (Tuttle et al., 2008). Также было показано, что деградация мРНК, индуцированная посредством микро-РНК, и ингибирование трансляции зависят от температуры роста растений (von Born et al., 2018). Следовательно, эффективность подавления синтеза кафирина конструкциями для РНК-сайленсинга может быть чувствительна к условиям выращивания растений. У полученных нами трансгенных растений с генетической конструкцией для сайленсинга γ -кафирина, выращенных на экспериментальном участке, перевариваемость запасных белков в системе *in vitro* была значительно ниже, чем у растений из той же семьи, выращенных в вегетационных сосудах в климатической камере (Elkonin, Italyanskaya, 2017). Кроме того, сама генетическая конструкция, введенная в геном для индукции РНК-сайленсинга, может подвергаться «замолчанию» (своего рода, «сайленсинг сайленсера» – Reihel et al., 2011). В этой связи, индукция мутаций, которые нарушают функционирование генов кафирина на генетическом уровне, может быть более эффективным подходом для изменения содержания разных подклассов кафиринов в зерновках сорго.

Разработка методов редактирования генома, и, прежде всего, использование системы редактирования CRISPR/Cas9, открывает новые перспективы в решении проблемы увеличения питательной ценности зерна сорго, поскольку позволяет направленно индуцировать мутации в генах, контролирующих нужные признаки.

Подробное рассмотрение CRISPR/Cas-технологии геномного редактирования дано во множестве обзоров (Xing et al., 2014; Xu et al., 2015; Kuluev et al., 2019). В системе редактирования на основе нуклеазы Cas9 узнаваемая первой последовательность, соседствующая с протоспейсером (мишенью) (Protospacer Adjacent Motif, PAM), расположена вслед за протоспейсером. Классический вариант нуклеазы Cas9 узнает PAM-последовательность NGG-3', которая, тем самым, служит опознавательным знаком мишени в редактируемой геномной ДНК. Протяженность спейсерных последовательностей гРНК (guide RNA) этих нуклеаз составляют 20 нуклеотидов. Наиболее важную для узнавания протоспейсе-

ра часть спейсерной последовательности, прилегающую к PAM-участку, называют “seed sequence” или “якорный участок”. Ее длина для нуклеаз из группы Cas9 составляет 8–12 нуклеотидов. Эндонуклеаза Cas9 производит двунитевые разрывы в ДНК-мишени, расположенные на 3 нуклеотида выше PAM-последовательности. В результате таких разрывов в целевом сайте возникают инсерции или делеции, которые могут приводить к сдвигам рамки считывания и нуль-мутациям.

Недавно, используя инструмент редактирования генома CRISPR/Cas9, Ли с коллегами (Li et al., 2018) индуцировали мутации в консервативной области генов, кодирующих сигнальный пептид 22 кДа α -кафирина, ответственный за упаковку α -кафирина в белковые тельца. Мутации сайта-мишени были получены в каждом из 20 генов семейства k1C и представляли собой небольшие делеции (1-33 пн), и – реже – инсерции (1-16 пн). В зерновках растений T₁ и T₂ наблюдалось снижение уровня α -кафирина, сопровождавшееся измененной ультраструктурой белковых телец и модификацией текстуры эндосперма. У некоторых растений из поколения T₂ отмечена повышенная перевариваемость белка и содержание лизина. Вполне очевидно, что этот подход открывает новые перспективы в создании линий сорго с улучшенной питательной ценностью зерна.

Обогащение аминокислотами и витаминами

Многочисленные исследования, опубликованные до настоящего времени, четко продемонстрировали, что методы генной инженерии могут быть весьма перспективны для обогащения зерна злаков незаменимыми аминокислотами (лизином, триптофаном, метионином) и микроэлементами (см. обзор: Elkonin et al., 2016a). При использовании эндосперм-специфичных промоторов экспрессия вводимых генов обеспечивается именно в зерновках, а не в соматических тканях растения. К сожалению, на сегодняшний день опубликовано лишь одно сообщение о получении трансгенных растений сорго с повышенным содержанием лизина (до 40-60%) (Zhao et al., 2003). Очевидно, что развитие работ в этом направлении сдерживалось отсутствием до недавнего времени высокоэффективных методов получения трансгенных растений сорго. По мере развития технологий генетической трансформации, исследования в этом направлении будут развиваться.

Во многих странах Азии и Африки, в которых сорго является основным продуктом питания, люди страдают от нехватки β -каротина (провитамина А). В зерне сорго его содержание составляет 0.5 мг/кг, причем оно резко падает в процессе хранения зерна из-за его окисления. Для увеличения содержания β -каротина в зерне сорго и обеспечения его стабильности при хранении в генотип

сорта Тх430 было введено три генетические конструкции, кодирующие ферменты, участвующие в его биосинтезе (Che et al., 2016), а также ген ячменя *HGGT*, кодирующий геранил-трансферазу, участвующую в синтезе витамина *E*, препятствующего окислению β -каротина. В результате были получены трансгенные линии, у которых содержание β -каротина значительно возросло: до 7.3–12.3 мкг/г против 0.5 мкг/г в нетрансгенной контрольной линии, при этом время его полураспада увеличилось с 4 до 10 недель. Это исследование является ярким примером эффективности подхода генной инженерии для изменения метаболизма растений для удовлетворения потребностей человека.

Заключение

Результаты экспериментов, выполненных несколькими группами исследователей, убедительно свидетельствуют о возможности улучшения питательной ценности зернового сорго с помощью инструментов современной генетики и биотехнологии. Полученные линии и мутанты характеризуются улучшенной перевариваемостью белков зерна в системе *in vitro*, повышенным содержанием незаменимых аминокислот (лизина) или витаминов (каротина). При этом, наиболее перспективным подходом представляется использование методов геномного редактирования, которые позволяют вносить изменения

в структуру генов, кодирующих ключевые процессы биосинтеза, но не изменять их экспрессию на эпигенетическом уровне, что имеет место при использовании РНК-интерференции.

Дальнейший прогресс в данном направлении связан с совершенствованием методов генетической трансформации сорго, а именно, с использованием питательных сред для эффективной индукции соматического эмбриогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* (Elkonin, Pakhomova, 2000; Nirwan, Kothari, 2003; Belide et al., 2017); «гипервирулентных» штаммов с дополнительными копиями *vir*-генов на специально сконструированных Ti-плазмидах («супербинарных» векторах), либо на дополнительных («хелперных») плазмидах (Wu et al., 2014; Che et al., 2018); векторов, содержащих гены морфогенетических регуляторов *Baby boom* (*Bbm*) и *Wuschel* (*Wus*) (Lowe et al., 2016; Mookkan et al., 2017). При этом включение в состав генетических конструкций гена рекомбиназы *Cre* и сайтов *loxP*, фланкирующих гены *Bbm* и *Wus*, позволяет получать трансгенные растения, несущие только целевой ген и не содержащие генов *Bbm*, *Wus* и *Cre*. Применение данного подхода может быть перспективным для получения безмаркерных трансгенных растений и, что особо значимо, трансгенных линий, которые могут быть использованы в пищевых целях.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ, грант №19-016-00117.

References / Литература

- Bean S.R., Iorger B.P., Wilson J.D., Tilley M., Rhodes D., Herald T.J. Structure and chemistry of sorghum grain. In: Rooney W. (ed.). *Achieving sustainable cultivation of sorghum*. Vol. 2. Sorghum utilization around the world. Cambridge, UK: Burleigh Dodds Science Publishing Limited; 2018. p.3-29. DOI: 10.19103/as.2017.0015.21
- Belide S., Vanhercke T., Petrie J.R., Singh S.P. Robust genetic transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) using differentiating embryogenic callus induced from immature embryos. *Plant Methods*. 2017;13:109. DOI: 10.1186/s13007-017-0260-9
- Belton P.S., Delgadillo I., Halford N.G., Shewry P.R. Kafirin structure and functionality. *Journal of Cereal Science*. 2006;44:272-286. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.05.004
- Che P., Zhao Z.-Y., Glassman K. et al. Elevated vitamin E content improves all-trans β -carotene accumulation and stability in biofortified sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113:11040-11045. DOI: 10.1073/pnas.1605689113
- Che P., Anand A., Wu E., Sander J.D., Simon M.K., Zhu W., et al. Developing a flexible, high-efficiency *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation system with broad application. *Plant Biotechnology J*. 2018;16:1388–1395. DOI: 10.1111/pbi.12879
- Chiquito-Almanza E., Ochoa-Zarzosa A., Lypez-Meza J.E., Pecina-Quintero V., Nuñez-Colín C.A., Anaya-López J.L. A new allele of γ -kafirin gene coding for a protein with high lysine content in Mexican white sorghum germplasm. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016;96(10):3342-3350. DOI: 10.1002/jsfa.7513
- Cremer J.E., Bean S.R., Tilley M.M., Iorger B.P., Ohm J.B., Kaufman R.C. et al. Grain Sorghum Proteomics: Integrated Approach toward Characterization of Endosperm Storage Proteins in Kafirin Allelic Variants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62:9819-9831. DOI: 10.1021/jf5022847
- De Mesa-Stonestreet N.J., Alavi S., Bean S.R. Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. *Journal of Food Science*. 2010;75:90-104. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01623.x
- Da Silva L.S. Transgenic sorghum: Effects of altered kafirin synthesis on kafirin polymerisation, protein quality, protein body structure and endosperm texture [PhD Thesis]. South Africa: University of Pretoria, Department of Food Science, Faculty of Natural and Agricultural Sciences; 2012. 144 p.
- Da Silva L.S., Jung R., Zhao Z.-Y., Glassman K., Taylor J., Taylor J.R. Effect of suppressing the synthesis of different kafirin sub-classes on grain endosperm texture, protein body structure and protein nutritional quality in improved sorghum lines. *Journal of Cereal Science*. 2011;54:160-167. DOI: 10.1016/j.jcs.2011.04.009
- Elkonin L.A., Pakhomova N.V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000;61:115-123. DOI: 10.1023/A:1006472418218
- Elkonin L.A., Domanina I.V., Italiyanskaya Yu.V. Genetic engineering as a tool for modification of seed storage proteins and improvement of nutritional value of cereal grain. *Agricultural Biology*. 2016a;51(1):17-30 [In Russian] (Эльконин Л.А., Доманина И.В., Италийанская Ю.В. Генетическая инженерия как инструмент модификации состава запасных белков и улучшения питательной ценности зерна злаков. *Сельскохозяйственная биология*. 2016a;51(1):17-30). DOI: 10.15389/agrobiol.2016.1.17rus
- Elkonin L.A., Italiyanskaya J.V., Domanina I.V., Selivanov N.Y., Rakitin A.L., Ravin N.V. Transgenic sorghum with improved

- digestibility of storage proteins obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2016b;63:678-689. DOI: 10.1134/S1021443716050046
- Elkonin L.A., Italyanskaya Yu.V. *In vitro* digestibility of storage endosperm proteins of transgenic sorghum plants carrying genetic construct for silencing of the gamma-kafirin gene. *Advances in Current Natural Sciences*. 2017;12:96-100 [In Russian] (Эльконин Л.А., Итальянская Ю.В. Перевариваемость *in vitro* запасных белков эндосперма трансгенных растений сорго, несущих генетическую конструкцию для сайленсинга гена гамма-кафирина. *Успехи современного естествознания*. 2017;12:96-100.). DOI: 10.17513/use.36612
- Ezeogu L.I., Duodu K.G., Taylor J.R.N. Effects of endosperm texture and cooking conditions on the *in vitro* starch digestibility of sorghum and maize flours. *Journal of Cereal Science*. 2005;42:33-44. DOI: 10.1016/j.jcs.2005.02.002
- Godwin I.D., Williams S.B., Pandit P.S., Laidlaw H.K.C. Multifunctional grains for the future: genetic engineering for enhanced and novel cereal quality. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 2009;45:383-399. DOI: 10.1007/s11627-008-9175-5
- Grootboom A.W., Mkhonza N.L., Mbambo Z., O'Kennedy M.M., da Silva L.S., Taylor J. et al. Co-suppression of synthesis of major α -kafirin sub-class together with γ -kafirin-1 and γ -kafirin-2 required for substantially improved protein digestibility in transgenic sorghum. *Plant Cell Reports*. 2014;33:521-537. DOI: 10.1007/s00299-013-1556-5
- Hansen J., Sato M., Ruedy R., Lo K., Lea D.W., Medina-Elizade M. Global temperature change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103:14288-14293. DOI:10.1073/pnas.0606291103
- Henley E.C., Taylor J.R.N., Obukosia S.D. The Importance of Dietary Protein in Human Health: Combating Protein Deficiency in Sub-Saharan Africa through Transgenic Biofortified Sorghum. In: Taylor S.L. (ed.) *Advances in Food and Nutrition Research*. Burlington, USA: Academic Press, 2010; Vol.60. p.21-52. DOI: 10.1016/S1043-4526(10)60002-2
- Huang S., Frizzi A., Florida C.A., Kruger D.E., Luethy M.H. High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD α -zeins. *Plant Molecular Biology*. 2006;61:525-535. DOI: 10.1007/s11103-006-0027-6
- Kawakatsu T., Hirose S., Yasuda H., Takaiwa F. Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation. *Plant Physiology*. 2010;154:1842-1854. DOI: 10.1104/pp.110.164343
- Kuluev B.R., Gumerova G.R., Mikhaylova E.V., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Vershinina Z.R. et al. Delivery of CRISPR/Cas components into higher plant cells for genome editing. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019;66(5):694-706. DOI: 10.1134/S102144371905011X
- Kumar T., Dweikat I., Sato S., Ge Z., Nersesian N., Chen H. et al. Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Biotechnology Journal*. 2012;10:533-544. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00685.x
- Laidlaw H.K.C., Mace E.S., Williams S.B., Sakrewski K., Mudge A.M., Prentis P.J. et al. Allelic variation of the beta-, gamma- and delta-kafirin genes in diverse Sorghum genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*. 2010;121(7):1227-1237. DOI: 10.1007/s00122-010-1383-9
- Li A., Jia S., Yobi A., Ge Z., Sato S.J., Zhang C. et al. Editing of an alpha-kafirin gene family increases digestibility and protein quality in sorghum. *Plant Physiology*. 2018;177(4):1425-1438. DOI: 10.1104/pp.18.00200
- Lowe K., Wu E., Wang N., Hoerster G., Hastings C., Cho M.-J. et al. Morphogenic regulators Baby boom and Wuschel improve monocot transformation. *Plant Cell*. 2016;28:1998-2015. DOI: 10.1105/tpc.16.00124
- Mookkan M., Nelson-Vasilchik K., Hague J., Zhang Z.J., Kausch A.P. Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators BABY BOOM and WUSCHEL2. *Plant Cell Reports*. 2017;36:1477-1491. DOI: 10.1007/s00299-017-2169-1
- Mehlo L., Mbambo Z., Bado S., Lin J., Moagi S.M., Buthelezi S. et al. Induced protein polymorphisms and nutritional quality of gamma irradiation mutants of sorghum. *Mutation Research*. 2013;749(1-2):66-72. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2013.05.002
- Mudge S.R., Campbell B.C., Mustapha N.B., Godwin I.D. Genomic Approaches for Improving Grain Quality of Sorghum. In: Rakshit S., Wang Y.-H. (eds.). *The Sorghum Genome*. Springer International Publishing AG; 2016. p.189-205. DOI: 10.1007/978-3-319-47789-3_10
- Nirwan R.S., Kothari S.L. High copper levels improve callus induction and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 2003;39:161-164. DOI: 10.1079/IVP2002385
- Oria M.P., Hamaker B.R., Shull J.M. Resistance of sorghum α -, β - and γ -kafirins to pepsin digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995;43(8):2148-2153.
- Oria M.P., Hamaker B.R., Axtell J.D., Huang C.P. A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97:5065-5070. DOI: 10.1073/pnas.080076297
- Reichel M., Li J., Millar A.A. Silencing the silencer: strategies to inhibit microRNA activity. *Biotechnology Letters*. 2011;33(7):1285-1292. DOI: 10.1007/s10529-011-0590-z
- Schmidt M.A., Barbazuk W.B., Sandford M., May G., Song Z., Zhou W. et al. Silencing of soybean seed storage proteins results in a rebalanced protein composition preserving seed protein content without major collateral changes in the metabolome and transcriptome. *Plant Physiology*. 2011;156(1):330-345. DOI: 10.1104/pp.111.173807
- Shewry P.R. Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science*. 2007;46(3):239-250. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.06.006
- Tesso T., Ejeta G., Chandrashekar A., Huang C.-P., Tandjung A., Lewamy M. et al. A novel modified endosperm texture in a mutant high-protein digestibility/high-lysine grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Cereal Chemistry*. 2006;83:194-201. DOI: 10.1094/CC-83-0194
- Tuttle J.R., Idris A.M., Brown J.K., Haigler C.H., Robertson D. Geminivirus-Mediated Gene Silencing from Cotton Leaf Crumple Virus Is Enhanced by Low Temperature in Cotton. *Plant Physiology*. 2008;148(1):41-50. DOI: 10.1104/pp.108.123869
- Von Born P., Bernardo-Faura M., Rubio-Somoza I. An artificial miRNA system reveals that relative contribution of translational inhibition to miRNA-mediated regulation depends on environmental and developmental factors in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. 2018;13(2):e0192984. DOI: 10.1371/journal.pone.0192984
- Weaver C.A., Hamaker B.R., Axtell J.D. Discovery of grain sorghum germplasm with high uncooked and cooked *in vitro* protein digestibility. *Cereal Chemistry*. 1998;75:665-670.
- Wong J.H., Lau T., Cai N., Singh J., Pedersen J.F., Vensel W.H. et al. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *Journal of Cereal Science*. 2009;49:73-82. DOI: 10.1016/j.jcs.2008.07.013
- Wu Y., Messing J. Proteome balancing of the maize seed for higher nutritional value. *Front Plant Sci*. 2014;5:240. DOI: 10.3389/fpls.2014.00240
- Wu Y., Yuan L., Guo X., Holding D.R., Messing J. Mutation in the seed storage protein kafirin creates a high-value food trait in sorghum. *Nature Communications*. 2013;4:2217. DOI: 10.1038/ncomms3217
- Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., Zhang H.Y., Han C.Y., Liu B. et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants // *BMC Plant Biology*. 2014;14:327. DOI: 10.1186/s12870-014-0327-y
- Xu K., Ren C., Liu Z., Zhang T., Zhang T., Li D. et al. Efficient genome engineering in eukaryotes using Cas9 from *Streptococcus thermophilus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72:383-399. DOI: 10.1007/s00018-014-1679-z
- Zhang G., Hamaker B.R. Low α -amylase starch digestibility of cooked sorghum flours and the effect of protein. *Cereal Chemistry*. 1998;75:710-713. DOI: 10.1094/CCHEM.1998.75.5.710
- Zhao Z.-Y., Glassman K., Sewalt V., Wang N., Miller M., Chang S. et al. Nutritionally improved transgenic sorghum. In: Vasil I.K. (ed.). *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2003. p.413-416. DOI: 10.1007/978-94-017-2679-5_85

Научный рецензируемый журнал

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

Научный редактор: Михайлова Е.И.
Переводчик: Шувалов С.В.
Корректор: Шувалов С.В.
Компьютерная верстка: Чухин Г.К.

Подписано в печать 30.12.2019 Формат бумаги 70×100 ¹/₈
Бумага офсетная. Печать офсетная
Печ. л. 6. Тираж 30 экз.

Сектор редакционно-издательской деятельности ВИР
190000, Санкт-Петербург, Большая Морская ул., 42, 44

ООО "Р-КОПИ"
Санкт-Петербург, пер. Гривцова, 6б

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2019, 2 (3)