

Письма

в

**ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ
ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ**

Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding

2023
ДЕКАБРЬ

Молекулярная биология • Генетика патогенных грибов • Оригинальное
исследование • Генетика растений • Биотехнология растений •
Оригинальное исследование

Том 9
№4

PISMAVAVILOV@BIONET.NSC.RU

ПИСЬМА В ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Сетевое издание
Листья

6

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основано в 2015 году
Периодичность четыре выпуска в год
DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-19

Учредитель

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), Новосибирск, Россия

Главный редактор

А.В. Кочетов – академик РАН, д-р биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Заместители главного редактора

Н.П. Гончаров – академик РАН, д-р биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Е.А. Салина – д-р биол. наук, профессор (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Ответственный секретарь

О.Ю. Шоева – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Редакционная коллегия

О.С. Афанасенко – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия)

О.В. Ваулин – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

М.А. Вишнякова – д-р биол. наук, профессор (Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия)

Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук, профессор (Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия)

Ю.Э. Гербек – канд. биол. наук (Еврейский университет в Иерусалиме, Реховот, Израиль)

И.М. Горобей – д-р с.-х. наук, профессор РАН (СО РАН, Новосибирск, Россия)

Е.И. Гультияева – д-р биол. наук (Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия)

Н.И. Дубовец – чл.-кор. НАН Беларуси, д-р биол. наук, доцент (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь)

И.К. Захаров – д-р биол. наук, профессор (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

К.В. Крутовский – канд. биол. наук, профессор (Гёттингенский университет им. Георга-Августа, Гёттинген, Германия)

А.М. Кудрявцев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия)

С.А. Лашин – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

А.Ю. Летягин – д-р мед. наук, профессор (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

П.Н. Мальчиков – д-р с.-х. наук (Самарский НИИ сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова, пос. Безенчук, Россия)

Е.А. Орлова – канд. с.-х. наук (СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

А.С. Пилипенко – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Ю.И. Рагино – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук, профессор (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

И.Д. Рашаль – академик АН Латвии, д-р биол. наук, профессор (Институт биологии Латвийского университета, Саласпилс, Латвия)

Р.Р. Садоян – д-р биол. наук, профессор (Армянский государственный педагогический университет им. Х. Абовяна, Ереван, Армения)

А.А. Соловьев – д-р биол. наук, профессор РАН, профессор (Всероссийский центр карантина растений, Москва, Россия)

Н.А. Сурин – академик РАН, д-р с.-х. наук, профессор (Федеральный исследовательский центр КНЦ СО РАН – обособленное подразделение Красноярский НИИ сельского хозяйства, Красноярск, Россия)

В.А. Трифонов – д-р биол. наук, профессор (Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия)

В.С. Фишман – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

С.В. Шеховцов – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Online edition

Letters

to **VAVILOV JOURNAL
OF GENETICS AND BREEDING**

Founded in 2015
Published four issues per year
DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-19

Founder

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICG SB RAS), Novosibirsk, Russia

Editor-in-Chief

A.V. Kochetov – Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Deputy Editors-in-Chief

N.I. Goncharov – Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

E.A. Salina – Professor, Dr. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Executive Secretary

O.Yu. Shoeva – Cand. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Editorial board

O.S. Afanassenko – Full Member of the RAS, Professor, Dr. Sci. (Biology) (All-Russia Research Institute for Plant Protection, St. Petersburg, Russia)

N.I. Dubovets – Corr. Member of the NAS of Belarus, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology) (Institute of Genetics and Cytology, NASB, Minsk, Belarus)

V.S. Fishman – Cand. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

T.A. Gavrilenko – Professor, Dr. Sci. (Biology) (N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia)

I.M. Gorobei – Dr. Sci. (Biology) (Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia)

E.I. Gulyaeva – Dr. Sci. (Biology) (All-Russia Research Institute for Plant Protection, Saint Petersburg, Pushkin, Russia)

Yu.E. Herbeck – Cand. Sci. (Biology) (The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel)

K.V. Krutovsky – Professor, Cand. Sci. (Biology) (Georg-August University of Göttingen, Göttingen, Germany)

A.M. Kudryavtsev – Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology) (Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia)

S.A. Lashin – Cand. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

A.Y. Letyagin – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

P.N. Malchikov – Dr. Sci. (Agricul.) (Tulaikov Research Institute of Agriculture, Russian Agricultural Academy, Bezenchuk, Samara oblast, Russia)

E.A. Orlova – Cand. Sci. (Agricul.) (Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

A.S. Pilipenko – Cand. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Yu.I. Ragino – Corr. Member of the RAS, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

I.D. Rashal – Full Member of the LAS, Professor, Dr. Sci. (Biology) (University of Latvia, Salaspils, Latvia)

R.R. Sadoyan – Professor, Dr. Sci. (Biology), Dean of the Faculty of Biology, Chemistry and Geography (Kh. Abovyan Armenian State Pedagogical University, Yerevan, Armenia)

S.V. Shekhovtsov – Cand. Sci. (Biology), Head of the Genogeography Sector of the Palearctic (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

A.A. Soloviev – Professor, Dr. Sci. (Biology), Deputy Director (All-Russian Plant Quarantine Center, Moscow, Russia)

N.A. Surin – Corr. Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Agricul.), Professor, Head of Scientific Direction

V.A. Trifonov – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

O.V. Vaulin – Cand. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

M.A. Vishnyakova – Professor, Dr. Sci. (Biology) (N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia)

I.K. Zakharov – Professor, Dr. Sci. (Biology) (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia)

СОДЕРЖАНИЕ • 2023 • 9 • 4

- 183 Редакционная статья
Путь в науку
Н.М. Бажан
- Молекулярная биология**
- 185 Обзор
Развитие сибирской школы
математической (системной) биологии
Н.А. Колчанов, С.А. Лашин, Ф.В. Казанцев, Ю.Г. Матушкин
- 192 Обзор
Дизайн искусственных полиэпитопных Т-клеточных
иммуногенов для создания профилактических
и терапевтических вакцин
Л.И. Карпенко, А.А. Ильичев
- Генетика патогенных грибов**
- 201 Оригинальное исследование
Характеристика популяций *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*,
существующих на мягкой пшенице в Поволжском
и Центральном регионах России, по микросателлитным локусам
Е.С. Сколотнева, Ю.В. Лаприна, О.А. Баранова, Т.М. Коломиец,
М.И. Киселева, В.Н. Кельбин, Е.А. Салина
- Генетика растений**
- 209 Обзор
Генетические основы детерминации
срока цветения у подсолнечника *Helianthus annuus* L.
А.Б. Щербань
- Биотехнология растений**
- 218 Оригинальное исследование
Создание фиолетовозерных гибридов в отдаленных
скрещиваниях тритикале, мягкой пшеницы и полбы
методом эмбриокультуры *in vitro*
Н.В. Петраш, П.И. Стёпочкин
- Юбилей**
- 224 Обзор
Юбилей профессора Людмилы Николаевны Трут
Л.Л. Васильева

CONTENTS • 2023 • 9 • 4

- 183 **Editorial**
Way to science
N.M. Bazhan
- 185 **Molecular biology**
Review
Development of the Siberian school
of mathematical (systems) biology
N.A. Kolchanov, S.A. Lashin, F.V. Kazantsev, Yu.G. Matushkin
- 192 **Review**
Design of artificial polyepitope T-cell immunogens
for the creation of prophylactic and therapeutic vaccines
L.I. Karpenko, A.A. Ilyichev
- 201 **Genetics of microorganisms**
Original article
Characteristics of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*
on bread spring wheat of the Volga region
and the Central region of Russia by microsatellite loci
*E.S. Skolotneva, Y.V. Laprina, O.A. Baranova, T.M. Kolomiets,
M.I. Kiseleva, V.N. Kelbin, E.A. Salina*
- 209 **Plant genetics**
Review
Genetic basis for determining the flowering period
in sunflower *Helianthus annuus* L.
A.B. Shcherban
- 218 **Plant biotechnology**
Original article
Development of purple-grain hybrids in distant
crosses of triticale, bread wheat and emmer
using the embryo culture
N.V. Petrash, P.I. Steepochkin
- 224 **Anniversary**
Review
Anniversary of Professor Lyudmila Nikolaevna Trut
L.L. Vasilyeva

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-20

Редакционная статья

Путь в науку

Н.М. Бажан  

Для цитирования: Бажан Н.М. Путь в науку. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):183-184. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-20

Editorial

Way to science

N.M. Bazhan  

For citation: Bazhan N.M. Way to science. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(4):183-184. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-20 (in Russian)

Текущий спецвыпуск журнала посвящен памяти Сергея Ивановича Бажана (1949–2022). С.И. Бажан родился в 1949 г. в станице Владимировская Зверевского района Ростовской области. Его отец, Иван Никонович, был украинцем, после войны окончил Черниговский политехнический институт и получил распределение на работу в Кузнецкий угольный бассейн. Так семья Бажанов оказалась в Сибири. Его мама, Тамара Ивановна, была донской казачкой, всю жизнь проработала учителем математики в средней школе. У Сергея есть два младших брата – Анатолий и Александр. Любовь и уважение царили в этой семье.

Сергей имел математический склад ума и побеждал на всех школьных олимпиадах по математике. Когда ему исполнилось 14 лет, он был приглашен в Физико-математическую школу в Академгородок. После окончания школы в 1966 г. он поступил на биологическое отделение факультета естественных наук Новосибирского государственного университета (НГУ). После третьего курса в 1969 г. Сергей поступил на кафедру физиологии в лабораторию эндокринологии, которой руководил доктор медицинских наук, профессор Михаил Григорьевич Колпаков (<https://museum.icgbio.ru/lichnosti/pervie>).

В это время в НГУ начали создавать новую специализацию – математическую биологию. Предполагалось, что математическое моделирование будет вестись по двум направлениям: генетика и физиология. Организация новой специализации была для Сергея большой удачей, поскольку

ку позволила ему в дальнейшей жизни успешно совмещать биологию и математику. В 1971 г. он окончил НГУ, поступил в аспирантуру Института физиологии и был призван в армию. Служил он год в войсках ПВО в Красноярском крае. О службе в армии сохранил на всю жизнь самые теплые воспоминания.

Когда Сергей вернулся из армии в 1972 г., лаборатория эндокринологии была переведена в состав Института цитологии и генетики СО АН СССР (ИЦиГ), где он учился в аспирантуре с 1972 по 1975 г. Трагическое событие – гибель 2 ноября 1974 г. в автомобильной катастрофе заведующего лабораторией Михаила Григорьевича Колпакова – изменило судьбу нас (аспирантов) и отечественного математического моделирования. В Институте исчезло направление исследования, связанное с эндокринологией. Кандидатская диссертация Сергея «Ренин-ангиотензинная регуляция секреции и метаболизма альдостерона» была выполнена по физиологии и защищена в Московском государственном университете в 1978 г. (Бажан, 1978).

После окончания аспирантуры встал вопрос о трудоустройстве. Сергею повезло, потому что в 1975 г. под новосибирским Академгородком, в Кольцово, началось создание Центра вирусологии. Руководил его организацией Лев Степанович Сандахчиев (<http://www.vector.nsc.ru/ramyati-Issandahchieva>), который лично пригласил Сергея на работу в теоретический отдел. Сергей был одним из первых сотрудников Центра. Начиная с 2000 г. он руководил

теоретическим отделом, в 2008 г. защитил докторскую диссертацию «Теоретическое исследование механизмов противовирусного иммунитета» (Бажан, 2008). Сергей любил свою работу, которая позволяла его могучим математическим способностям реализоваться в рамках биологии.

Всю свою жизнь он проработал в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор». Он занимался разработкой математических моделей для систем «вирус – хозяин», исследованием механизмов действия интерферона и противовирусного иммунитета. Рядом с ним под руководством Александра Алексеевича Ильичева и Ларисы Ивановны Карпенко работали экспериментаторы-генные инженеры, которые имели смелость проверять истинность его теоретических моделей. Их статья «Дизайн искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов для создания профилактических и терапевтических вакцин» публикуется в этом выпуске журнала (Карпенко, Ильичев, 2023).

Работоспособность Сергея была феноменальной. Он мог работать круглосуточно: сесть за компьютер уже после 21:00 и работать сколь угодно долго. Когда мы жили в Израиле, где ему делали пересадку костного мозга, он тоже работал. Каждый день он общался по телефону с Л.И. Карпенко, и в итоге за годы болезни (2019–2022 гг.) с его участием было опубликовано несколько статей в англоязычных журналах с высоким импакт-фактором (Bazhan et al., 2019, 2022; Karpenko et al., 2020; Borgoyakova et al., 2022).

Формально Сергей Иванович работал в ИЦиГ только в годы своей учебы в аспирантуре в 1972–1975 гг., однако фактически его связи с ИЦиГ не прерывались до конца жизни, поскольку он дружил и сотрудничал с Виталием Александровичем Лихошваем (Бажан, 2020). Их дружба началась со времени совместной работы в Центре вирусологии «Вектор». Еще в конце 1970-х гг. они вместе заложили вычислительную основу, а затем с коллегами развили блочно-модульную методологию автоматизации задач реконструкции и анализа математических моделей молекулярно-генетических систем. О вкладе Сергея в развитие системной биологии и о совместных с ним исследованиях написано в статье Н.А. Колчанова, С.А. Лашина, Ф.В. Казанцева и Ю.Г. Матушкина «Развитие сибирской школы математической (системной) биологии» (2023).

Сергей был моим мужем и другом, мы прожили с ним вместе более чем полвека. У нас трое детей (два сына и дочь) и четверо внуков. Он был верным другом для своих взрослых детей, никогда не давал оценочных суждений, был готовым выполнить любую их просьбу и по первому зову принимал участие во всех мероприятиях, которые затевали дети. В широком смысле слова Сережа был в дружеских отношениях со всеми, с кем ему приходилось сталкиваться по жизни. Но самыми близкими друзьями были для нас обоих Вера и Витя Чесноковы и Ира и Саша Керкисы. Жизнь развела нас с ними географически (Чесноковы живут в США, Керкисы – в Бразилии), но мы по сей день остаемся близкими людьми.

Подводя итог своим воспоминаниям, хочется перечислить самые яркие качества С.И. Бажана: могучий ум, инженерная смекалка, золотые руки, толерантность к слабости других

людей, доброта. У него был огромный запас терпения, который подпитывался его неисчерпаемой добротой. До сих пор не верится, что его больше нет на земле. Спасибо, что он был в нашей жизни. Уходя он оставил свет и добрую память. Подтверждением этому служит проведение в ИЦиГ по инициативе Н.А. Колчанова семинара, посвященного его памяти, и издание специального выпуска этого журнала.

Список литературы / References

- Бажан С.И. Ренин-ангиотензинная регуляция секреции и метаболизма альдостерона. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1977. [Bazhan S.I. Renin-angiotensin regulation of aldosterone secretion and metabolism. Cand. Sci. (Biol.) Dissertation. Moscow, 1977 (in Russian)]
- Бажан С.И. Теоретическое исследование механизмов противовирусного иммунитета. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Кольцово, 2008 [Bazhan S.I. Theoretical study of the mechanisms of antiviral immunity. Doctor Sci. (Biol.) Dissertation. Koltsovo, 2008 (in Russian)]
- Бажан С.И. Виталий Александрович Лихошвай: первые шаги в науке. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;6(4):164–167. DOI 10.18699/Letters2020-6-20 [Bazhan S.I. Vitaly Likhoshvai: the first steps in science. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;6(4):164–167. DOI 10.18699/Letters2020-6-20 (in Russian)]
- Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Дизайн искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов для создания профилактических и терапевтических вакцин. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):192–200. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-22 [Karpenko L.I., Ilyichev A.A. Design of artificial polyepitope T-cell immunogens for the creation of prophylactic and therapeutic vaccines. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(4):192–200. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-22 (in Russian)]
- Колчанов Н.А., Лашин С.А., Казанцев Ф.В., Матушкин Ю.Г. Развитие сибирской школы математической (системной) биологии. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):185–191. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-21 [Kolchanov N.A., Lashin S.A., Kazantsev F.V., Matushkin Yu.G. Development of the Siberian school of mathematical (systems) biology. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(4):185–191. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-21 (in Russian)]
- Bazhan S.I., Antonets D.V., Karpenko L.I., Oreshkova S.F., Kaplina O.N., Starostina E.V., Dudko S.G., Fedotova S.A., Ilyichev A.A. In silico designed Ebola virus T-cell multi-epitope DNA vaccine constructions are immunogenic in mice. *Vaccines (Basel)*. 2019;7(2):34. DOI 10.3390/vaccines7020034
- Bazhan S.I., Antonets D.V., Starostina E.V., Ilyicheva T.N., Kaplina O.N., Marchenko V.Y., Volkova O.Y., Bakulina A.Y., Karpenko L.I. In silico design of influenza A virus artificial epitope-based T-cell antigens and the evaluation of their immunogenicity in mice. *J. Biomol. Struct. Dyn*. 2022;40(7):3196–3212. DOI 10.1080/07391102.2020.1845978
- Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Starostina E.V., Zadorozhny A.M., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shanshin D.V., Baranov K.O., Volkova N.V., Zaitsev B.N., Orlova L.A., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Danilenko E.D., Bazhan S.I., Shcherbakov D.N., Taranin A.V., Ilyichev A.A. Self-assembled particles combining SARS-CoV-2 RBD protein and RBD DNA vaccine induce synergistic enhancement of the humoral response in mice. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23(4):2188. DOI 10.3390/ijms23042188
- Karpenko L.I., Apartsin E.K., Dudko S.G., Starostina E.V., Kaplina O.N., Antonets D.V., Volosnikova E.A., Zaitsev B.N., Bakulina A.Y., Venyaminova A.G., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Cationic polymers for the delivery of the Ebola DNA vaccine encoding artificial T-cell immunogen. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(4):718. DOI 10.3390/vaccines8040718

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.07.2023. После доработки 03.10.2023. Принята к публикации 10.10.2023.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-21

Обзор

Развитие сибирской школы математической (системной) биологии

Н.А. Колчанов ^{1,2,3}, С.А. Лашин ^{1,2,3}, Ф.В. Казанцев ^{1,2,3}, Ю.Г. Матушкин ^{1,2,3} ✉

Аннотация: В статье описан вклад Сергея Ивановича Бажана в развитие методов компьютерного моделирования сложных биологических систем. Химико-кинетический метод моделирования, предложенный С.И. Бажаном и его коллегой В.А. Лихошваевым во время работы в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» в 1970-х гг., оказался исключительно удачным и эффективным инструментом исследования динамики сложных, иерархически организованных биологических систем. Данный способ представляет собой одно из важнейших достижений сибирской школы математической/системной биологии и биоинформатики. Концепции, почти полвека назад ставшие основой этого подхода, до сих пор соответствуют тенденциям современной системной биологии.

Ключевые слова: С.И. Бажан; системная биология; молекулярно-генетические системы; обобщенный химико-кинетический метод моделирования.

Для цитирования: Колчанов Н.А., Лашин С.А., Казанцев Ф.В., Матушкин Ю.Г. Развитие сибирской школы математической (системной) биологии. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):185-191. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-21

Review

Development of the Siberian school of mathematical (systems) biology

N.A. Kolchanov ^{1,2,3}, S.A. Lashin ^{1,2,3}, F.V. Kazantsev ^{1,2,3}, Yu.G. Matushkin ^{1,2,3} ✉

Abstract: The article provides information about the contribution of Sergey I. Bazhan to the development of methods of computer modeling of complex biological systems. The chemical-kinetic method of modeling proposed in the 1970s by S.I. Bazhan and his colleague V.A. Likhoshvai during their work in State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" proved to be an extremely successful and effective tool for studying the dynamics of complex, hierarchically organized biological systems. It represents one of the most important achievements of the Siberian school of mathematical/systems biology and bioinformatics. The concepts underlying this approach almost half a century ago still correspond to the trends of modern systems biology.


Key words: S.I. Bazhan; system biology; molecular-genetic systems; generalized chemical-kinetic method of modeling.


For citation: Kolchanov N.A., Lashin S.A., Kazantsev F.V., Matushkin Yu.G. Development of the Siberian school of mathematical (systems) biology. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(4):185-191. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-21 (in Russian)

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 mat@bionet.nsc.ru

 Колчанов Н.А., Лашин С.А., Казанцев Ф.В., Матушкин Ю.Г., 2023

Становление Сергея Ивановича Бажана как ученого неразрывно связано со знаковыми научными событиями, происходившими в новосибирском Академгородке в начале 1960-х гг. В 1962 г. в Академгородок по приглашению руководителей Сибирского отделения академии наук СССР переехал чл.-кор. АН СССР, доктор физико-математических наук, профессор Алексей Андреевич Ляпунов – один из лидеров теоретической и прикладной кибернетики СССР, возглавивший отдел кибернетики в Институте математики СО АН СССР. В 1968 г. по инициативе А.А. Ляпунова и сотрудника ИЦиГ СО АН СССР (в настоящее время – ИЦиГ СО РАН) доктора биологических наук, профессора Вадима Александровича Ратнера, талантливого генетика-теоретика (физика по образованию), на биологическом отделении ФЕН НГУ была открыта специализация «математическая биология». Студенты-биологи, начавшие обучение по этой специальности в 1968 г., выполняли дипломные работы на базе ИЦиГ СО АН СССР в области теоретической генетики под руководством В.А. Ратнера.

Набор студентов-матбиологов 1969 г., в который входил С.И. Бажан, специализировался в области теоретической эндокринологии, выполняя дипломные работы также на базе ИЦиГ СО АН СССР под руководством математика А.А. Ляпунова и физиолога доктора медицинских наук, профессора Михаила Григорьевича Колпакова. Союз этих ученых имел понятные мотивации: крупнейший теоретик А.А. Ляпунов видел в эндокринологии область, на которую наиболее ярко проецировались базовые идеи кибернетики, а выдающийся экспериментатор М.Г. Колпаков отчетливо понимал, что развитие физиологической генетики требует системно-кибернетического подхода к изучению эндокринных механизмов регуляции функций организмов.

Дипломная работа С.И. Бажана была посвящена математическому моделированию глюкокортикоидной системы. Поступив после окончания НГУ в аспирантуру ИЦиГ СО РАН, С.И. Бажан также работал над исследованиями эндокринологической тематики, выполнив и успешно защитив кандидатскую диссертацию по теме «Ренин-ангиотензинная регуляция секреции и метаболизма альдостерона». Вряд ли в то время в СССР было место, кроме НГУ и ИЦиГ СО АН СССР, где под руководством выдающихся ученых студент, а затем молодой специалист мог бы за столь короткое время получить глубокие знания и навыки для работы в сложнейшем направлении, которому, поступив в 1975 г. на работу во Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии (ВНИИМБ), Сергей Иванович посвятил жизнь – компьютерному анализу и моделированию сложных биологических систем.

Начало работы С.И. Бажана во ВНИИМБ совпало по времени с периодом бурного развития наук о жизни, стремительным накоплением различных типов экспериментальных данных, соответствующих разным уровням организации биологических систем (от биохимических и молекулярно-генетических процессов, протекающих в отдельных клетках, до уровня отдельных органов, целостного организма и даже экосистемы). Стало понятно, что понимание и практическое применение огромных объемов биологических экспериментальных данных исключительно высокой слож-

ности невозможны без развития новых информационных технологий, эффективных методов компьютерного анализа данных и математического моделирования биологических систем и процессов на различных иерархических уровнях организации живых систем: начиная с геномов, генов, белков, метаболических путей и генных сетей, включая клетки и ткани, и заканчивая целостными организмами. В ответ на этот вызов возникло два взаимосвязанных научных направления: **биоинформатика**, задача которой состоит в компьютерном анализе генетических макромолекул – ДНК, РНК, белков, и **системная компьютерная биология**, предназначенная для реконструкции, компьютерного анализа и моделирования биологических систем различной сложности, функционирование которых контролируется информацией, закодированной в геномах организмов.

К результатам исследований, внесшим важнейший вклад в развитие системной компьютерной биологии, следует отнести концепцию молекулярно-генетических систем (МГС) управления, сформулированную В.А. Ратнером (Ратнер, 1966). Она включает такие базовые понятия, как иерархическая блочно-модульная организация МГС; архив генетической информации, в котором записаны генетические программы, контролирующие воспроизведение организма, его развитие и взаимодействие с окружающей средой; блок управления (система регуляторных механизмов, контролирующая функционирование МГС, управляемых генетическими программами) и др. В рамках этой концепции любая МГС при моделировании рассматривается как набор молекулярно-генетических компонент – блоков (модулей), взаимодействующих друг с другом через продукты своего функционирования (Ратнер, 1992, 2001). В качестве конкретного блока могут выступать ферментативная реакция, подсистема матричного синтеза, целый метаболический путь или даже физиологическая система организма. Удобство такого подхода заключается в разработке библиотеки моделей, с помощью которых возможно описать динамику функционирования различных молекулярно-генетических блоков. Это позволяет осуществлять генерацию широкого спектра моделей МГС на основе интеграции конкретных поднаборов модулей (в зависимости от специфики решаемых задач).

В рамках этого подхода В.А. Ратнер и его ученики и молодые коллеги Р.Н. Чураев и Г.Х. Кананян в 1972–1979 гг. разработали подходы к моделированию динамики МГС (Чураев, Ратнер, 1972а, б, 1975; Чураев, 1975; Кананян и др., 1979а, б, в) и на этой основе впервые в мировой науке построили портретную модель сложной МГС, контролирующей онтогенез фага лямбда на основе информации, закодированной в его геноме. Одновременно с этим С.И. Бажан с коллегой В.А. Лихошваев в конце 70-х гг. прошлого столетия, работая во ВНИИМБ, заложили основы блочно-модульного подхода к конструированию моделей МГС, который они назвали обобщенным химико-кинетическим методом моделирования (ОХКММ) (Лихошвай и др., 2000; Likhoshvai et al., 2001; Likhoshvai, Ratusnyi, 2007).

ОХКММ не только концепция, но и предметно-ориентированный язык создания моделей (DSL, domain specific language). Наличие собственного языка представления мо-

делей, наиболее подходящего под конкретную задачу, – довольно распространенный путь (Blinov et al., 2004; Cooling et al., 2008; Shapiro et al., 2013; Galdzicki et al., 2014). Реализующий ОХКММ язык описания моделей SibML – один из первых такого рода языков, позволяющих генерировать математические модели. Причем этот подход давал возможность масштабировать модель на несколько компарментов, что способствовало запуску в ИЦиГ СО РАН серии работ по исследованию моделей корня растения сначала в одномерном, а затем в двумерном случае с учетом нескольких типов тканей, существенно не меняя инструментарий и базовые параметры моделей (Лихошвай и др., 2007; Mironova et al., 2010).

ОХКММ был пионерским в задачах генерации математических моделей МГС. Появившиеся позднее подходы, например, *Cellerator* (Shapiro et al., 2003), уступали по функциональности и порождали много «лишних» математических сущностей при добавлении компарментов или иных биологических условий/ограничений, что только усложняло модель и увеличивало вычислительную нагрузку при проведении экспериментов *in silico*. Эти идеи получили развитие в работах С.И. Бажана (Bazhan, Belova, 1999; Бажан, 2005; Nizolenko et al., 2016; Bazhan et al., 2019), выполнявшихся в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор», а также в исследованиях В.А. Лихошвай, перешедшего в 1998 г. на работу в ИЦиГ СО РАН (Лихошвай и др., 2003; Лихошвай, 2008; Казанцев и др., 2009). Такая синергия привела к совершенствованию технологии моделирования и использованию разработанных подходов для решения практических задач в разных разделах биологии (Bazhan et al., 1995; Ратушный и др., 2003; Фадеев и др., 2008; Likhoshvai et al., 2014). Расширенные правила и рекомендации к работе по реконструкции моделей МГС в рамках ОХКММ в итоге получили название «метод элементарных подсистем» (Лихошвай, 2008).

С помощью ОХКММ в ИЦиГ СО РАН по заказу японской биотехнологической компании Ajinomoto был выполнен ответственный проект по созданию базы знаний компьютерных моделей элементарных метаболических подсистем *E.coli* (Khlebodarova et al., 2006; Ratushny, Khlebodarova, 2006) – одной из первых в мире моделей бактериальной электронной клетки. Развитие в ИЦиГ СО РАН ОХКММ как программного комплекса с расширенной функциональностью по высокопроизводительным вычислениям (Казанцев и др., 2012) обеспечило качественно новый уровень решения задач моделирования МГС. В настоящее время ОХКММ успешно применяется в ИЦиГ СО РАН при решении задач исследования комплексных МГС (Oshchepkova-Nedosekina, Likhoshvai, 2007; Likhoshvai et al., 2010; Хлебодарова и др., 2013; Novoselova et al., 2015).

Реализация в ОХКММ на базе высокопроизводительных вычислительных систем обеспечила решение широкого круга задач биологии развития растений, включая изучение метаболизма гормона ауксина в клетках меристемы побега растений (Акбердин и др., 2009) и исследование потоков транспорта ауксина в ансамблях клеток корня растений на основе моделей размерностью от десятков до сотен уравнений в одной системе обыкновенных дифференциаль-

ных уравнений (Лихошвай и др., 2009; Mironova et al., 2010; Mironova et al., 2012; Novoselova et al., 2013, 2015; Hong et al., 2017; Pasternak et al., 2019).

Огромное преимущество ОХКММ заключается в том, что этот метод позволяет интегрировать в одной модели процессы, протекающие во множестве компарментов, соответствующих различным иерархическим уровням организации биологических систем (от биохимических процессов в отдельных клетках до уровня целостного организма). Именно эта особенность ОХКММ использована в совместной работе сотрудников лаборатории теоретической генетики ИЦиГ СО РАН (Н.А. Колчанов) с командой С.И. Бажана в рамках проекта Минобрнауки России «Разработка комплекса программ для компьютерного моделирования и дизайна в области постгеномной системной биологии» (2005–2006 гг.).

На рисунке 1 показана блок-схема интерфейса разработанной в рамках этого проекта С.И. Бажаном и коллегами программной системы «Моделирование инфекции, вызываемой *Mycobacterium tuberculosis*». Эта система моделирует туберкулезную (ТБ) инфекцию в легких человека при взаимодействии бактерии (патогена) с организмом (системой иммунитета). Модель описывает клеточно опосредованный иммунный ответ человека при инфекции *M. tuberculosis*. Она создавалась с целью интеграции известных особенностей взаимодействия «хозяин – патоген» и для проверки гипотез о роли специфических цитокинов в исходе инфекции и переключении ответа с Th1 на Th2, а также для выявления факторов, которые ведут к острой или латентной инфекции.

Модель учитывает описанные ниже базовые биологические компоненты:

1. **Макрофаги.** Рассмотрены три популяции макрофагов: покоящиеся, активированные и хронически инфицированные.
2. **Цитокины.** Рассмотрены четыре цитокина, которые играют ключевую роль в развитии ТБ-инфекции у человека; учтены их принципиальные эффекты, вовлеченные в клеточную активацию, деактивацию и дифференцировку: IL-10, IL-12, IL-4 и IFN- γ .
3. **CD4⁺ Т-лимфоциты.** Эти клетки продуцируют цитокины, которые управляют клеточно опосредованным иммунным ответом, кроме того, они элиминируют инфицированные макрофаги через апоптоз.
4. **Субпопуляции бактерий.** Рассмотрены две популяции бактерий: внеклеточные и внутриклеточные. Различия в локализации бактерий диктуют скорости роста, что может быть важным для динамики инфекции.

Модель, представленная системой нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений, описывает взаимодействия между 12 переменными: две популяции бактерий – BE(t) и BI(t); три популяции макрофагов – MR(t), MA(t) и MI(t); три популяции Т-лимфоцитов – T0(t), T1(t) и T2(t); четыре популяции цитокинов – I γ (t), I4(t), I10(t) и I12(t). Позволяет реализовать широкий спектр сценариев моделирования (прогнозирование) инфекционного процесса, таких как:

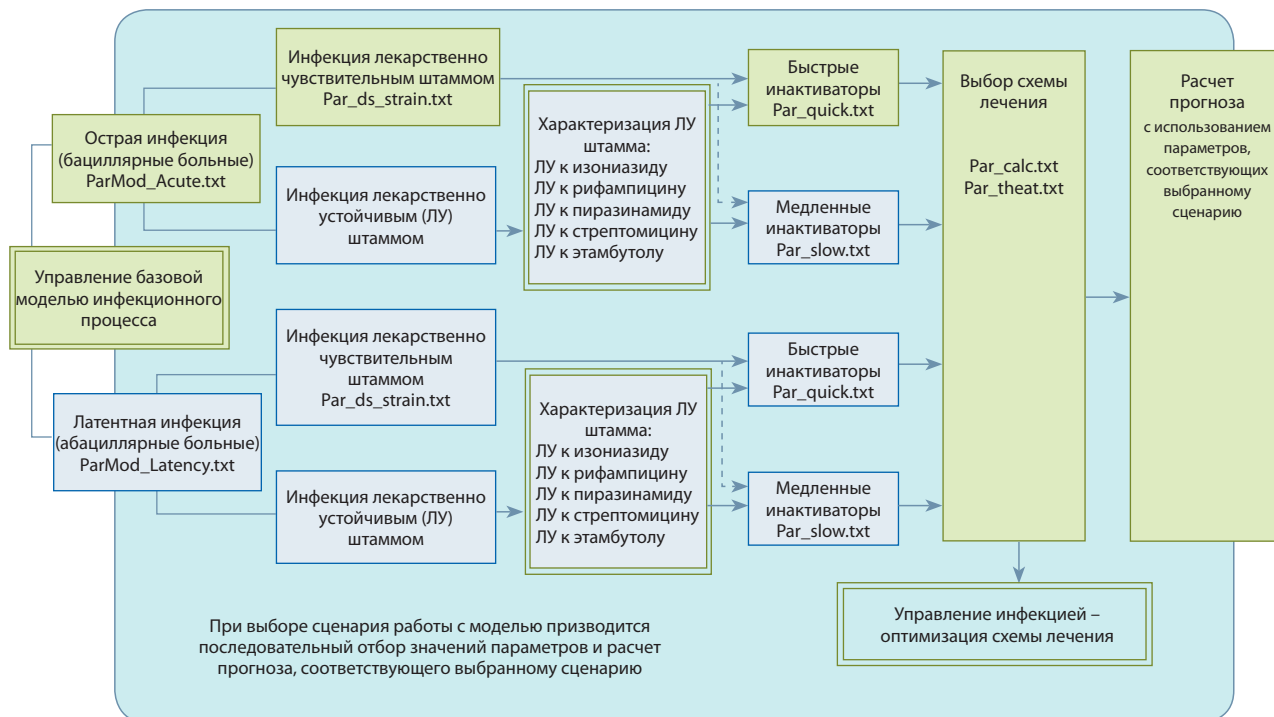


Рис. 1. Блок-схема программной системы «Моделирование инфекции, вызываемой *Mycobacterium tuberculosis*»
Fig. 1. Block diagram of the software system “Modeling of infection caused by *Mycobacterium tuberculosis*”

1. Симуляция различных траекторий заболевания: выяснение ключевых факторов взаимоотношения «хозяин – патоген» при ТБ-инфекции, которые приводят к латентной либо острой инфекции (включая бациллярные и абациллярные).
2. Имитация исходов болезни в зависимости от схемы лечения и состояния иммунной системы.
3. Имитация исходов болезни в зависимости от схемы лечения и механизма действия препаратов.
4. Имитация возникновения лекарственно устойчивых штаммов микобактерий ТБ на фоне неадекватного лечения.
5. Имитация вариантов развития инфекции, которые приводят к тканевым поражениям, вызванным иммунным ответом.
6. Имитация реактивации острой формы ТБ у индивидуумов, которые первоначально супрессировали инфекцию. Имитация развития ТБ-инфекции на фоне иммунодефицитных состояний (мутации или истощение).
7. Имитация развития ТБ при суперинфекции организма генетически измененными штаммами микобактерий ТБ.

На рисунке 2 показаны результаты численных экспериментов при реализации одного из сценариев работы этой системы: моделирование химиотерапии туберкулеза с применением пяти препаратов у индивидуумов, инфицированных лекарственно чувствительным штаммом микобактерий туберкулеза (острая инфекция, быстрые ацетилаторы). Был рассмотрен следующий комплекс препаратов: изониазид – 30 мг/кг день, рифампицин – 10 мг/кг день, пиразинамид –

25 мг/кг день, стрептомицин – 15 мг/кг день, этамбутол – 30 мг/кг день. При этом в период $0 < t < 300$ дней проведено моделирование ТБ-инфекции без лечения, а в период $300 < t < 1000$ дней – моделирование ТБ-инфекции на фоне лечения. Моделирование показывает успешность применяемой противотуберкулезной терапии, характеризующейся элиминацией на 500-е сут всех четырех типов рассматриваемых патогенных микроорганизмов (внеклеточных бактерий, внутриклеточных бактерий, лекарственно устойчивых внеклеточных и внутриклеточных бактерий) (см. рис. 2).

Также выявлена сложная динамика компонентов системы иммунного ответа на фоне выбранной терапии, характеризующаяся быстрыми активацией и падением уровня инфицированных макрофагов, быстрым падением и более медленным снижением уровня активированных макрофагов, а также характерной реакцией покоящихся макрофагов (снижением их уровня на ~23 % через 50 дней после начала комплексной терапии с последующим восстановлением к исходному значению через 600 сут после начала терапии).

Заключение

В современную эпоху, когда науки о жизни стали источником беспрецедентно больших генетических данных (геномных, транскриптомных, протеомных, метаболомных и множества других), единственным способом быстрого и эффективного конструирования компьютерных моделей молекулярно-генетических систем, отвечающих на этот

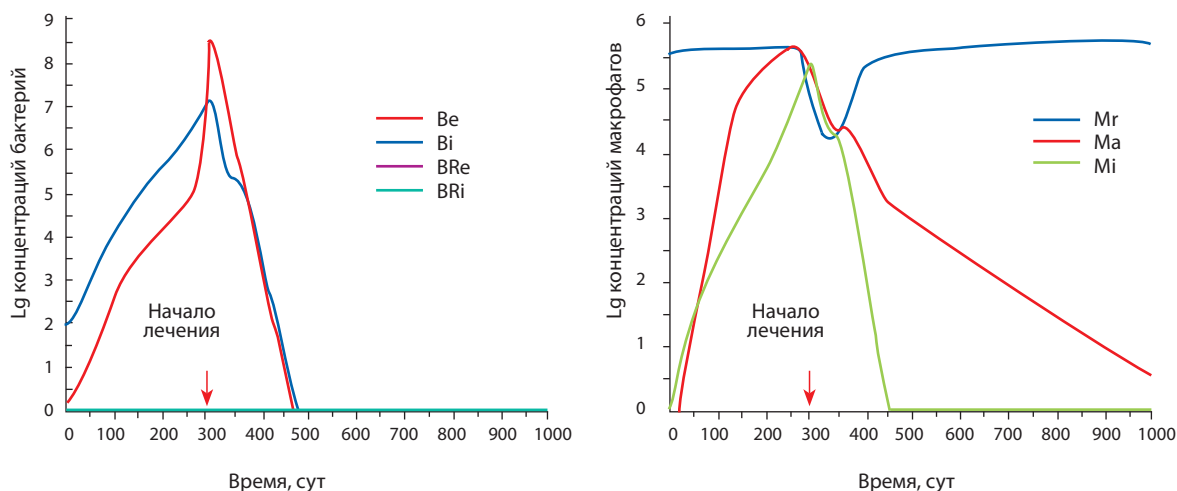


Рис. 2. Имитация адекватного лечения с применением пяти препаратов у индивидуумов, инфицированных лекарственно чувствительным штаммом микобактерий туберкулеза (острая инфекция, быстрые ацетиляторы)

Be – внеклеточные бактерии, Bi – внутриклеточные бактерии, BRe – лекарственно устойчивые внеклеточные бактерии, BRi – лекарственно устойчивые внутриклеточные бактерии, Mr – покоящиеся макрофаги, Ma – активированные макрофаги, Mi – инфицированные макрофаги

Fig. 2. Simulation of adequate five-drug treatment in individuals infected with a drug-sensitive *M. tuberculosis* strain (acute infection, rapid acetylators)

Be – extracellular bacteria, Bi – intracellular bacteria, BRe – drug-resistant extracellular bacteria, BRi – drug-resistant intracellular bacteria, Mr – resting macrophages, Ma – activated macrophages, Mi – infected macrophages

вызов, становится их автоматическая генерация в рамках ОХКММ. При автоматизации конструирования моделей молекулярно-генетических систем необходимо опираться на базовый блочно-модульный принцип их организации, естественно вытекающий из природы молекулярно-генетических систем. Трудно переоценить вклад С.И. Бажана в развитие этой выдающейся информационно-компьютерной технологии.

Список литературы / References

- Акбердин И.Р., Казанцев Ф.В., Омелянчук Н.А., Лихошвай В.А. Математическое моделирование метаболизма ауксина в клетке меристемы побега растения. *Информационный вестник ВОГиС*. 2009;13(1):170-175
[Akberdin I.R., Kazantsev F.V., Omelyanchuk N.A., Likhoshvay V.A. Mathematical modeling of auxin metabolism in plant shoot meristem cells. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists*. 2009;13(1):170-175 (in Russian)]
- Бажан С.И. Математические модели и информационные системы в вирусологии и иммунологии. *Информационный вестник ВОГиС*. 2005;9(2):209-220
[Bazhan S.I. Mathematical models and information systems in virology and immunology. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists*. 2005;9(2):209-220 (in Russian)]
- Казанцев Ф.В., Акбердин И.Р., Безматерных К.Д., Лихошвай В.А. Система автоматизированной генерации математических моделей генных сетей. *Информационный вестник ВОГиС*. 2009;13(1):163-169
[Kazantsev F.V., Akberdin I.R., Bezmaternykh K.D., Likhoshvay V.A. System of automated generation of mathematical models of gene networks. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists*. 2009;13(1):163-169 (in Russian)]
- Казанцев Ф.В., Акбердин И.Р., Подколотный Н.Л., Лихошвай В.А. Новые возможности системы MGSmodeller. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(4/1):799-804

[Kazantsev F.V., Akberdin I.R., Podkolodny N.L., Likhoshvay V.A. New possibilities of MGSmodeller system. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(4/1):799-804 (in Russian)]

Канаян Г.Х., Ратнер В.А., Чураев Р.Н. Расширенная модель онтогенеза фага λ. 3. нормальные режимы онтогенеза при различных кратностях заражения. В: Математические модели молекулярно-генетических систем управления. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1979а;49-75

[Kanayan G.H., Ratner V.A., Churaev R.N. Extended model of ontogenesis of phage λ. 3. normal modes of ontogenesis at different multiples of infection. In: *Mathematical Models of Molecular and Genetic Control Systems*. Novosibirsk: ICG SB AS USSR Publ., 1979a;49-75 (in Russian)]

Канаян Г.Х., Ратнер В.А., Чураев Р.Н. Расширенная модель онтогенеза фага λ. сообщение 4. влияние делеций регуляторных генов на функционирование сульф λ-2. В: Математические модели молекулярно-генетических систем управления. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1979б;76-102

[Kanayan G.H., Ratner V.A., Churaev R.N. Extended model of phage λ ontogenesis. message 4. influence of deletions of regulatory genes on the functioning of surf λ-2. In: *Mathematical Models of Molecular and Genetic Control Systems*. Novosibirsk: ICG SB AS USSR Publ., 1979b;76-102 (in Russian)]

Канаян Г.Х., Ратнер В.А., Чураев Р.Н. Расширенная модель онтогенеза фага λ. 5. моделирование динамики функционирования и воспроизведения субплазмид. В: Математические модели молекулярно-генетических систем управления. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1979в;103-123

[Kanayan G.H., Ratner V.A., Churaev R.N. Extended model of phage λ ontogenesis. 5. Modeling the dynamics of subplasmid functioning and reproduction. In: *Mathematical Models of Molecular and Genetic Control Systems*. Novosibirsk: ICG SB AS USSR Publ., 1979c;103-123 (in Russian)]

Лихошвай В.А. Математическое моделирование и компьютерный анализ генных сетей. Диссертация ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2008;1-364

[Likhoshvay V.A. Mathematical modeling and computer analysis of gene networks. Doctor Sci. (Biol.) Dissertation. Novosibirsk, 2008; 1-364 (in Russian)]

- Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г., Ватолин Ю.Н., Бажан С.И. Обобщенный химико-кинетический метод моделирования сложных биологических систем. Компьютерная модель онтогенеза бактериофага Lambda. *Вычислительные технологии*. 2000;5(Спец. вып.):87-99
[Likhoshvay V.A., Matushkin Y.G., Vatolin Y.N., Bazhan S.I. Generalized chemical-kinetic method of modeling complex biological systems. Computer model of bacteriophage Lambda ontogenesis. *Computational Technologies*. 2000;5 (Special issue dedicated to the 10th anniversary of the Laboratory of Theoretical Genetics, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences):87-99 (in Russian)]
- Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г., Фадеев С.И. Задачи теории функционирования геновых сетей. *Сибирский журнал индустриальной математики*. 2003;6(2(14)):64-80
[Likhoshvay V.A., Matushkin Y.G., Fadeev S.I. Tasks of the Theory of Functioning of Gene Networks. *Sibirskii Zhurnal Industrial'noi Matematiki = Siberian Journal of Industrial Mathematics*. 2003;6(2(14)):64-80 (in Russian)]
- Лихошвай В.А., Омелянчук Н.А., Миронова В.В., Фадеев С.И., Мелнесс Э.Д., Колчанов Н.А. Математическая модель распределения ауксина в корне растения. *Онтогенез*. 2007;38(6):446-456
[Likhoshvay V.A., Omelyanchuk N.A., Mironova V.V., Fadeev S.I., Melsness E.D., Kolchanov N.A. Mathematical model of auxin distribution in the plant root. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2007;38(6):374-382]
- Лихошвай В.А., Омелянчук Н.А., Миронова В.В., Казанцев Ф.В., Акбердин И.Р., Королев В.К., Фадеев С.И., Колчанов Н.А. Моделирование регуляции ауксином инициации латеральных органов у *Arabidopsis thaliana* L. *Информационный вестник ВОГиС*. 2009;13(1):176-185
[Likhoshvay V.A., Omelyanchuk N.A., Mironova V.V., Kazantsev F.V., Akberdin I.R., Korolev V.K., Fadeev S.I., Kolchanov N.A. Modeling of auxin regulation of lateral organ initiation in *Arabidopsis thaliana* L. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists*. 2009;13(1):176-185 (in Russian)]
- Ратнер В.А. Генетические управляющие системы. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1966
[Ratner V.A. Genetic control systems. Novosibirsk: Nauka Publ., Siberian Department, 1966 (in Russian)]
- Ратнер В.А. Блочно-модульный принцип организации и эволюции молекулярно-генетических систем управления (МГСУ). *Генетика*. 1992;28(2):5-13
[Ratner V.A. Block-modular principle of organization and evolution of molecular genetic control systems (MGSU). *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1992;28(2):5-13 (in Russian)]
- Ратнер В.А. Молекулярно-генетическая система управления. *Природа*. 2001;3:16-22
[Ratner V.A. Molecular-genetic control system. *Priroda = Nature*. 2001;3:16-22. (in Russian)]
- Ратушный А.В., Лихошвай В.А., Игнатъева Е.В., Матушкин Ю.Г., Горянин И.И., Колчанов Н.А. Компьютерная модель геновой сети регуляции биосинтеза холестерина в клетке: анализ влияния мутаций. *Докл. акад. наук*. 2003;389(2):259
[Ratushny A.V., Likhoshvay V.A., Ignatieva E.V., Matushkin Y.G., Goryanin I.I., Kolchanov N.A. Computer model of gene network regulation of cholesterol biosynthesis in the cell: analysis of the influence of mutations. *Dokl. Akad. Nauk*. 2003;389(2):259 (in Russian)]
- Ратушный А.В., Лихошвай В.А., Игнатъева Е.В., Матушкин Ю.Г., Горянин И.И., Фадеев С.И., Лихошвай В.А., Когай В.В., Омелянчук Н.А. О математическом моделировании паттерна распределения ауксина в корне растений. *Сибирский журнал индустриальной математики*. 2008;48(5):25-41
[Fadeev S.I., Likhoshvay V.A., Kogay V.V., Omelyanchuk N.A. On Mathematical Modeling of Auxin Distribution Pattern in the Root of Plants. *Sibirskii Zhurnal Industrial'noi Matematiki = Siberian Journal of Industrial Mathematics*. 2008;48(5):25-41 (in Russian)]
- Хлебодарова Т.М., Когай В.В., Акбердин И.Р., Ри Н.А., Фадеев С.И., Лихошвай В.А. Моделирование утилизации нитрита клетками *Escherichia coli*: анализ потоков. *Математическая биология и биоинформатика*. 2013;8(1):276-294
[Khlebodarova T.M., Kogay V.V., Akberdin I.R., Ri N.A., Fadeev S.I., Likhoshvay V.A. Modeling of nitrite utilization by *Escherichia coli* cells: flux analysis. *Matematicheskaya Biologiya i Bioinformatika = Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2013;8(1):276-294. (in Russian)]
- Чураев Р.Н. Гипотеза об эпигенезе. В: Исследования по математической генетике. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1975;77-94
[Churayev R.N. Hypothesis about epigenesis. In: Studies on Mathematical Genetics. Novosibirsk: ICG SB AS USSR Publ., 1975;77-94 (in Russian)]
- Чураев Р.Н., Ратнер В.А. Моделирование молекулярно-генетических систем управления на языке теории автоматов. Сообщение 1. Опероны и оперонные системы. В: Исследования по теоретической генетике. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1972a;210-227
[Churayev R.N., Ratner V.A. Modeling of molecular genetic control systems in the language of automata theory. Message 1. Operons and operon systems. In: Studies on Theoretical Genetics. Novosibirsk: ICG SB AS USSR Publ., 1972a;210-227 (in Russian)]
- Чураев Р.Н., Ратнер В.А. Моделирование молекулярно-генетических систем управления на языке теории автоматов. Сообщение 2. Ферменты и полиферментные системы. В: Исследования по теоретической генетике. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1972b;228-239
[Churayev R.N., Ratner V.A. Modeling of molecular genetic control systems in the language of automata theory. Message 2. Enzymes and polyenzyme systems. In: Researches on Theoretical Genetics. Novosibirsk: ICG SB AS USSR Publ., 1972b;228-239 (in Russian)]
- Чураев Р.Н., Ратнер В.А. Моделирование динамики системы управления развитием λ -фага. В: Исследования по математической генетике. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1975;5-66
[Churayev R.N., Ratner V.A. Modeling of the dynamics of the λ -phage development control system. In: Studies on Mathematical Genetics. Novosibirsk: ICG SB AS USSR Publ., 1975;5-66 (in Russian)]
- Bazhan S.I., Belova O.E. Interferon-induced antiviral resistance. A mathematical model of regulation of Mx1 protein induction and action. *J. Theor. Biol.* 1999;198(3):375-393. DOI 10.1006/jtbi.1999.0921
- Bazhan S.I., Likhoshvai V.A., Belova O.E. Theoretical analysis of the regulation of interferon expression during priming and blocking. *J. Theor. Biol.* 1995;175(2):149-160. DOI 10.1006/jtbi.1995.0127
- Bazhan S.I., Antonets D.V., Karpenko L.I., Oreshkova S.F., Kaplina O.N., Starostina E.V., Dudko S.G., Fedotova S.A., Ilyichev A.A. *In silico* designed Ebola virus T-cell multi-epitope DNA vaccine constructions are immunogenic in mice. *Vaccines*. 2019;7(2):34. DOI 10.3390/vaccines7020034
- Blinov M.L., Faeder J.R., Goldstein B., Hlavacek W.S. BioNetGen: Software for rule-based modeling of signal transduction based on the interactions of molecular domains. *Bioinformatics*. 2004;20(17):3289-3291. DOI 10.1093/bioinformatics/bth378
- Cooling M.T., Hunter P., Crampin E.J. Modelling biological modularity with CellML. *IET Syst. Biol.* 2008;2(2):73-79. DOI 10.1049/iet-syb:20070020
- Galdzicki M., Clancy K.P., Oberortner E., Pocock M., Quinn J.Y., Rodriguez C.A., Roehner N., Wilson M.L., Adam L., Anderson J.C., Bartley B.A., Beal J., Chandran D., Chen J., Densmore D., Endy D., Grünberg R., Hallinan J., Hillson N.J., Johnson J.D., Kuchinsky A., Lux M., Misirli G., Peccoud J., Plahar H.A., Sirin E., Stan G.-B., Villalobos A., Wipat A., Gennari J.H., Myers C.J., Sauro H.M. The Synthetic Biology Open Language (SBOL) provides a community standard for communicating designs in synthetic biology. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(6):545-550. DOI 10.1038/nbt.2891
- Hong J.H., Savina M., Du J., Devendran A., Kannivadi Ramakanth K., Tian X., Sim W.S., Mironova V.V., Xu J. A Sacrifice-for-Survival mechanism protects root stem cell niche from chilling stress. *Cell*. 2017;170(1):102-113.e14. DOI 10.1016/j.cell.2017.06.002
- Khlebodarova T.M., Lashin S.A., Apasieva N.V. Gene network reconstruction and mathematical modeling of E. Coli respiration: regulation of F0F1-ATP synthase by metal ions. In: International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. 2006;55-59
- Likhoshvai V.A., Ratushnyi A.V. Generalized Hill function method for modeling molecular processes. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2007;05(02b):521-531. DOI 10.1142/S0219720007002837

- Likhoshvai V.A., Matushkin Y.G., Ratushny A.V., Ananko E.A., Ignatieva E.V., Podkolodnaya O.A. Generalized chemokinetic method for gene network simulation. *Mol. Biol.* 2001;35(6):919-925. DOI 10.1023/A:1013254822486
- Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M., Ree M.T., Kolchanov N.A. Metabolic engineering in silico. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010;46(7):671-687. DOI 10.1134/S0003683810070021
- Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M., Bazhan S.I., Gainova I.A., Chereshev V.A., Bocharov G.A. Mathematical model of the Tat-Rev regulation of HIV-1 replication in an activated cell predicts the existence of oscillatory dynamics in the synthesis of viral components. *BMC Genomics.* 2014;15(S12):S1. DOI 10.1186/1471-2164-15-S12-S1
- Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Yosiphon G., Fadeev S.I., Kolchanov N.A., Mjolsness E., Likhoshvai V.A. A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root. *BMC Syst. Biol.* 2010;4(3):98. DOI 10.1186/1752-0509-4-98
- Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Novoselova E.S., Doroshkov A.V., Kazantsev F.V., Kochetov A.V., Kolchanov N.A., Mjolsness E., Likhoshvai V.A. Combined *in silico/in vivo* analysis of mechanisms providing for root apical meristem self-organization and maintenance. *Ann. Bot.* 2012;110(2):349-360. DOI 10.1093/aob/mcs069
- Nizolenko L.P., Bachinsky A.G., Bazhan S.I. Evaluation of influenza vaccination efficacy: a universal epidemic model. *Biomed Res. Int.* 2016;2016:5952890. DOI 10.1155/2016/5952890
- Novoselova E.S., Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Kazantsev F.V., Likhoshvai V.A. Mathematical modeling of auxin transport in protoxylem and protophloem of arabidopsis thaliana root tips. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2013;11(1):1340010. DOI 10.1142/S0219720013400106
- Novoselova E.S., Mironova V.V., Khlebodarova T.M., Likhoshvai V.A. On the distribution of auxin concentrations in root horizontal layer cells. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2015;5(3):293-299. DOI 10.1134/S2079059715030120
- Oshchepkova-Nedosekina E.A., Likhoshvai V.A. A mathematical model for the adenylosuccinate synthetase reaction involved in purine biosynthesis. *Theor. Biol. Med. Model.* 2007;4(1):11. DOI 10.1186/1742-4682-4-11
- Pasternak T., Groot E.P., Kazantsev F.V., Teale W., Omelyanchuk N.A., Kovrizhnykh V.V., Palme K., Mironova V.V. Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner. *Plant Physiol.* 2019;180(3):1725-1739. DOI 10.1104/pp.19.00130
- Ratushny A.V., Khlebodarova T.M. Mathematical modeling of regulation of cyoabcde operon expression in escherichia Coli. In: International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. 2006;49-54
- Shapiro B.E., Levchenko A., Meyerowitz E.M., Wold B.J., Mjolsness E.D. Cellerator: extending a computer algebra system to include biochemical arrows for signal transduction simulations. *Bioinformatics.* 2003;19(5):677-678. DOI 10.1093/bioinformatics/btg042
- Shapiro B.E., Meyerowitz E.M., Mjolsness E. Using cellzilla for plant growth simulations at the cellular level. *Front. Plant Sci.* 2013;4:408. DOI 10.3389/fpls.2013.00408

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.07.2023. После доработки 04.10.2023. Принята к публикации 10.10.2023.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-22

Обзор

Дизайн искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов для создания профилактических и терапевтических вакцин

Л.И. Карпенко  , А.А. Ильичев 

Аннотация: Сергей Иванович Бажан начал работать в «Векторе» в 1975 г. по личному приглашению академика Л.С. Сандакчиева и стал одним из основоположников новых научных направлений организации. Все без исключения, кому посчастливилось учиться у него, работать с ним и даже просто встречаться на научных форумах, признавали, каким неординарным и разносторонним человеком был Сергей Иванович. Талантливый ученый, автор более 300 статей, 20 патентов и ряда научных монографий, изданных в России и за рубежом. Его научные интересы простирались от разработки математических моделей для систем «вирус – хозяин» до исследования механизмов действия интерферона и противовирусного иммунитета. С.И. Бажан был одним из первых ученых в мире, начавшим работы по дизайну искусственных поли-CTL-эпитопных Т-клеточных иммуногенов для создания профилактических вакцин против вирусных инфекций и терапевтических – против онкологических заболеваний. В данной статье мы хотим рассказать об этих исследованиях Сергея Ивановича, над которыми нам посчастливилось трудиться вместе с ним.

Ключевые слова: Сергей Иванович Бажан; вакцины против вирусных инфекций; ВИЧ-вакцина; вирус Эбола; вирус Марбург; грипп; меланома; рак молочной железы; COVID-19.

Для цитирования: Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Дизайн искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов для создания профилактических и терапевтических вакцин. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):192-200. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-22

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Review


Design of artificial polyepitope T-cell immunogens for the creation of prophylactic and therapeutic vaccines


L.I. Karpenko  , A.A. Ilyichev 

Abstract: Sergey I. Bazhan started to work at “Vector” in 1975 at the personal invitation of Academician L.S. Sandakhchiev and became one of the founders of new scientific directions of the organization. Without exception, everyone, who was lucky enough to study with him, work with him, and even just meet him at scientific forums, said that Sergey Ivanovich was an extraordinary and versatile person. He was a talented scientist, author of more than 300 articles, 20 patents and a number of scientific monographs published in Russia and abroad. His scientific interests ranged from the development of mathematical models for “virus-host” systems to the study of the mechanisms of action of interferon and the mechanisms of antiviral immunity. S.I. Bazhan was one of the first scientists in the world who realized the design a series of artificial poly-CTL-epitope T-cell immunogens to create preventive vaccines against viral infections and therapeutic vaccines for the treatment of cancer. We would like to describe in this article these studies of Sergey Ivanovich, in which we were lucky enough to work with him. He was one of the first scientists in the world who realized the design a series of artificial poly-CTL-epitope T-cell immunogens to create preventive vaccines against viral infections and therapeutic vaccines for the treatment of cancer. This article is about the studies in which we were lucky enough to work together with Sergey Ivanovich.

Key words: Sergey Bazhan; vaccines against viral infections; HIV vaccine; Ebola virus; Marburg virus; flu; melanoma; mammary cancer; COVID-19.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия
State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

 lkarpenko1@ya.ru

 Карпенко Л.И., Ильичев А.А., 2023

For citation: Karpenko L.I., Ilyichev A.A. Design of artificial polyepitope T-cell immunogens for the creation of prophylactic and therapeutic vaccines. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(4):192-200. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-22 (in Russian)

Acknowledgements: The work was carried out as a part of the state assignment of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor.

*Памяти Сергея Ивановича Бажана,
заведующего теоретическим отделом
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»*

Введение

Сергей Иванович Бажан – известный молекулярный биолог, доктор биологических наук, заведующий теоретическим отделом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» – ушел из жизни 16 апреля 2022 г. Сергей Иванович был талантливым ученым и замечательным человеком, его человеческое тепло, обаяние, умение радоваться чужим успехам притягивали людей, и, конечно, он оставил глубокий след в сердцах тех, с кем общался. Нас восхищали его широкая эрудиция, интеллигентность, способность увлекать своими идеями, умение решать сложные задачи и работать в команде единомышленников. Сфера научных интересов Сергея Ивановича была весьма обширна. Он занимался разработкой математических моделей для систем «вирус – хозяин», исследованием механизмов действия интерферона и противовирусного иммунитета (Chuikov et al., 1991; Bazhan et al., 1995; Belova et al., 1995; Бажан и др., 2009; и др.).

Данная статья посвящена исследованиям Сергея Ивановича, над которыми нам посчастливилось трудиться вместе с ним. Эти работы связаны с дизайном искусственных поли-CTL-эпитопных иммуногенов, необходимых для создания профилактических вакцин против вирусов и терапевтических – против онкологических заболеваний. Он был одним из первых ученых в мире, начавшим исследования в данном направлении.

Многие современные вакцины направлены на индукцию в основном В-клеточного ответа, т. е. антител. Сергей Иванович, не отрицая важности гуморального ответа, считал, что для полноценной защиты от вирусной инфекции необходим Т-клеточный ответ и совершенно иной, отличный от В-клеточного принцип конструирования вакцины. Сложность конструирования Т-клеточных вакцин состоит в том, что в человеческой популяции существует большой полиморфизм молекул МНС, которые презентуют Т-клеточные эпитопы. Ни одна другая генетическая система организма не имеет такого количества аллельных форм, как гены МНС. И этот факт приходится учитывать при дизайне Т-клеточного иммуногена.

Дизайн полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов

Сергей Иванович Бажан начинал работы по дизайну и получению искусственных Т-клеточных иммуногенов еще в конце 1990-х гг. Он спроектировал искусственный белок, который назвали TCI (T-cell immunogen). TCI включает в себя Т-клеточные эпитопы из основных белков ВИЧ-1, а также учитывает основные HLA, или МНС человека (Bazhan et al.,

2004). При его конструировании были выбраны Т-клеточные эпитопы, высоко консервативные среди трех основных субтипов ВИЧ-1 (А, В и С). Белок TCI включает в себя более 80 Т-клеточных эпитопов (как CD8⁺ CTL, так и CD4⁺ Th) из белков Env, Gag, Pol и Nef (Bazhan et al., 2004). Учитывались CTL-эпитопы, которые в совокупности рестриктируются десятью различными оптимально подобранными аллелями МНС I класса. Как известно, этого достаточно, чтобы покрыть генетическое разнообразие антигенов МНС I класса в человеческой популяции практически любого географического региона. Поскольку процессинг и презентация антигена молекулами МНС I класса наиболее эффективно осуществляются для белков, синтезируемых внутри клетки, целевая вакцинная конструкция была сконструирована в форме ДНК-вакцины путем клонирования гена, кодирующего белок TCI в составе векторной плазмиды pсDNA3.1 (Bazhan et al., 2004).

В конце 1990-х гг. синтез протяженных генов еще не был развит в достаточной мере, и для воплощения своей идеи Сергей Иванович собрал команду высококлассных генных инженеров (С.В. Серегин, П.А. Белавин и Н.К. Данилюк). Полученную ДНК-вакцину pсDNA-TCI использовали для генетической иммунизации животных. Было показано, что она способна индуцировать как специфические Т-клеточные ответы, так и специфические антитела у иммунизированных мышей линии BALB/c (Bazhan et al., 2004; Karpenko et al., 2004; Karpenko et al., 2012).

«КомбиВИЧвак» – комбинированная вакцина, объединяющая два иммуногена в одной конструкции: ДНК-вакцину и рекомбинантный белок

Задача разработки вакцины против ВИЧ-1 в России была поставлена в рамках распоряжения Правительства РФ в 2008 г.

Сергей Иванович, ключевой идеолог комбинированной вакцины, которую назвали «КомбиВИЧвак», считал, что эффективная профилактическая вакцина против ВИЧ-инфекции должна индуцировать специфический гуморальный и Т-клеточный иммунный ответы, поэтому в состав «КомбиВИЧвак» вошли два иммуногена – белок ТВ1 и ДНК-вакцина pсDNA-TCI. Искусственный рекомбинантный белок ТВ1 спроектирован для индукции В-клеточного ответа А.М. Ерошкиным в теоретическом отделе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», руководителем которого был С.И. Бажан (Eroshkin et al., 1995). Работа над вакциной «КомбиВИЧвак» примечательна тем, что это была первая в России ДНК-вакцина, которая получила разрешение Минздрава и прошла испытания на лю-

дах-добровольцах. Конечно, этому предшествовала долгая работа по доклиническим испытаниям ДНК-вакцины и доказательству ее безвредности.

Вакцина «КомбиВИЧвак» создана в виде мицеллоподобных наночастиц на основе оригинальной технологии, предложенной Л.Р. Лебедевым (2003). Оболочка вакцины состоит из конъюгата декстран-спермидин-ТВИ. Входящий в состав вакцины спермидин предоставляет конъюгату положительный заряд и, связываясь с ДНК-вакциной, обеспечивает самосборку наночастиц, размер которых (40–100 нм) близок к размерам вириона ВИЧ-1 (Karpenko et al., 2017). Преимущество данной технологии состоит в том, что в составе одной частицы осуществляется доставка одновременно двух компонентов вакцины, один из которых белок, а другой – ДНК, так же как это происходит в случае аттенуированных вирусных вакцин. При этом белок ТВИ представлен во множестве копий на поверхности частицы, что позволяет значительно повысить его иммуногенность. Кроме того, оболочка из полимера глюкозы защищает ДНК-вакцину рсDNA-ТЦИ от действия нуклеаз, что также способствует повышению ее иммуногенности за счет увеличения времени жизни ДНК-компонента.

Доклинические и клинические исследования

Для проведения доклинических и клинических исследований «КомбиВИЧвак» были разработаны экспериментальные серии вакцины стандартного качества согласно рекомендациям ВОЗ. В рамках доклинического исследования изучена острая и хроническая токсичность на мышах и морских свинках, которые показали отсутствие отклонений в состоянии жизненно важных органов животных, отсутствие изменений гематологических и морфологических показателей, отсутствие иммунотоксичности и аллергизирующей активности как при однократном, так и десятикратном введении вакцины. Оценку специфической активности проводили по показателям гуморального и клеточного иммунитета у мышей линии BALB/c при двукратной иммунизации. Показано, что вакцина «КомбиВИЧвак» индуцирует формирование ВИЧ-специфических антител и клеточный ответ (Karpenko et al., 2004; Karpenko et al., 2007a, b).

Первая фаза клинических испытаний для исследования реактогенности, безопасности и иммунологической активности вакцины «КомбиВИЧвак» проведена на здоровых добровольцах. Результаты клинических испытаний (Karpenko et al., 2016) указывали на то, что вакцина хорошо переносима и безопасна (не вызывает существенных изменений биохимических и физиологических показателей в сравнении с фоновыми значениями), обладает низкой реактогенностью (местные реакции на введение вакцины отсутствовали) и, главное, вызывает развитие специфического гуморального и клеточного иммунитета. Результаты исследования Т-клеточного ответа методом IFN- γ ELISpot у двукратно вакцинированных добровольцев показали, что ВИЧ-специфический ответ Т-лимфоцитов регистрируется у всех участников испытания (100 %) с 14-го дня после первой вакцинации и остается достаточно высоким в течение шести месяцев после второй вакцинации. С использованием МНС-пентамеров в комплексе с пептидом ВИЧ-1 Epv

(KLTPLCVTL aa 120–128) у всех добровольцев (100 %) отмечено наличие KLTPLCVTL+CD8⁺ Т-лимфоцитов до шести месяцев после второй вакцинации (Karpenko et al., 2016).

Рациональный дизайн полиэпиптопных Т-клеточных антигенов

Прогресс в идентификации Т-клеточных эпитопов, а также понимание механизмов процессинга и презентации антигенов по пути МНС I и II класса дали возможность перейти к рациональному дизайну искусственных полиэпиптопных вакцин, вызывающих широко специфичные ответы антител и CTL (Bazhan et al., 2010; Karpenko et al., 2014).

Известно, что CTL распознают раковые или вирусные белки-антигены, синтезируемые внутри клетки, не как полноразмерные молекулы, а как короткие пептиды (8–12 а.о.), ассоциированные с молекулами МНС I класса. Эти короткие антигенные эпитопы появляются из эндогенно синтезируемых белков в результате протеасом-опосредуемого процессинга, после чего переносятся в просвет эндоплазматического ретикулума (ER) с помощью транспортных белков TAP (transporter associated with antigen processing), где связываются с образующимися молекулами МНС I класса (Yewdell, 2011).

В отличие от стимуляции CTL, для стимуляции ответа CD4⁺ Т-лимфоцитов-хелперов антиген должен быть представлен этим клеткам в комплексе с молекулами МНС II класса. Зачастую процессинг и презентация антигена происходят для внеклеточных антигенов, которые доставляются в клетки с помощью эндо- и фагоцитоза. В этом случае процессинг антигена происходит в лизосоме.

Таким образом, при проектировании полиэпиптопных Т-клеточных иммуногенов, способных индуцировать высокие уровни ответов CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов на все включенные в их состав эпитопы, было необходимо обеспечить эффективный протеасом- и/или лизосом-опосредованный процессинг продукта экспрессии целевого гена по пути МНС I и II класса. Для достижения этой цели Сергей Иванович предложил несколько стратегий (Karpenko et al., 2018):

1. Для конструирования поли-CTL-эпиптопной конструкции использовать спейсерные последовательности, разделяющие эпитопы, которые содержат сайты протеасомного расщепления и/или мотивы для связывания с TAP, чтобы обеспечить процессинг полиэпиптопа и транспорт освобожденных пептидов (эпитопов) в эндоплазматический ретикулум.

2. Для индукции ответа Т-лимфоцитов-хелперов фрагменты, содержащие Т-хелперные эпитопы, объединять с использованием мотива [KR][KR], являющегося сайтом расщепления для ряда лизосомных катепсинов, участвующих в процессинге антигенов.

3. Для нацеливания полиэпиптопного иммуногена в протеасому и презентации CTL-эпитопов CD8⁺ Т-лимфоцитам по пути МНС I класса использовать генетическое присоединение к его N- или C-концу последовательности убиквитина.

4. Для деградации полиэпиптопного иммуногена и презентации освобожденных Th-эпитопов CD4⁺ Т-лимфоцитам по пути МНС II класса применять генетическое присоединение к его C-концу последовательности тирозинового моти-

ва белка LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein 1), чтобы направить полиэпитопный иммуноген из секреторного пути в лизосому.

Чтобы оценить, какие из этих стратегий обеспечивают рациональный подход к конструированию Т-клеточных антигенов, был спроектирован набор полиэпитопных конструкций, покрывающих разнообразие возможных структурных вариантов белка иммуногена. Для оценки влияния убиквитина и спейсерных последовательностей, фланкирующих эпитопы, на иммуногенность полиэпитопной конструкции Сергей Иванович спроектировал набор полиэпитопных иммуногенов, учитывающих различные стратегии процессинга и презентации целевых антигенов. Все конструкции содержали одинаковый набор из десяти HLA-A2-рестриктированных CTL-эпитопов из основных антигенов ВИЧ-1 – Env, Gag, Pol, Nef и Vpr, но отличались по ряду структурных характеристик. Гены, кодирующие спроектированные антигены, были клонированы в составе плазмидного вектора и в геном вируса осповакцины.

Иммуногенность спроектированных конструкций оценивали после трехкратной иммунизации в режиме «прайм-буст» трансгенных мышей HLA-A2 полученными рекомбинантными плазмидами и вирусом осповакцины. Показано, что вакцинная конструкция, которая индуцировала наибольшее количество комплексов [пептид/МНС I класса] *in vitro*, была также наиболее иммуногенной при введении животным. Эта конструкция содержала N-концевой убиквитин для нацеливания полиэпитопа на протеасому. Составляющие ее эпитопы были разделены спейсерными последовательностями, содержащими сайты протеасомного расщепления полиэпитопа и мотивы для TAP-зависимого транспорта освободившихся пептидов в эндоплазматический ретикулум, где происходит их связывание с молекулами МНС I класса (Bazhan et al., 2010). Полученные результаты стали основой для разработки оригинального программного обеспечения Tpredict и PolyCTLDesigner для предсказания Т-клеточных эпитопов и конструирования полиэпитопных иммуногенов. Эти программы разработаны Д.В. Антонцом, у которого Сергей Иванович был научным руководителем (Антонец, Максютков, 2010; Antonets, Bazhan, 2013).

PolyCTLDesigner позволяет выбрать минимальный набор эпитопов с известной или предсказанной специфичностью к разным аллельным вариантам молекул МНС I класса, охватывающий выбранный репертуар аллелей HLA с заданным уровнем избыточности. Затем для выбранного набора известных или предсказанных эпитопов PolyCTLDesigner проводит предсказание аффинности связывания с TAP с помощью модели, разработанной В. Peters и коллегами (2003). На следующем шаге PolyCTLDesigner проводит анализ всех возможных паросочетаний выбранных пептидов и для каждой пары определяет оптимальную спейсерную последовательность, обеспечивающую адекватное расщепление эпитопов с высвобождением C-конца проксимального пептида. Для предсказания протеасомного и/или иммунопротеасомного расщепления PolyCTLDesigner использует модели, разработанные R.E. Toes и коллегами (2001). Кроме того, PolyCTLDesigner позволяет конструи-

ровать последовательность полиэпитопного фрагмента, содержащего Т-хелперные эпитопы, которые затем объединяются с использованием мотива [KR][KR], являющегося сайтом расщепления для ряда лизосомных катепсинов, участвующих в процессинге антигенов. Более детально информация о программе PolyCTLDesigner представлена на сайте <http://tepredict.sourceforge.net/PolyCTLDesigner.html>.

Разработанное программное обеспечение использовано для проектирования новых полиэпитопных конструкций – кандидатов ДНК-вакцин против ВИЧ-1. В частности, чтобы оценить влияние протеасом- и лизосом-зависимой деградации полиэпитопов на иммуногенность целевой полиэпитопной конструкции, разработан дизайн трех полиэпитопных ВИЧ-1-иммуногенов – TCI-N1, TCI-N2 и TCI-N3 – с использованием цитотоксических и хелперных Т-клеточных эпитопов ВИЧ-1. Работа проведена и опубликована А. Регузовой (Reguzova et al., 2015). Полученные результаты подтвердили концепцию рационального дизайна вакцин, основанную на имеющихся знаниях о механизмах презентации Т-клеточных антигенов по пути МНС I и II класса.

ДНК-вакцины против филловирюсов

Заболевания, вызванные вирусами Эбола и Марбург (семейство Filoviridae), относят к особо опасным инфекциям. Геморрагические лихорадки Эбола и Марбург являются редкими, но крайне опасными заболеваниями вследствие высокой контагиозности, тяжести протекания болезни и высокой вероятности летального исхода без экстренной терапии (до 90 %).

Основные проблемы, с которыми столкнулись врачи при борьбе с лихорадкой Эбола и Марбург, заключались в отсутствии вакцины и профилактических препаратов против этих заболеваний. Дорогостоящая разработка вакцин и лечебных препаратов против редкого, хотя и смертельно опасного заболевания в каждом конкретном случае представлялась нерентабельной и вызывала интерес только в связи с потенциальной угрозой биотерроризма. Вспышка лихорадки Эбола в 2014–2015 гг. унесла более 11 тыс. жизней, что заставило проводить исследования по противодействию этой инфекции и включиться в разработку вакцин ученых многих стран.

Сергей Иванович осуществил дизайн полиэпитопных иммуногенов против вирусов Марбург (Антонец, Бажан, 2017) и Эбола (Bazhan et al., 2019), на последнем остановимся подробнее.

Для получения ДНК-вакцин против вируса Эбола Сергей Иванович провел дизайн двух полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов – EV.CTL и EV.Th (Bazhan et al., 2019). Оба иммуногена были спроектированы с применением консервативных эпитопов белков вируса Эбола GP, VP24, VP30, VP35, VP40, NP, L. Для конструирования целевых иммуногенов из базы данных Immune Epitope Database (<http://iedb.org>) (Vita et al., 2015) были выбраны эпитопы, для которых доказана способность связываться с различными алломорфами МНС I и II класса. При этом для проектирования антигена EV.CTL использованы CD8⁺ CTL-эпитопы, а для проектирования антигена EV.Th – фрагменты, содержащие CD4⁺ Th-эпитопы. Показано, что разработанные конструкции ДНК-вакцин обе-

спечивают синтез соответствующих мРНК и белков в культуре эукариотических клеток, а также вызывают статистически значимый ответ как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов у иммунизированных животных и, следовательно, являются перспективными кандидатами для дальнейшего исследования их способности вызывать цитотоксические и защитные реакции. Более подробно результаты описаны в статьях (Bazhan et al., 2019; Karpenko et al., 2020).

Вакцины против вируса гриппа

Изменчивость вируса гриппа представляет собой серьезную проблему, позволяя ему уклоняться от специфического иммунитета человека, сформированного в результате предшествующей инфекции или вакцинации. Следовательно, необходимо менять состав вакцины против гриппа каждые два-три года. Многочисленные исследовательские группы пытаются разработать универсальные вакцины против гриппа для решения этой проблемы (Pica, Palese, 2013; de Vries et al., 2015; Krammer, Palese, 2015).

При защите от инфекций, вызванных высоко вариабельными вирусами, включая вирус гриппа, Т-клеточный иммунный ответ чрезвычайно важен, поскольку он может значительно подавлять репродукцию вируса гриппа, снижать тяжесть заболевания и смертность (Bodewes et al., 2011; Koutsakos et al., 2019).

В работе, проведенной под руководством Сергея Иванова, использован уже упомянутый оригинальный компьютерный подход для конструирования полиэпиптопных Т-клеточных антигенов вируса гриппа (Antonets, Bazhan, 2013). С целью получения универсальной вакцинной конструкции были спроектированы искусственные молекулы-антигены, в состав которых входили наиболее консервативные Т-клеточные эпитопы антигенов вирусов гриппа, которые, как ожидалось, будут вызывать иммунный ответ против различных штаммов и подтипов вируса гриппа – как против эпидемических сезонных, так и потенциально пандемических. Эти антигены включают консервативные Т-клеточные эпитопы различных белков вируса гриппа А. Для дизайна антигенов использовали информацию об известных (экспериментально подтвержденных) Т-клеточных эпитопах вируса гриппа из базы данных (<http://www.iedb.org>). Иммуногенные и протективные свойства ДНК-конструкций, кодирующих целевые Т-клеточные иммуногены, изучали на мышах BALB/c. Показано, что в группах, иммунизированных комбинацией сгенерированных на компьютере «мышиных» ДНК-иммуногенов, 37,5 % мышей выжили после последующего летального контакта с вирусом A/California/4/2009 (H1N1) или A/Aichi/2/68 (H3N2), тогда как иммунизация живыми вакцинными штаммами гриппа H1N1 и H3N2 обеспечила защиту от гомологичных вирусов и не защитила от гетерологичных вирусов. Данное исследование демонстрирует, что алгоритм, предложенный Сергеем Ивановичем, подходит для рационального конструирования искусственных полиэпиптопных антигенов, способных вызывать вирусоспецифические ответы Т-лимфоцитов и обеспечивать частичную защиту от двух различных подтипов вируса гриппа (Bazhan et al., 2022).

Вакцины против онкологических заболеваний

Большой блок работ Сергея Ивановича связан с разработкой вакцин против онкологических заболеваний. Он осуществил дизайн полиэпиптопных Т-клеточных иммуногенов, на основе которых были созданы кандидатные ДНК-вакцины против меланомы и рака молочной железы. Результаты этих работ опубликованы в статьях, и получены патенты (Антонец и др., 2014, 2018; Назаркина и др., 2015; Старостина и др., 2017; Vorobova et al., 2018; Боробова и др., 2019).

Предложение Сергея Ивановича по разработке вакцин против меланомы было поддержано грантом Минобрнауки РФ, поэтому удалось не только получить конструкции, но и провести их доклинические испытания. Про эту работу хотелось бы рассказать немного подробнее.

Меланома – одна из наиболее опасных злокачественных опухолей, часто рецидивирующая и метастазирующая лимфогенным и гематогенным путем почти во все органы. Возможность создания эффективной терапевтической вакцины против меланомы обусловлена тем, что клетки меланомы, презентующие на своей поверхности специфический набор антигенов, являются высоко иммуногенными. Кроме того, о такой возможности свидетельствует и то, что в некоторых случаях наблюдается полная ремиссия злокачественной меланомы, ассоциированная со спонтанной индукцией как гуморального, так и Т-клеточного иммунного ответа (Halama et al., 2010).

Разрабатывая теоретический дизайн вакцины против меланомы, Сергей Иванович взял шесть основных опухоль-ассоциированных антигенов (MART1, MAGE-A, MAGE-A, MAGE-A11, MAGE-C1), из которых были выбраны Т-клеточные эпитопы, обладающие наибольшей аффинностью связывания с молекулами HLA I и II класса. На их основе он спроектировал два искусственных полиэпиптопных иммуногена MEL-TCI и MEL-A0201, содержащих множественные цитотоксические и хелперные эпитопы опухолевых антигенов меланомы. Первый «универсальный» иммуноген назван MEL-TCI, он содержит эпитопы, рестриктированные множественными аллельными вариантами молекул HLA I класса. Второй иммуноген назван MEL-A0201 («аллель-специфический»), он содержит эпитопы, рестриктированные только одним алломорфом HLA-A*02:01. Гены, кодирующие спроектированные белки, были синтезированы, клонированы в составе плазмидного эукариотического вектора, и получены ДНК-вакцины pMEL-A0201 и pMEL-TCI (Vorobova et al., 2018).

На модели лабораторных животных проверить работоспособность конструкций было невозможно, поскольку спроектированы они для человека. Появилась необходимость в разработке модели иммунной системы человека *ex vivo* (в пробирке). Для этого была выбрана система на основе дендритных клеток человека. Выделяли мононуклеары условно здоровых доноров, которые предварительно были генотипированы на наличие аллеля HLA*A02:01. Получали моноцитарную фракцию клеток путем временной адгезии на пластике, культивировали в среде с содержанием ростовых факторов. На стадии незрелых дендритных клеток осуществляли процедуру магнитной трансфекции исследу-

емыми конструкциями. Трансфицированные дендритные клетки культивировали в присутствии коктейля цитокинов до конечной стадии созревания.

В системе *ex vivo* с использованием мононуклеаров периферической крови условно здоровых доноров показано, что генно-инженерные конструкции pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1 обладают способностью индуцировать формирование цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих гранзим В. Кроме того, вакцинные конструкции pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1 обладают способностью индуцировать цитотоксическую активность аутологических мононуклеарных клеток периферической крови против клеток меланомы человека линии Mel Is. Статистический анализ полученных данных свидетельствует о том, что плазмиды pMEL-A0201 и pMEL-TCI, кодирующие спроектированные искусственные антигены, более эффективно индуцируют противоопухолевый иммунный ответ по сравнению с плазмидой pcDNA-MART-1, кодирующей последовательность полноразмерного ракового антигена MART-1 (Vorobova et al., 2018).

Доклинические испытания ДНК-вакцин pMEL-A0201, pMEL-TCI были проведены на нескольких видах животных, продемонстрирована их безопасность. Отчет о доклинических испытаниях одобрен экспертами, а разработанные ДНК-вакцины получили рекомендацию для дальнейшего продвижения в клинику.

В свою очередь Сергей Иванович уже генерировал новые идеи и предлагал сосредоточиться на разработке персонализированных противораковых вакцин, которые открывают новый этап в борьбе с онкологическими заболеваниями. Известно, что конкретная опухоль имеет индивидуальный генетический портрет (мутаном), который выражен в многочисленных мутациях в экспонируемых на поверхности раковых клеток опухоль-ассоциированных антигенов (т. е. неоантигенов) (Jiang et al., 2019). В отличие от вакцин, разработанных им ранее для лечения всех пациентов с конкретной опухолью, персонализированная вакцина включает в себя мутантные эпитопы из опухоль-ассоциированных белков, присущих только данному больному. Сергей Иванович считал, что потенциал противораковых вакцин мог бы быть в значительной степени повышен за счет конструирования иммуногенов на основе неоантигенов. В 2018 г. он подготовил на конкурс РФФИ проект «Разработка и валидация алгоритма конструирования персонализированных полиэпитопных антигенов, индуцирующих иммунный ответ против опухоли конкретного пациента». К сожалению, работа не была поддержана. Однако ученики не забыли труд Сергея Ивановича и в 2023 г. приступили к осуществлению его идей, заложенных в проекте РФФИ. Мы желаем им успеха и надеемся на яркие результаты в области персонализированной терапии рака в ближайшем будущем.

Вакцина против коронавируса

Пандемия COVID-19 стала причиной взрывного развития различных платформ для создания вакцин. В борьбу с пандемией включились лучшие научные школы всего мира.

Сергей Иванович в этот период уже тяжело болел, но он не мог оставаться в стороне и старался внести свой вклад

в разработку вакцины против новой коронавирусной инфекции. С появлением COVID-19 создатели вакцин и диагностических систем наконец-то активно начали обсуждать важность клеточного ответа в патогенезе вируса. Изучение иммунопатогенеза SARS-CoV-2 и его предшественников (SARS-CoV и MERS-CoV) показало, что синтез специфических иммуноглобулинов еще не свидетельствует о наличии эффективного протективного иммунного ответа. Не менее важна активация клеточного звена иммунитета. Высокая степень гомологии антигенных Т-клеточных эпитопов у SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 обуславливает возможность формирования перекрестного иммунитета к коронавирусам (Иванова и др., 2021).

SARS-CoV-2 быстро накапливает мутации, в результате чего меняется и его антигенный портрет. Это привело к тому, что вакцины первого поколения, разработанные на основе штамма из Ухани, уже обладают низкой эффективностью против циркулирующего в 2023 г. штамма омикрон. В связи с этим разработка универсальной вакцины против коронавируса приобретает особую актуальность.

Известно, что Т-клеточные ответы являются более пролонгированными и более консервативными в отношении различных субтипов вируса, поскольку направлены в том числе на белки, не являющиеся мишенями нейтрализующих антител, и, следовательно, в отсутствии давления отбора менее изменчивы (Sun et al., 2022). Сергей Иванович успел осуществить теоретический дизайн искусственного Т-клеточного иммуногена, состоящего из консервативных фрагментов белков различных штаммов вируса SARS-CoV-2. При конструировании была использована стратегия, основанная на объединении эпитопов в виде перекрывающихся пептидов согласно их расположению в нативных вирусных белках. Перекрывающиеся эпитопы представлены кластерами эпитопов из отдельных вирусных белков SARS-CoV-2 (из белков S, N, M и E), которые рестриктируются человеческими и мышинными МНС.

Эта задача его поддерживала и вдохновляла. Он даже смог приехать, чтобы рассказать про смоделированную им новую вакцину против коронавируса и передать расчеты для того, чтобы запустить ее в работу. Это был его последний день в «Векторе». Мы пообещали, что работу с иммуногеном доведем до проверки на экспериментальных животных, и сдержали слово. Исследование Т-клеточного иммуногена сейчас продолжает в рамках своей диссертационной работы молодой ученый Мария Боргоякова. Получены ДНК-вакцины, кодирующие спроектированный Сергеем Ивановичем полиэпитопный иммуноген; предварительные эксперименты показали, что они индуцируют вирус-специфический клеточный иммунитет у мышей и обеспечивают защиту мышей от заражения вирусом SARS-CoV-2 (Borgoyakova et al., 2022; Боргоякова и др., 2023; Borgoyakova et al., 2023).

Заключение

Сергей Иванович проработал в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» 47 лет – до последнего дня он занимался дизайном иммуногенов, курировал аспирантов, писал статьи. Все без исключения, кому посчастливилось учиться у него, работать с ним

и даже просто встречаться на научных форумах, признавали, каким неординарным и разносторонним человеком был Сергей Иванович. Он автор более 300 статей, 20 патентов и ряда научных монографий, изданных в России и за рубежом. Научный руководитель, воспитавший ряд кандидатов наук, самый востребованный рецензент и оппонент, член двух диссертационных советов, выполнявший обязанности заместителя председателя диссертационного совета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». С.И. Бажан пользовался заслуженным авторитетом как в нашей стране, так и за ее пределами, получал приглашения на международные конференции выступать с докладами, был руководителем международных проектов.

Исключительная интеллигентность, деликатность и доброжелательность к окружающим притягивали к Сергею Ивановичу таких же вдохновленных и целеустремленных исследователей. Понимающий и чуткий человек, всегда готовый поддержать, помочь, вдохновить, душа любой компании, прекрасный собеседник, рассказчик. Он был увлечен работой, своим делом, заниматься им было для него счастьем и радостью. И хотя жизненный путь человека конечен, жизнь в науке, в памяти и душе людей продолжается – выходят инициированные им работы, ученики и коллеги продолжают его дело.

Список литературы / References

- Антонец Д.В., Бажан С.И. Разработка полиэпитопных антигенов вируса Марбург для изучения протективности Т-клеточного ответа при экспериментальной летальной инфекции морских свинок. В: Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения. Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 16–17 ноября 2017 г. Санкт-Петербург, 2017; 116-117
- [Antonets D.V., Bazhan S.I. Development of Marburg virus polyepitope antigens to study the protectiveness of the T-cell response in experimental lethal infection of guinea pigs. In: Ensuring epidemiological well-being: challenges and solutions. Materials of the XI Congress of the All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists, Moscow, November 16–17, 2017. St. Petersburg, 2017; 116-117 (in Russian)]
- Антонец Д.В., Максютов А.З. TEpredict: программное обеспечение для предсказания Т-клеточных эпитопов. *Молекулярная биология*. 2010;44(1):130-139
- [Antonets D.V., Maksjutov A.Z. TEpredict: software for T-cell epitope prediction. *Molecular Biology*. 2010;44(1):119-127. DOI 10.1134/S0026893310010152]
- Антонец Д.В., Бажан С.И., Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Боробова Е.А., Старостина Е.В., Смирнова О.Ю., Орешкова С.Ф. Искусственный ген MEL-TCI-A0201, кодирующий полиэпитопный белок-иммуноген MEL-TCI-A0201, рекомбинантная плазмидная ДНК pMEL-TCI-A0201, обеспечивающая экспрессию искусственного гена MEL-TCI-A0201 и искусственный белок-иммуноген MEL-TCI-A0201, содержащий множественные CTL- и Th-эпитопы антигенов меланомы. Патент РФ № 2522830, 21.05.2014
- [Antonets D.V., Bazhan S.I., Ilyichev A.A., Karpenko L.I., Borobova E.A., Starostina E.V., Smirnova O.Yu., Oreshkova S.F. The artificial gene MEL-TCI-A0201 encoding the polyepitope immunogen protein MEL-TCI-A0201, the recombinant plasmid DNA pMEL-TCI-A0201, which provides the expression of the artificial gene MEL-TCI-A0201 and the artificial protein immunogen MEL-TCI-A0201 containing multiple CTL and Th melanoma antigen epitopes. Patent of the Russian Federation No. 2522830, May 21, 2014 (in Russian)]
- Антонец Д.В., Боробова Е.А., Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Орешкова С.Ф., Смирнова О.Ю., Старостина Е.В., Бажан С.И. Искусственный ген MEL-TCI, кодирующий полиэпитопный белок-иммуноген MEL-TCI, рекомбинантная плазмидная ДНК pMEL-TCI, обеспечивающая экспрессию искусственного гена MEL-TCI и искусственный белок-иммуноген MEL-TCI, содержащий CTL- и Th-эпитопы антигенов меланомы, рестриктированные множественными аллелями HLA I и II класса. Патент РФ № 2650872, 17.04.2018
- [Antonets D.V., Borobova E.A., Ilyichev A.A., Karpenko L.I., Oreshkova S.F., Smirnova O.Yu., Starostina E.V., Bazhan S.I. The artificial MEL-TCI gene encoding the polyepitope protein-immunogen MEL-TCI, the recombinant plasmid DNA pMEL-TCI, which provides the expression of the artificial gene MEL-TCI and the artificial protein-immunogen MEL-TCI containing CTL- and Th-epitopes of melanoma antigens, restricted by multiple alleles of HLA class I and II. Patent of the Russian Federation No. 2650872, 04.17.2018 (in Russian)]
- Бажан С.И., Кашеварова Н.А., Хлебодарова Т.М., Лихошвай В.А., Колчанов Н.А. Математическая модель внутриклеточного размножения вируса гриппа. *Биофизика*. 2009;54(6):1066-1080
- [Bazhan S.I., Kashevarova N.A., Khlebodarova T.M., Likhoshvai V.A., Kolchanov N.A. A mathematical model of the intracellular reproduction of the influenza virus. *Biofizika*. 2009;54(6):1066-1080 (in Russian)]
- Боробова Е.А., Антонец Д.В., Старостина Е.В., Карпенко Л.И., Жеравин А.А., Ильичев А.А., Бажан С.И. Способность искусственных антигенных конструкций, содержащих эпитопы белков, ассоциированных с меланомой, стимулировать цитотоксическую активность мононуклеарных клеток периферической крови в отношении клеток меланомы. *Сибирский онкологический журнал*. 2019;8(1):43-49. DOI 10.21294/1814-4861-2019-18-1-43-49
- [Borobova E.A., Antonets D.V., Starostina E.V., Karpenko L.I., Zhervin A.A., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Ability of protein epitope-containing constructs associated with melanoma to stimulate the cytotoxic activity of peripheral blood mononuclear cells against melanoma cells. *Siberian Journal of Oncology*. 2019;18(1):43-49. DOI 10.21294/1814-4861-2019-18-1-43-49 (in Russian)]
- Боргоякова М.Б., Карпенко Л.И., Рудометов А.П., Старостина Е.В., Задорожный А.М., Кисакова Л.А., Кисаков Д.Н., Шарабрин С.В., Ильичев А.А., Бажан С.И. Искусственный Т-клеточный иммуноген против COVID-19. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023;175(6):767-772. DOI 10.47056/0365-9615-2023-175-6-767-772
- [Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Starostina E.V., Zadorozhny A.M., Kisakova L.A., Kisakov D.N., Sharabrin S.V., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Artificial COVID-19 T-cell immunogen. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;175(6):767-772. DOI 10.47056/0365-9615-2023-175-6-767-772 (in Russian)]
- Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Носков А.К. Роль клеточного звена иммунитета в формировании иммунного ответа при коронавирусных инфекциях. *Медицинская иммунология*. 2021;23(6):1229-1238. DOI 10.15789/1563-0625-ROT-2302
- [Ivanova I.A., Omelchenko N.D., Filippenko A.V., Trufanova A.A., Noskov A.K. Role of the cellular immunity in the formation of the immune response in coronavirus infections. *Medical Immunology (Russia)*. 2021;23(6):1229-1238. DOI 10.15789/1563-0625-ROT-2302 (in Russian)]
- Лебедев Л.Р., Гончарова Е.П., Сизов А.А., Булычев Л.Е., Одегов А.М., Рыжиков А.Б. Экспериментальное моделирование молекулярных конструкций комбинированных вакцин. *Молекулярная биология*. 2003;37(3):544-549
- [Lebedev L.R., Goncharova E.P., Sizov A.A., Bulychev L.E., Odegov A.M., Ryzhikov A.B. Experimental molecular design of combined vaccines. *Molecular Biology*. 2003;37(3):464-467. DOI 10.1023/A:1024255814811]
- Назаркина Ж.К., Харьковова М.В., Антонец Д.В., Морозкин Е.С., Бажан С.И., Карпенко Л.И., Власов В.В., Ильичев А.А., Лактионов П.П. Конструирование полиэпитопной ДНК-вакцины против клеток опухолей молочной железы и исследование ее экспрессии в дендритных клетках. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015;160(10):492-496.
- [Nazarkina Zh.K., Khar'kova M.V., Antonets D.V., Morozkin E.S., Bazhan S.I., Karpenko L.I., Vlasov V.V., Ilyichev A.A., Laktionov P.P. Design of polyepitope DNA vaccine against breast carcinoma cells and

- analysis of its expression in dendritic cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;160(4):486-490. DOI 10.1007/s10517-016-3203-y]
- Старостина Е.В., Боробова Е.А., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. Терапевтические вакцины против меланомы. *Биотехнология*. 2017;33(6):4-11. DOI 10.21519/0234-2758-2017-33-6-04-11 [Starostina E.V., Borobova E.A., Karpenko L.I., Ilichev A.A., Bazhan S.I. Therapeutic vaccines against melanoma. *Biotechnologiya*. 2017;33(6):4-11. DOI 10.21519/0234-2758-2017-33-6-04-11 (in Russian)]
- Antonets D.V., Bazhan S.I. PolyCTLDesigner: a computational tool for constructing polyepitope T-cell antigens. *BMC Res. Notes*. 2013;6:407. DOI 10.1186/1756-0500-6-407
- Bazhan S.I., Likhoshvai V.A., Belova O.E. Theoretical analysis of the regulation of interferon expression during priming and blocking. *J. Theor. Biol.* 1995;175(2):149-160. DOI 10.1006/jtbi.1995.0127
- Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Poryaeva V.A., Aborneva I.V., Ilyichev A.A. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens. *Vaccine*. 2004;22(13-14):1672-1682. DOI 10.1016/j.vaccine.2003.09.048
- Bazhan S.I., Karpenko L.I., Ilyichev T.N., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Antonets D.V., Ilyichev A.A. Rational design based synthetic polyepitope DNA vaccine for eliciting HIV-specific CD8⁺ T cell responses. *Mol. Immunol.* 2010;47(7-8):1507-1515. DOI 10.1016/j.molimm.2010.01.020
- Bazhan S.I., Antonets D.V., Karpenko L.I., Oreshkova S.F., Kaplina O.N., Starostina E.V., Dudko S.G., Fedotova S.A., Ilyichev A.A. *In silico* designed Ebola virus T-cell multi-epitope DNA vaccine constructions are immunogenic in mice. *Vaccines*. 2019;7(2):34. DOI 10.3390/vaccines7020034
- Bazhan S.I., Antonets D.V., Starostina E.V., Ilyicheva T.N., Kaplina O.N., Marchenko V.Y., Volkova O.Y., Bakulina A.Y., Karpenko L.I. *In silico* design of influenza A virus artificial epitope-based T-cell antigens and the evaluation of their immunogenicity in mice. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2022;40(7):3196-3212. DOI 10.1080/07391102.2020.1845978
- Belova O.E., Likhoshvai V.A., Bazhan S.I., Kulichkov V.A. A computer system for analysis and integrated description of regulation of the molecular-genetic system of interferon induction and action. *Comput. Appl. Biosci.* 1995;11(2):213-218. DOI 10.1093/bioinformatics/11.2.213
- Bodewes R., Kreijtz J.H., Geelhoed-Mieras M.M., van Amerongen G., Verburgh R.J., van Trierum S.E., Kuiken T., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Vaccination against seasonal influenza A/H3N2 virus reduces the induction of heterosubtypic immunity against influenza A/H5N1 virus infection in ferrets. *J. Virol.* 2011;85(6):2695-2702. DOI 10.1128/JVI.02371-10
- Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Starostina E.V., Zadorozhny A.M., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shanshin D.V., Baranov K.O., Volkova N.V., Zaitsev B.N., Orlova L.A., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Danilenko E.D., Bazhan S.I., Shcherbakov D.N., Taranin A.V., Ilyichev A.A. Self-assembled particles combining SARS-CoV-2 RBD protein and RBD DNA vaccine induce synergistic enhancement of the humoral response in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(4):2188. DOI 10.3390/ijms23042188
- Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Starostina E.V., Shanshin D.V., Zadorozhny A.M., Kisakova L.A., Kisakov D.N., Sharabrin S.V., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Artificial COVID-19 T-cell immunogen. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2023;175(6):767-772. DOI 10.47056/0365-9615-2023-175-6-767-772
- Borobova E.A., Antonets D.V., Starostina E.V., Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Design of artificial immunogens containing melanoma-associated T-cell epitopes. *Curr. Gene Ther.* 2018;18(6):375-385. DOI 10.2174/1566523218666181113112829
- Chuykov V.V., Bazhan S.I., Kulichov V.A. Mathematical model of antiviral immune response regulation. I. Conceptual description of the modelled processes. *Folia Biol. (Praha)*. 1991;37(1):1-9
- Eroshkin A.M., Karginova E.A., Gileva I.P., Lomakin A.S., Lebedev L.R., Kamyinina T.P., Pereboev A.V., Ignat'ev G.M. Design of four-helix bundle protein as a candidate for HIV vaccine. *Protein Eng.* 1995;8(2):167-73. DOI 10.1093/protein/8.2.167
- de Vries R.D., Altenburg A.F., Rimmelzwaan G.F. Universal influenza vaccines, science fiction or soon reality? *Expert Rev. Vaccines*. 2015;14(10):1299-1301. DOI 10.1586/14760584.2015.1060860
- Halama N., Zoernig I., Jaeger D. Advanced malignant melanoma: immunologic and multimodal therapeutic strategies. *J. Oncol.* 2010;2010:689893. DOI 10.1155/2010/689893
- Jiang T., Shi T., Zhang H., Hu J., Song Y., Wei J., Ren S., Zhou C. Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications. *J. Hematol. Oncol.* 2019;12(1):93. DOI 10.1186/s13045-019-0787-5
- Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Ilyichev A.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Zaitsev B.N., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Bazhan S.I. Comparative analysis using a mouse model of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated Salmonella strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen. *Vaccine*. 2004;22(13-14):1692-1699. DOI 10.1016/j.vaccine.2003.09.050
- Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Eroshkin A.M., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Nekrasova N.A., Plyasunova O.A., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Zaitsev B.N., Danilenko E.D., Masycheva V.I., Bazhan S.I. Combined virus-like particle-based polyepitope DNA/protein HIV-1 vaccine design, immunogenicity and toxicity studies. *Vaccine*. 2007a;25(21):4312-4323. DOI 10.1016/j.vaccine.2007.02.058
- Karpenko L.I., Bazhan S.I., Eroshkin A.M., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Nekrasova N.A., Plyasunova O.A., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Danilenko E.D., Zaitsev B.N., Masicheva V.I., Ilyichev A.A., Sandakhchiev L.S. CombiHIVvac vaccine which contains polyepitope B and T-cell immunogens of HIV-1. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2007b;413:65-67. DOI 10.1134/s160767290702007x
- Karpenko L.I., Scherbakova N.S., Chikaev A.N., Tumanova O.Y., Lebedev L.R., Shalamova L.A., Pyankova O.G., Ryzhikov A.B., Ilyichev A.A. Polyepitope protein incorporated the HIV-1 mimotope recognized by monoclonal antibody 2G12. *Mol. Immunol.* 2012;50(4):193-199. DOI 10.1016/j.molimm.2012.01.003
- Karpenko L.I., Bazhan S.I., Antonets D.V., Belyakov I.M. Novel approaches in polyepitope T-cell vaccine development against HIV-1. *Expert Rev. of Vaccines*. 2014;13(1):155-173. DOI 10.1586/14760584.2014.861748
- Karpenko L.I., Bazhan S.I., Bogryantseva M.P., Ryndyuk N.N., Ginko Z.I., Kuzubov V.I., Lebedev L.R., Kaplina O.N., Reguzova A.Y., Ryzhikov A.B., Usova S.V., Oreshkova S.F., Nechaeva E.A., Danilenko E.D., Ilyichev A.A. Results of phase I clinical trials of a combined vaccine against HIV-1 based on synthetic polyepitope immunogens. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016;42(2):170-182. DOI 10.1134/S1068162016020060
- Karpenko L.I., Lebedev L.R., Bazhan S.I., Korneev D.V., Zaitsev B.B., Ilyichev A.A. Visualization of CombiHIVvac vaccine particles using electron microscopy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2017;33(4):323-324. DOI 10.1089/aid.2016.0140
- Karpenko L.I., Bazhan S.I., Eroshkin A.M., Antonets D.V., Chikaev A.N., Ilyichev A.A. Artificial epitope-based immunogens in HIV-vaccine design. In: *Advances in HIV and AIDS Control*. IntechOpen, 2018;205-225. DOI 10.5772/intechopen.77031
- Karpenko L.I., Apartsin E.K., Dudko S.G., Starostina E.V., Kaplina O.N., Antonets D.V., Volosnikova E.A., Zaitsev B.N., Bakulina A.Y., Venyaminova A.G., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Cationic polymers for the delivery of the ebola DNA vaccine encoding artificial T-cell immunogen. *Vaccines*. 2020;8(4):718. DOI 10.3390/vaccines8040718
- Koutsakos M., Illing P.T., Nguyen T.H.O., Mifsud N.A., Crawford J.C., Rizzetto S., Eltahla A.A., Clemens E.B., Sant S., Chua B.Y., Wong C.Y., Allen E.K., Teng D., Dash P., Boyd D.F., Grzelak L., Zeng W., Hurt A.C., Barr I., Rockman S., Jackson D.C., Kotsimbos T.C., Cheng A.C., Richards M., Westall G.P., Loudovaris T., Mannering S.I., Elliott M., Tangye S.G., Wakim L.M., Rossjohn J., Vijaykrishna D., Luciani F., Thomas P.G., Gras S., Purcell A.W., Kedzierska K. Human CD8⁺ T cell cross-reactivity across influenza A, B and C viruses. *Nat. Immunol.* 2019;20(5):613-625. DOI 10.1038/s41590-019-0320-6
- Krammer F., Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015;14(3):167-182. DOI 10.1038/nrd4529
- Peters B., Tong W., Sidney J., Sette A., Weng Z. Examining the independent binding assumption for binding of peptide epitopes to MHC-I molecules. *Bioinformatics*. 2003;19(14):1765-1772. DOI 10.1093/bioinformatics/btg247

- Pica N., Palese P. Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges. *Annu. Rev. Med.* 2013;64:189-202. DOI 10.1146/annurev-med-120611-145115
- Reguzova A., Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. *PLoS One.* 2015;10(3):e0116412. DOI 10.1371/journal.pone.0116412
- Sun Z., Wu T., Xie H., Li Y., Zhang J., Su X., Qi H. The role of cellular immunity in the protective efficacy of the SARS-CoV-2 vaccines. *Vaccines.* 2022;10(7):1103. DOI 10.3390/vaccines10071103
- Toes R.E., Nussbaum A.K., Degermann S., Schirle M., Emmerich N.P., Kraft M., Laplace C., Zwinderman A., Dick T.P., Müllner J., Schön-fisch B., Schmid C., Fehling H.J., Stevanovic S., Rammensee H.G., Schild H. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 2001;194(1):1-12. DOI 10.1084/jem.194.1.1
- Vita R., Overton J.A., Greenbaum J.A., Ponomarenko J., Clark J.D., Cantrell J.R., Wheeler D.K., Gabbard J.L., Hix D., Sette A., Peters B. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(D1):D405-D412. DOI 10.1093/nar/gku938
- Yewdell J.W. DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends Immunol.* 2011;32(11):548-558. DOI 10.1016/j.it.2011.08.001

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.






Поступила в редакцию 17.07.2023. После доработки 08.10.2023. Принята к публикации 09.10.2023.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-23

Оригинальное исследование

Характеристика популяций *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, существующих на мягкой пшенице в Поволжском и Центральном регионах России, по микросателлитным локусам

Е.С. Сколотнева ¹, Ю.В. Лаприна¹, О.А. Баранова ², Т.М. Коломиец ³, М.И. Киселева³, В.Н. Кельбин ¹, Е.А. Салина ¹

Аннотация: Для эффективной селекции пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине необходимо исследование популяций гриба, циркулирующих на посевах в конкретном регионе. Выявление вероятных источников инфекции возможно в результате отслеживания основных путей миграции спор патогена по всей территории возделывания пшеницы в пределах одной климатической зоны. Для ускоренного анализа и охвата большей выборки образцов предложено использовать микросателлитные маркеры, представляющие альтернативу традиционному фитопатологическому анализу состава генов вирулентности популяции. С их помощью проведено генотипирование монопустьных изолятов *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, собранных в Центральном регионе России и Поволжье на мягкой яровой пшенице, установлена высокая степень дифференциации между популяциями патогена. Предложена схема диагностики происхождения инфекции с помощью шкалы размеров аллелей микросателлитных маркеров.

Ключевые слова: возбудитель стеблевой ржавчины; микросателлитные локусы; мягкая яровая пшеница; Поволжье; Центральный регион России.

Для цитирования: Сколотнева Е.С., Лаприна Ю.В., Баранова О.А., Коломиец Т.М., Киселева М.И., Кельбин В.Н., Салина Е.А. Характеристика популяций *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, существующих на мягкой пшенице в Поволжском и Центральном регионах России, по микросателлитным локусам. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):201-208. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-23

Благодарности: Образцы инфекции из Центрального региона России любезно предоставлены сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (ФГБНУ ВНИИФ), образцы инфекции из Поволжья – сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ФГБНУ ВИЗР). Паспортизация штаммов возбудителя стеблевой ржавчины с помощью SSR-генотипирования проведена при поддержке гранта РНФ 23-16-00119.

Original article

Characteristics of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on bread spring wheat of the Volga region and the Central region of Russia by microsatellite loci

Е.С. Skolotneva ¹, Y.V. Laprina¹, O.A. Baranova ², T.M. Kolomiets ³, M.I. Kiseleva³, V.N. Kelbin ¹, E.A. Salina ¹

Abstract: Effective breeding for wheat immunity to stem rust is preceded by the study of fungal races circulating on crops in a particular region. In addition, to identify possible sources of infection, it is necessary to track the main routes of migration of pathogen spores throughout the wheat cultivation area within the same climatic zone. To speed up results and process a large sample, it is proposed to

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia

² Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия
All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

³ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Московская обл., Россия
All-Russian Institute of Phytopathology, Moscow region, Russia

 sk-ska@yandex.ru

© Сколотнева Е.С., Лаприна Ю.В., Баранова О.А., Коломиец Т.М., Киселева М.И., Кельбин В.Н., Салина Е.А., 2023

use microsatellite markers, which are an alternative to traditional phytopathological analysis of virulence genes in population. Single pustule isolates of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* from bread spring wheat of the Volga region and the central region of Russia were genotyped and high degree of differentiation between the pathogen populations was revealed. A scheme for diagnosing the origin of infection using a scale for the size of alleles of microsatellite markers is proposed

Key words: stem rust pathogen; microsatellite loci; soft spring wheat; Volga region; Central region of Russia.

For citation: Skolotneva E.S., Laprina Y.V., Baranova O.A., Kolomiets T.M., Kiseleva M.I., Kelbin V.N., Salina E.A. Characteristics of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on bread spring wheat of the Volga region and the Central region of Russia by microsatellite loci. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(4):201-208. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-23 (in Russian)

Acknowledgements: Infection samples from the Central region of Russia were kindly provided by employees of the All-Russian Research Institute of Phytopathology, infection samples from the Volga region by employees of the All-Russian Research Institute of Plant Protection. Certification of stem rust pathogen strains using SSR genotyping was supported by the Russian Science Foundation grant 23-16-00119.

Введение

Стеблевая ржавчина пшеницы, возбудителем которой служит грибок *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, за последние два десятилетия вошла в десятку заболеваний, отличающихся экономической значимостью. Исследование причин повсеместного повышения интенсивности болезни представляет теоретический и практический интерес (Dean et al., 2012; Rsaliev A.S., Rsaliev S.S., 2018). В отдельных регионах Российской Федерации отмечено регулярное проявление стеблевой ржавчины на мягкой пшенице, имеющей местный источник происхождения инфекции. Так, в 2010 г. значительное поражение посевов культуры наблюдалось в Северо-Кавказском и Поволжском регионах (Синяк, Волкова, 2015). Также в 2010 г. выявлена вспышка заболевания в Центральном регионе Российской Федерации, которая повторилась в 2013 и 2016 гг. (Larochkina et al., 2017). В 2016 г. на посевах яровой мягкой пшеницы в период колошения на всей территории Республики Татарстан отмечено сильнейшее распространение стеблевой ржавчины. Все сорта пшеницы, рекомендованные для возделывания в Татарстане, были восприимчивы, кроме сортов Тулайковская 5 и Белка (Василова и др., 2017). В Саратовской области, особенно в правобережной ее части, в 2016 г. эпифитотия стеблевой ржавчины проявилась на растениях в фазе молочной спелости зерна (начало июля) и продолжалась до полного созревания и уборки. Степень развития болезни достигала 80 %, средние потери урожая по пораженным сортам пшеницы составили 50 % (Сибикеев, неопубликованные данные).

Основные способы борьбы с этой типичной для пшеницы грибной болезнью включают применение химических средств защиты и устойчивых сортов. Однако первый метод может нанести вред экологии и здоровью людей, кроме того, является дорогостоящим и не всегда дает ожидаемые результаты (Шаманин и др., 2015). В связи с этим использование в производстве устойчивых сортов пшеницы наиболее предпочтительно. Известно, что из-за генетической изменчивости гриба возможно появление новых вирулентных рас, способных заражать ранее устойчивые сорта. Помимо этого, существует вероятность заноса агрессивной расы из другого региона возделывания пшеницы, поскольку споры способны перемещаться на огромные расстояния за небольшие промежутки времени при помощи циклонических масс. Для снижения потенциального вреда стеблевой ржавчины актуальна селекция сортов пшеницы, имеющих разно-

образную генетическую основу. Для селекции необходимо предварительное исследование рас гриба, циркулирующих на посевах в конкретном регионе. Кроме того, отслеживание основных путей миграции спор патогена на территории страны позволит выявить возможные источники инфекции. Для решения этой задачи традиционно прибегают к фитопатологическому анализу состава генов вирулентности у монопостульных изолятов патогена (single pustule isolate). Так, европейская популяция гриба на мягкой пшенице подвергается регулярному мониторингу с помощью маркеров вирулентности (Skolotneva et al., 2013; Сколотнева и др., 2020; Baranova et al., 2021). Альтернативным методом, позволяющим решить поставленные задачи быстрее и охватить выборку большего объема, может стать генотипирование образцов региональных популяций стеблевой ржавчины. Для этого необходимо подобрать молекулярно-генетические маркеры, которые смогут охарактеризовать выборки из различных популяций гриба.

Микросателлитные локусы (SSR, simple sequence repeats, повторы простых последовательностей) – участки ДНК, состоящие из тандемов повторяющихся единиц моно-, ди-, три-, тетра- или пентануклеотидов (Powell et al., 1996). Микросателлиты присутствуют в кодирующих и некодирующих областях ядерного генома, а также в хлоропластном и митохондриальном геномах (Chung et al., 2006). У ржавчинных грибов микросателлитные локусы распределены по хромосомам ядерного генома (Anderson et al., 2016). К причинам разнообразия количества повторов единиц микросателлитов в геноме относятся проскальзывание полимеразы во время репликации ДНК и/или несоответствующий кроссинговер, несовпадение/восстановление повреждений двойной нити ДНК, а также перемещения ретротранспозонов. Эти вариации приводят к полиморфизму по длине фрагментов, выявляемых при электрофорезе (Kalia et al., 2011). В настоящее время данный тип ДНК-маркеров становится все более популярным за счет ряда важных свойств, таких как гипервариабельность, мультиаллельная природа, кодоминантное наследование, высокая воспроизводимость, относительное обилие, экстенсивное распределение по геному, высокая пропускная способность и податливость автоматизации процесса. Праймеры ПЦР, разработанные для SSR в пределах одного вида, используются для амплификации соответствующего локуса у родственных видов, что позволяет проводить сравнительный геномный анализ

близкородственных видов, а также изучать филогенетические взаимоотношения близкородственных таксонов и исследовать популяционную структуру организмов с высокой генетической изменчивостью (Asad et al., 2012; Karaoglu et al., 2013). У дикариотических организмов, к которым относится возбудитель ржавчины злаков, кодоминантные маркеры, такие как SSR, более информативны для выявления генетических вариаций по сравнению с доминантными маркерами (Selkoe, Toonen, 2006).

Принимая во внимание актуальность регулярного проведения работ по изучению генетической структуры центрально-европейской популяции возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы, цель исследования заключалась в проведении SSR-генотипирования монопустьных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* из Центрального региона России и Поволжья, а также в анализе распределения локусов в популяциях, существующих на мягкой яровой пшенице.

Материал и методы

Материалом исследования служили образцы спор *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранные на посевах восприимчивых сортов пшеницы в 2019 г. в питомнике ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (Московская область, Центральный регион) и в с. Широкий Карамыш Лысогорского района Саратовской области в Поволжье. Последние образцы урединиоспор были любезно предоставлены нам сотрудниками ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». Из образцов популяций *P. graminis* f. sp. *tritici* выделены 110 и 22 монопустьных изолята (протоколы Всемирного справочного центра ржавчины (Global Rust Reference Center); Rsaliev A.S., Rsaliev S.S., 2018). Экстракцию ДНК из спорных навесок массой около 2 мг проводили с использованием модифицированного метода экстракции СТАВ (Michiels et al., 2003). Амплификация тринуклеотидных SSR ДНК-матриц осуществлена с помощью набора из 16 праймеров, разработанных специально для *P. graminis* f. sp. *tritici* (Zhong et al., 2009; Berlin et al., 2017) (табл. 1). Состав реакционной смеси был следующий: ДНК в концентрации 20 нг/мкл, 1.3 мкл буфера (67 mM Tris-HCl pH 8.8, 18 mM (NH₄)₂SO₄, 1.7 mM MgCl₂, 0.01 % Tween 20), 1 ед/мкл ДНК-полимеразы HS-Taq, 1.3 нМ прямого праймера с хвостом M13, 1.3 нМ обратного праймера, 0.54 mM dNTP, 30 pM флюороформ-M13 (FAM) и стерильная деионизированная вода объемом до 13 мкл. Амплификацию осуществляли по протоколу Touchdown: 95 °C – 5 мин, 12 циклов с постепенным понижением температуры отжига праймеров на 0.5 °C/цикл (95 °C – 30 с, 63 °C – 90 с, 72 °C – 30 с), затем 23 цикла (95 °C – 30 с, 57 °C – 90 с, 72 °C – 30 с) и 72 °C в течение 10 мин. Фрагментный анализ амплифицированной ДНК выполнен с помощью генетического анализатора ABI 3130XL GeneticAnalyzer (Applied Biosystems, США) в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия). Полученные результаты проанализированы с использованием программы Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems, США).

Обработка данных. Анализ частоты аллелей SSR-локусов патогенных популяций *P. graminis* f. sp. *tritici* из Центрального региона и Поволжья проведен с помощью программы

GenAlEx6.4 (Peakall, Smouse, 2012). Были рассчитаны H_0 – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга. Наблюдаемая гетерозиготность вычислена для каждого SSR-маркера и представляла собой долю образцов, гетерозиготных по локусу. Коэффициент инбридинга рассчитан с использованием уравнения $F_{IS} = (\text{среднее значение } H_0 - \text{среднее значение } H_e) / \text{среднее значение } H_e$.

Построение дендрограмм для определения филогенетических взаимоотношений между изолятами *P. graminis* f. sp. *tritici* выполнено методом UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean, метод попарного внутригруппового невзвешенного среднего) в программе PAST v. 4.05 (Hammer et al., 2001). Корреляция матриц вычислена с помощью программы VAT (Kosman et al., 2008). Для кластерного анализа SSR-полиморфизма внутри и между популяциями *P. graminis* f. sp. *tritici* использована программа Structure (Evanno et al., 2005), основанная на байесовском алгоритме. Предполагаемое число кластеров посчитано при помощи веб-программы Structure Harvester (Earl, vonHoldt, 2012).

Результаты

Обработка данных SSR-генотипирования монопустьных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* позволила охарактеризовать образцы географических популяций гриба из Центрального региона России и Поволжья. Показано, что количество аллелей для разных SSR-локусов в двух популяциях варьирует от 1 до 6 (табл. 2).

В популяции Центрального региона H_0 и H_e статистически значимо не отличаются только в случае локуса Pgestssr024, а для шести локусов гетерозиготность равна нулю. В популяции Поволжья H_0 и H_e статистически значимо не отличаются для трех локусов (Pgestssr024, Pgestssr142, PgtGAA8), а гетерозиготность равна нулю в пяти случаях. Во всех остальных случаях для двух популяций H_0 значительно выше, чем H_e , что указывает на избыток гетерозигот. Частоты аллелей исследованных локусов не были близки к равновесию Харди – Вайнберга (все значения F_{IS} отличны от нуля), ближе всех к нулю находится PgtGAA8. Индекс фиксации F_{IS} имеет отрицательные значения для всех остальных локусов (кроме PgtGAA8), что служит еще одним индикатором смещения генетического равновесия в данных группах в сторону избытка гетерозигот. Вероятно, популяции поддерживаются (существуют) за счет клонового размножения. Данное предположение снижает значение полового процесса для генетической изменчивости популяций *P. graminis* f. sp. *tritici*, но не отвергает его формообразующей роли в изучаемых регионах, что показано ранее (Skolotneva et al., 2013). Действительно, половая рекомбинация присутствует в жизненном цикле патогена поздней весной или ранним летом на промежуточном хозяине барбарисе, после чего следует многократная серия бесполой размножений на пшенице.

Групповое сравнение SSR-генотипов с помощью построения филогенетических деревьев позволяет более наглядно оценить влияние фактора обмена спорами на формирование структуры каждой географической популяции (рис. 1). Можно выделить два основных кластера в соответствии с географией происхождения материала. Кластер Поволжья

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров на микросателлитные маркеры (Szabo, 2007; Zhong et al., 2009)
Table 1. Nucleotide sequences of primers for microsatellite markers (Szabo, 2007; Zhong et al., 2009)

| Название локуса | Последовательность нуклеотидов праймера (5'–3') | Диапазон размеров амплифицированных фрагментов, п.н. |
|-----------------|---|--|
| Pgestssr021 | GTTTGCCTGATGATGGATGA | 187–193 |
| | CCGAATGCAGATTACCCCTTG | |
| Pgestssr024 | TCATCGACCAAGAGCATCAG | 259–274 |
| | TTCGGGAGTGAGTCTCTGCT | |
| Pgestssr059 | ATTATGCGGGACAAATCGAG | 210–234 |
| | AGGTTGATGATGGAGGATGC | |
| Pgestssr109 | CCATCCGATCATTCTTCGT | 232–235 |
| | CCGACCTTCTCTTGCTTCTG | |
| Pgestssr142 | CCACCAACAAACCAACAAGA | 167–179 |
| | GATGGTGAAGTCCGGTATGG | |
| Pgestssr173 | TCCCTTGACCTTTCTCAACG | 173–206 |
| | TCCATTGAGTTCATCGTGA | |
| Pgestssr227 | CACACGTCTCGAGGAACAGA | 176–218 |
| | CTCGTGGGATGAAGTCCATT | |
| Pgestssr293 | GAACCTTGGCCTGAGTGCTA | 257–269 |
| | GCAGCCTACAGCAAGAATCC | |
| Pgestssr325 | TTGGGTGAGTCAGAGTTTGAGA | 247–262 |
| | CCCACCCACTCTCAGTCAAT | |
| Pgestssr353 | TCGAATCCCAAGGAACAGAG | 140–152 |
| | ACGTCTTGGGTTTCTGTGGA | |
| Pgestssr318 | ACAGACACTCCCGAGCTCAT | 198–228 |
| | GATGTCGGTCTTGGTCCACT | |
| PgtCAA53 | AGGCTCAACACCACCCATAC | 201–213 |
| | AGGAGGAGGTGAAGGGGATA | |
| PgtCAA80 | GCCTCCAGACGAATGGTTTA | 189–198 |
| | TTGGTGATGATGATGGTTGG | |
| PgtCAA93 | CACTCTCGCCAAACCTCATT | 275–293 |
| | CGCCTGTGATGGTTGTATTG | |
| PgtCAA98 | ATTCCGATGGTCCGTTACTG | 202–250 |
| | CCATCCCACTCAAATCATCC | |
| PgtGAA8 | GGATGATCGGTGAGTTGGTT | 129–159 |
| | TGCTGCCTGTCTGCGAAC | |

имеет более сложную структуру, чем кластер Центрального региона. Очевидно, заноса спор из одного региона в другой не происходит, эти популяции изолированы друг от друга долгое время. Эти выводы полностью подтверждены результатами кластерного анализа, осуществленного в программе Structure. При анализе генотипических кластеров в программах Structure и Structure Harvester четко выявлены три кластера. Образцы Центрального региона разделились на два кластера, причем первый дополнительно делился на два субкластера. Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что эти две популяции имеют независимое происхождение. Среди возможных объяснений

могут быть экологические особенности исследуемых районов. В силу различий в составе высеваемых (районируемых) сортов пшеницы генетическая структура популяций *P. graminis* f. sp. *tritici* также будет зависеть от генотипов растений-хозяев и их частоты в посевах. Однако следует учесть, что ДНК-полиморфизм внутри и между популяциями гриба выявлен с помощью селективно нейтральных SSR-маркеров. Это позволяет оценить степень обмена инфекционным материалом. Кластерный анализ данных демонстрирует отсутствие контакта между популяциями, локализованными в обозначенных регионах, которые разделяют более 400 км (крайние точки сбора образцов популяции). Помимо зна-

Таблица 2. Характеристика SSR-маркеров, полученная при помощи программы GenAlEx6.4 (Peakall, Smouse, 2012)
Table 2. Characteristics of SSR markers obtained using the GenAlEx6.4 program (Peakall, Smouse, 2012)

| Локус | Популяция 1 | | | | Популяция 2 | | | |
|-------------|-------------|-------|-------|----------|-------------|-------|-------|----------|
| | Na | H_0 | H_e | F_{IS} | Na | H_0 | H_e | F_{IS} |
| Pgestssr021 | 2 | 0.82 | 0.50 | -0.64 | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д |
| Pgestssr024 | 2 | 0.09 | 0.09 | -0.05 | 2 | 0.43 | 0.34 | -0,27 |
| Pgestssr059 | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д |
| Pgestssr109 | 2 | 0.78 | 0.48 | -0.64 | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д |
| Pgestssr142 | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 | 2 | 0.43 | 0.34 | -0.27 |
| Pgestssr173 | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 | 2 | 0.95 | 0.50 | -0.91 |
| Pgestssr227 | 4 | 0.91 | 0.58 | -0.56 | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 |
| Pgestssr293 | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 |
| Pgestssr325 | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 |
| Pgestssr353 | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 |
| Pgestssr318 | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 |
| PgtCAA53 | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д |
| PgtCAA80 | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д |
| PgtCAA93 | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д | 2 | 0.81 | 0.48 | -0.68 |
| PgtCAA98 | 2 | 1.00 | 0.50 | -1.00 | 3 | 0.67 | 0.46 | -0.45 |
| PgtGAA8 | 1 | 0.00 | 0.00 | #Н/Д | 3 | 0.33 | 0.39 | 0.15 |

Примечание. Популяция 1 – 110 образцов спор *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранных на восприимчивых сортах пшеницы в 2019 г. в Центральном регионе европейской части страны; популяция 2 – 22 образца спор *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранных в 2019 г. в Поволжье. Na – количество аллелей на локус, H_0 – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность (доля образцов, которая ожидается быть гетерозиготной при случайном спаривании), #Н/Д – нет данных, F_{IS} – коэффициент инбридинга. $F_{IS} = (\text{среднее значение } H_0 - \text{среднее значение } H_e) / \text{среднее значение } H_e$

Таблица 3. Размеры ампликонов микросателлитных локусов *P. graminis* f. sp. *tritici*, диагностирующих происхождение инфекции**Table 3.** Amplicon sizes of microsatellite loci of *P. graminis* f. sp. *tritici*, diagnosing the origin of the infection

| Локус | Размеры аллелей, п.н. | Регион происхождения |
|-------------|-----------------------|----------------------|
| Pgestssr227 | 190; 193 | Центральный регион |
| | 187 | Поволжье |
| Pgestssr173 | 194; 206 | Центральный регион |
| | 173; 191 | Поволжье |
| Pgestssr059 | 210; 228 | Центральный регион |
| | 231 | Поволжье |
| Pgestssr293 | 257 | Центральный регион |
| | 266; 269 | Поволжье |
| Pgestssr325 | 259 | Центральный регион |
| | 247; 256 | Поволжье |
| PgtCAA93 | 278 | Центральный регион |
| | 275; 293 | Поволжье |
| Pgestssr021 | 190; 193 | Центральный регион |
| | 187 | Поволжье |

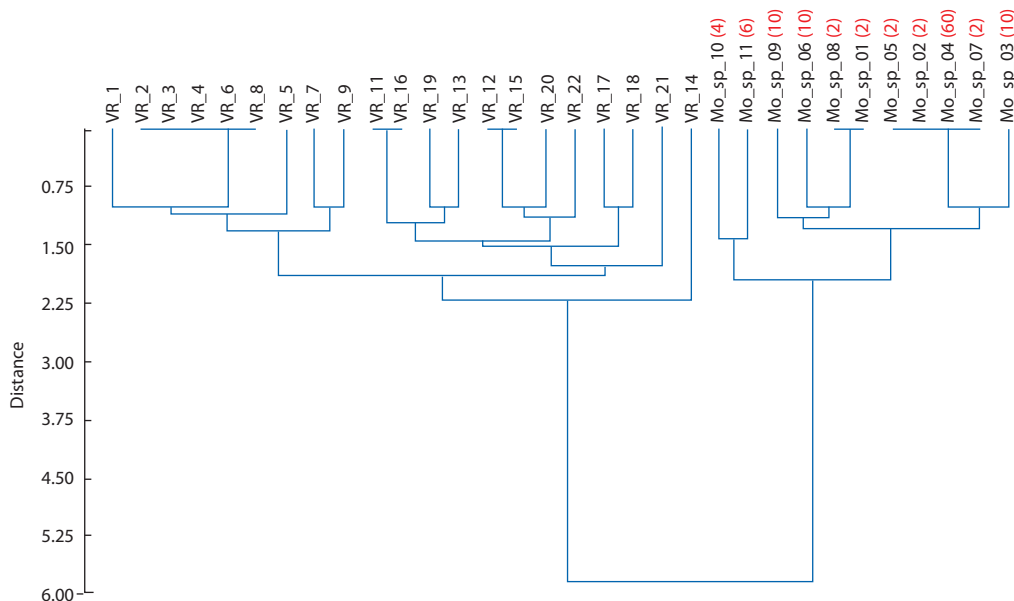


Рис. 1. Дендрограмма распределения изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* из Центрального (Mo_sp) и Поволжского (VR) регионов по результатам SSR-генотипирования. В скобках указано количество изолятов, входящих в группу

Fig. 1. Dendrogram combining SSR genotyping data of *P. graminis* f. sp. *tritici* from the central region (Mo_sp) and the Volga region (VR). The number of isolates included in the group is indicated in brackets

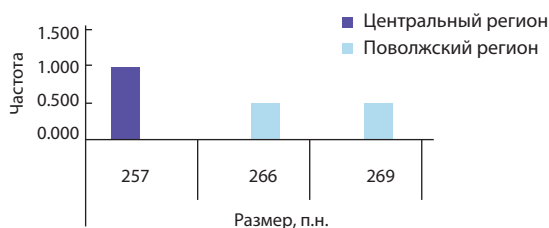


Рис. 2. Частота аллелей локуса Pgestssr293 среди изолятов образцов популяций *P. graminis* f. sp. *tritici* из Центрального региона и Поволжья

Fig. 2. Allele frequency of the Pgestssr293 locus among population samples of *P. graminis* f. sp. *tritici* from the Central region and the Volga region

чительного расстояния барьером является различие в степени конвекции воздуха в Центральном регионе и Поволжье из-за разной скорости ветров, циркулирующих над этими территориями (<https://ecoteco.ru/library/magazine/zhurnal-9/tehnologii/karta-vetrov-rossii>).

Фрагментный анализ результатов SSR-генотипирования 132 монопустульных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* показал маркеры, аллельный состав которых позволяет охарактеризовать их географическое происхождение. Семь маркеров к микросателлитным локусам Pgestssr021, Pgestssr227, Pgestssr173, Pgestssr059, Pgestssr293, Pgestssr325, PgtCAA93 могут быть использованы для паспортизации штаммов гриба. Остальные маркеры из 16 протестированных не дифференцировали выборку. Для диагностических целей были отобраны такие маркеры, аллели которых не совпа-

дали по размеру: так, при использовании праймеров к локусу Pgestssr293 (рис. 2) образец из Центрального региона был представлен аллелем 257 п.н. в гомозиготном состоянии, а в образцах из Поволжья данный локус находился в гетерозиготном состоянии и представлен аллелями размером 266 и 269 п.н. Таким образом, для установления географического происхождения инфекции с помощью набора праймеров к микросателлитным локусам предложено соотнести размеры аллелей тестируемого изолята гриба с соответствующими табличными значениями (табл. 3).

Мы можем предложить следующую схему диагностики происхождения инфекции с помощью SSR-праймеров к микросателлитным локусам Pgestssr021, Pgestssr227, Pgestssr173, Pgestssr059, Pgestssr293, Pgestssr325 и PgtCAA93: (1) получение монопустульных изолятов из природного образца инфекции, (2) выделение геномной ДНК гриба с использованием СТАВ-буфера, (3) проведение ПЦР-амплификации пробы с SSR-праймером, (4) определение размера ампликонов с использованием фрагментного анализа продуктов ПЦР-амплификации и анализ полученных результатов с помощью программного обеспечения Peak Scanner v1.0.; (5) диагностика географического происхождения инфекции с помощью шкалы размеров аллелей микросателлитных маркеров (см. табл. 3).

В связи с угрозой проникновения вирулентной расы Уганда 99 (Ug99) стеблевой ржавчины пшеницы из стран Ближнего Востока и Средней Азии (Шаманин и др., 2015) проведено сравнение полученных SSR-профилей изолятов центральноевропейской популяции стеблевой ржавчины с имеющимся SSR-профилем расы Ug99 (Visser et al., 2009). Локус PgtSSR21 имеет у агрессивной расы два аллеля раз-

мером 165, 160 п.н. Среди SSR-профилей изолятов из Центрального региона выявлено два других аллеля этого локуса, размером 190 и 193 п.н. Таким образом, циркулирующие на территории Центрального региона РФ и Поволжья расы *P. graminis* f. sp. *tritici* по результатам SSR-генотипирования не входят в семейство рас Ug99.

Обсуждение

Популяции фитопатогенных организмов, к которым относится возбудитель стеблевой ржавчины, в географически удаленных районах возделывания мягкой пшеницы, как правило, формируются под влиянием генотипа высеваемых сортов. Об этом свидетельствует практика традиционных исследований популяций грибов по признаку вирулентности (Гультяева и др., 2015). Однако для возбудителя стеблевой ржавчины миграция спор на значительные расстояния может повышать степень генетической изменчивости отдельной географической популяции, при этом снижая различия между ними. Особенности климата и рельефа регионов также играют немаловажную роль в формировании и степени изоляции популяций. В настоящем исследовании с помощью селективно нейтральных микросателлитных маркеров установлена высокая степень дифференциации между популяциями Центрального региона и Поволжья. Это, в свою очередь, позволяет проводить самостоятельные программы селекции на иммунитет и не исключает необходимости регулярного мониторинга инфекции на посевах мягкой пшеницы.

Предложенная схема диагностики на основании SSR-генотипирования образцов позволит решить такие задачи эпидемиологической значимости, как паспортизация изолятов гриба, выяснение происхождения инфекции, а также установление путей миграции спор в течение сезона вегетации пшеницы, в дополнение к традиционному фитопатологическому анализу.

Список литературы / References

Василова Н.З., Асхадуллин Дам.Ф., Асхадуллин Дан.Ф. Эпифитотия стеблевой ржавчины на яровой пшенице в Татарстане. *Защита и карантин растений*. 2017;(2):27-28. DOI 10.28983/asj.y2021i8pp23-27
[Vasilova N.Z., Askhadullin Dam.F., Askhadullin Dan.F. Stem rust epiphytotic on soft spring wheat in Tatarstan. *Zashchita i Karantin Rastenij = Plant Protection and Quarantine*. 2017;(2):27-28. DOI 10.28983/asj.y2021i8pp23-27 (in Russian)]

Гультяева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Казарцев И.А., Аристова М.К. Структура российских популяций гриба *Puccinia triticina* Eriks. *Вестник защиты растений*. 2015;(3(85)):5-10
[Gultyayeva E.I., Shaidayuk E.L., Kazartsev I.A., Aristova M.K. Structure of russian populations of *Puccinia triticina*. *Vestnik Zashchity Rastenij = Plant Protection News*. 2015;(3(85)):5-10 (in Russian)]

Синяк Е.В., Волкова Г.В. Распространение и вирулентность популяции возбудителя *Puccinia graminis* pers. f.sp. *Tritici* erikss. et henn. на юге России. *Молодой ученый*. 2015;(9(89)):70-71
[Sinyak E.V., Volkova G.V. Spreading and virulence of *Puccinia graminis* pers. f. sp. *Tritici* erikss. et henn. in Southern Russia. *Molodoy Uchenyj = Young Scientist*. 2015;(9(89)):70-71 (in Russian)]

Сколотнева Е.С., Кельбин В.Н., Моргунов А.И., Бойко Н.И., Шаманин В.П., Салина Е.А. Расовый состав новосибирской популяции *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Микология и фитопатология*. 2020;54(1):49-58. DOI 10.31857/S0026364820010092
[Skolotneva E.S., Kelbin V.N., Morgunov A.I., Boiko N.I., Shamanin V.P., Salina E.A. Races Composition of the Novosibirsk Popula-

tion of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2020;54(1):49-58. DOI 10.31857/S0026364820010092 (in Russian)]

Шаманин В.П., Моргунов А.И., Петуховский С.Л., Лихенко И.Е., Левшунов М.А., Салина Е.А., Потоцкая И.В., Трущенко А.Ю. Селекция яровой мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине в Западной Сибири. Под ред. В.П. Шаманина. Омск: ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, 2015.
[Shamanin V.P., Morgunov A.I., Petukhovskiy S.L., Likhenko I.E., Levs-hunov M.A., Salina E.A., Pototskaya I.V., Trushchenko A.Y. Breeding spring bread wheat for resistance to stem rust in Africa. Shamanin V.P. (Ed.). Омск: P.A. Stolypin Education Omsk State Agrarian University Publ., 2015 (in Russian)]

Anderson C., Khan M.A., Catanzariti A.M., Jack C.A., Nemri A., Lawrence G.J., Upadhyaya N.M., Hardham A.R., Ellis J.G., Dodds P.N., Jones D.A. Genome analysis and avirulence gene cloning using a high-density RADseq linkage map of the flax rust fungus, *Melampsora lini*. *BMC Genomics*. 2016;17(1):667. DOI 10.1186/s12864-016-3011-9

Asad M.A., Xia X., Wang C., He Z. Molecular mapping of stripe rust resistance gene *YrSN104* in Chinese wheat line Shaannong 104. *Hereditas*. 2012;149(4):146-152. DOI 10.1111/j.1601-5223.2012.02261.x

Baranova O.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Sozina I.D. Loss of effectiveness of stem rust resistance genes Sr25 and Sr6Agi in the Lower Volga region. *PLANT Prot. NEWS*. 2021;104(2):105-112. DOI 10.31993/2308-6459-2021-104-2-14994

Berlin A., Samils B., Andersson B. Multiple genotypes within aecial clusters in *Puccinia graminis* and *Puccinia coronata*: improved understanding of the biology of cereal rust fungi. *Fungal Biol. Biotechnol*. 2017;4(1):1-7. DOI 10.1186/S40694-017-0032-3

Chung S.M., Staub J.E., Chen J.F. Molecular phylogeny of Cucumis species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation. *Genome*. 2006;49(3):219-29. DOI 10.1139/g05-101

Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol*. 2012;13(4):414-30. DOI 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

Earl D.A., vonHoldt B.M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour*. 2012;4(2):359-361. DOI 10.1007/s12686-011-9548-7

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol*. 2005;14(8):2611-2620. DOI 10.1111/J.1365-294X.2005.02553.X

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4(1):9. Available at: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Herrman A., Dinooor A., Schachte G., Kosman E. Virulence Analysis Tool (VAT). 2008.

Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 2011;177:309-344. DOI 10.1007/s10681-010-0286-9

Karaoglu H., Lee C.M.Y., Park R. Simple sequence repeats in *Puccinia graminis*: Abundance, cross-formae speciales and intra-species utility, and development of novel markers. *Australas. Plant Pathol*. 2013;42(3):271-281. DOI 10.1007/s13313-013-0199-x

Lapochkina I.F., Baranova O.A., Shamanin V.P., Volkova G. V., Gainullin N.R., Anisimova A. V., Galinger D.N., Lazareva E.N., Gladkova E. V., Vaganova O.F. The development of the initial material of spring common wheat for breeding for resistance to stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), including the Ug99 race, in Russia. *Russ. J. Genet. Appl. Res*. 2017;7(3):308-317. DOI 10.1134/S207905971703008X

Michiels A., Van Den Ende W., Tucker M., Van Riet L., Van Laere A. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Anal. Biochem*. 2003;315(1):85-89. DOI 10.1016/S0003-2697(02)00665-6

Peakall R., Smouse P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537. DOI 10.1093/BIOINFORMATICS/BTS460

Powell W., Machray G., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci*. 1996;1:215-222. DOI 10.1016/S1360-1385(96)86898-0

- Rsaliev A.S., Rsaliev S.S. Principal approaches and achievements in studying race composition of wheat stem rust. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(8):967-977. DOI 10.18699/VJ18.439
- Selkoe K.A., Toonen R.J. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 2006;9(5):615-29. DOI 10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x
- Skolotneva E.S., Lekomtseva S.N., Kosman E. The wheat stem rust pathogen in the central region of the Russian Federation. *Plant Pathol.* 2013;62(5):1003-1010. DOI 10.1111/PPA.12019
- Szabo L.J. Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus, *Puccinia graminis*. *Mol. Ecol. Notes*. 2007;7(1):92-94. DOI 10.1111/j.1471-8286.2006.01540.x
- Visser B., Herselman L., Pretorius Z.A. Genetic comparison of Ug99 with selected South African races of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. *Mol. Plant Pathol.* 2009;10(2):213-222. DOI 10.1111/j.1364-3703.2008.00525.x
- Zhong S., Leng Y., Friesen T.L., Faris J.D., Szabo L.J. Development and characterization of expressed sequence tag-derived microsatellite markers for the wheat stem rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*. 2009;99(3):282-289. DOI 10.1094/PHYTO-99-3-0282

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.05.2023. После доработки 21.08.2023. Принята к публикации 30.08.2023.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-24

Обзор

Генетические основы детерминации срока цветения у подсолнечника *Helianthus annuus* L.

А.Б. Щербань  

Аннотация: Необходимость уборки урожая до наступления неблагоприятных погодных условий определяет оптимальные сроки цветения и созревания культурных растений для каждой географической зоны. Продолжительность вегетационного периода у подсолнечника *Helianthus annuus* L. зависит от генотипа сорта, природно-климатических условий выращивания и контролируется сложной регуляторной системой, включающей множество генов. Важную роль в этой системе играют гены-интеграторы, которые объединяют различные сигналы и в зависимости от уровня своей экспрессии влияют на активность генов-мишеней, детерминирующих процессы дифференцировки тех или иных органов и тканей. Один из таких генов-интеграторов – флориген *FT*, или активатор цветения. Ортологи гена *FT* обнаружены у многих культурных растений, в том числе у подсолнечника. Кроме этого гена в геноме подсолнечника идентифицирован ряд генов фотопериодической регуляции, включая *CONSTANS*, а также другие гены и QTL, влияющие на время цветения. Данный обзор посвящен обсуждению роли различных генетических локусов в детерминации указанного признака у подсолнечника, а также поиску генов-мишеней для маркер-ориентированной селекции сортов этой культуры, приспособленных к различным климатическим условиям.

Ключевые слова: подсолнечник; вегетационный период; время цветения; фотопериод; флориген; QTL-локус количественного признака.

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта FWNR № 2022-0017.

Для цитирования: Щербань А.Б. Генетические основы детерминации срока цветения у подсолнечника *Helianthus annuus* L. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):209-217. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-24

Review

Genetic basis for determining the flowering period in sunflower *Helianthus annuus* L.

А.В. Shcherban  


Abstract: The need to harvest before the onset of adverse weather conditions determines the optimal timing of flowering and maturation of cultivated plants for each geographical area. The duration of the growing season in sunflower *Helianthus annuus* L. depends on the variety genotype, natural and climatic growing conditions and is controlled by a complex regulatory system that includes many genes. An important role in this system is played by integrator genes that integrate various signals and, depending on the level of their expression, affect the activity of target genes that determine the processes of differentiation of certain organs and tissues. One such integrator gene is florigen *FT*, or flowering activator. Orthologs of the *FT* gene have been found in many cultivated plants, including sunflower. In addition to this gene, a number of photoperiodic regulation genes have been identified in the sunflower genome, including *CONSTANS*, as well as other genes and QTLs that affect flowering time. This review is devoted to a discussion of the role of various genetic loci in the determination of this trait in sunflower, as well as the search for target genes for marker-associated breeding of varieties of this crop adapted to different climatic conditions.


Key words: sunflower; growing season; timing of flowering; photoperiod; florigen; quantitative trait locus.

Acknowledgements: This work was supported by budget project No. FWNR-2022-0017.

For citation: Shcherban A.B. Genetic basis for determining the flowering period in sunflower *Helianthus annuus* L. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(4):209-217. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-24 (in Russian)

Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

 atos@bionet.nsc.ru

 Щербань А.Б., 2023

Введение

Подсолнечник масличный, или однолетний (*Helianthus annuus* L.), – вид травянистых растений из рода *Helianthus* семейства Asteraceae (Сложноцветные) и одна из важнейших масличных культур. Родиной подсолнечника является южная часть Северной Америки, где широко распространены дикие представители рода *Helianthus*. В ходе domestikации, которая насчитывает более 3 тыс. лет, подсолнечник приобрел целый ряд новых черт, таких как неветвистость побегов, крупные семена и наличие только одного большого соцветия на растении (Blackman, 2013). Исходные дикие популяции *H. annuus* отличаются большим разнообразием по сроку цветения (Heiser, 1954). Природные американские ландрасы в основном характеризуются поздним цветением (Heiser, 1951), тогда как большинство современных элитных сортов подсолнечника имеют укороченный срок цветения (Goynes, Schreiner 1988; Goynes et al., 1989). Вариативность данного признака обеспечила приспособление этой культуры к различным условиям как южного, так и северного полушария, к тропическому, субтропическому и умеренному климату.

После открытия Колумбом Америки в XVI в. растение попало в Европу, где его поначалу выращивали как декоративное. В Россию подсолнечник завезен из Голландии в XVIII в. и также использовался в декоративных целях и для получения съедобных семян. В начале XIX в. крепостной крестьянин Воронежской губернии Д.С. Бокарев с помощью ручного пресса впервые получил масло из семян подсолнечника. Впоследствии, после появления первых маслобойных предприятий, посевы подсолнечника быстро распространились в России, на Северном Кавказе, Украине и в Сибири. Первые работы по селекции масличных сортов в России были начаты еще в 1860-х гг. Благодаря столь длительной селекционной работе создано самое большое в мире биоразнообразие форм, сортов и гибридов культурного подсолнечника. Возделываемые до революции 1917 г. местные сорта имели сравнительно низкую масличность (30 %) и высокую лузжистость или процентное содержание оболочек семян – лузги (44 %). Современные сорта содержат до 50 % масла, а их лузжистость не превышает 25 %. В советское время огромную роль в селекции культурного подсолнечника сыграли выдающиеся отечественные селекционеры, среди которых академики Л.А. Жданов и В.С. Пустовойт, Е.М. Плачек, В.И. Щербина, К.И. Прохоров. Центральным учреждением по селекции подсолнечника являлся Всесоюзный (ныне Всероссийский) НИИ масличных культур имени В.С. Пустовойта (ВНИИМК, Краснодар). В нем были получены сорта, устойчивые к подсолнечниковой моли и паразитическому растению – заразихе, ряд высокоурожайных и скороспелых сортов, пригодных для возделывания в условиях РФ. На Сибирской опытной станции ВНИИМК (Омск) был создан сорт Иртыш, являющийся мировым рекордсменом по содержанию масла (60 %).

Со второй половины XX в. в мире наблюдается устойчивое повышение интереса к подсолнечнику как масличному растению. За последние 10 лет мировое производство этой культуры выросло на 80 %, составив 55 млн тонн. Среди стран производителей на первом месте находится Украина (26 % мирового валового производства), доля России со-

ставляет 23 %, стран ЕС – 17 %, Аргентины – 6 % (Векленко, 2022).

В России по объему производства подсолнечник превосходит другие масличные культуры, такие как соя и рапс. Так, в 2021 г. его валовой сбор составил 15.5 млн тонн, что на 16.8 % больше, чем в 2020 г.¹ Увеличение объема производства в первую очередь обеспечено за счет расширения посевных площадей и вовлечения в ареал возделывания новых географических регионов, включая Сибирь, Урал, Дальний Восток (Лукомец и др., 2015). Однако основными проблемами возделывания подсолнечника в этих регионах являются холодный климат и в связи с этим необходимость создания скороспелых холодоустойчивых сортов. Продолжительность периода вегетации у подсолнечника составляет 70–140 сут. Если в южных регионах РФ оптимальным является срок 90–110 дней (среднеранние сорта), то для Нечерноземной зоны, Сибири и других регионов с умеренным и континентальным климатом более востребованы раннеспелые сорта (70–90 дней). В различных научных центрах ведутся активная интродукция и селекция сортов и гибридов подсолнечника, подходящих для самых северных зон возделывания (Пузиков, Суворова, 2001; Лошкормойников, 2013). В настоящее время все более распространенным становится метод маркер-ориентированной селекции, который позволяет значительно ускорить селекционный процесс и сделать его более эффективным. Однако для использования этого метода, в частности с целью отбора растений по сроку цветения, от которого зависит период вегетации, требуются идентификация и структурный анализ генов-мишеней, контролирующих данный количественный признак.

Генетическая система, контролирующая время цветения

В соответствии с общим законом гомологических рядов наследственной изменчивости Н.И. Вавилова, генетические механизмы, лежащие в основе детерминации фаз жизненного цикла у различных групп высших растений эволюционно консервативны и содержат гомологичные компоненты. Механизм регуляции цветения был подробно изучен на модельном растительном объекте *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Лебедева и др., 2020). При изучении других видов растений установлено, что в основе данного механизма лежат общие пути регуляции, которые по-разному проявляют себя в зависимости от генотипа и факторов внешней (фотопериод и температура) и внутренней (гормоны) среды организма. Так, большинство генов регуляции цветения арабидопсиса имеют своих ортологов у подсолнечника, включая гены восприятия света, реакции на фотопериод, гиббереллинового сигнального пути и др. (Blackman et al., 2011) (рис. 1). Некоторые гены, присутствующие у арабидопсиса в единичной копии, выявлены у подсолнечника в более чем одной копии, как результат дупликаций в ходе древних событий полиплоидизации (Barker et al., 2008).

Влияние фотопериода на время цветения реализуется через гены циркадных часов и восприятия света; сигнала

¹ В каких регионах собрали самый высокий урожай масличных в 2021 году? Доступно: <https://www.oilworld.ru/analytics/localmarket/327345>

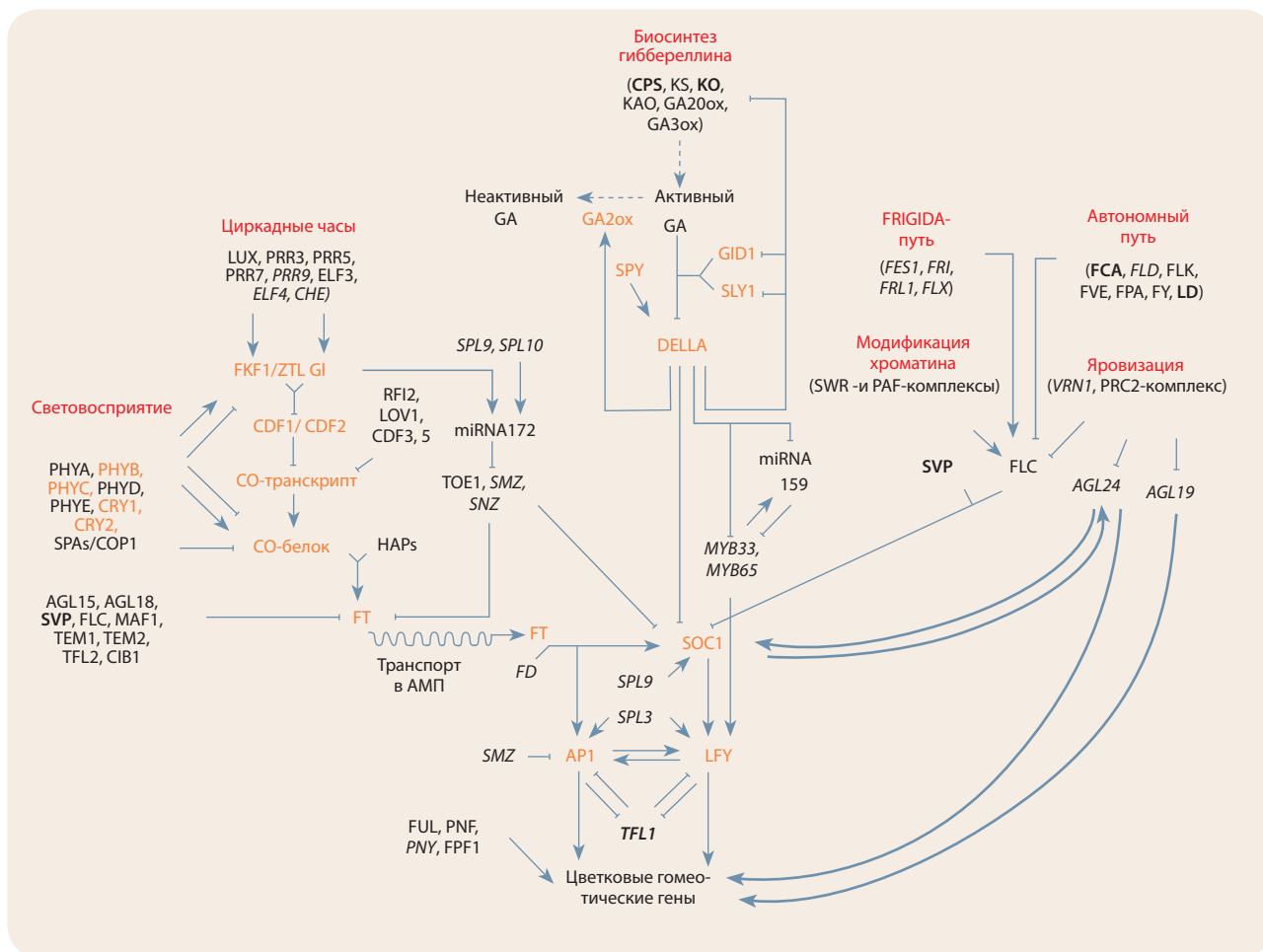


Рис. 1. Схема регуляции цветения арабидопсиса. Выявленные гомологичные гены подсолнечника, колокализирующиеся с QTL, выделены оранжевым (Blackman et al., 2011). Отношения активации и репрессии между генами обозначены стрелками и T-образными линиями соответственно

Fig. 1. Scheme of regulation of flowering in Arabidopsis. Identified homologous sunflower genes that colocalize with QTL are highlighted in orange (from Blackman et al., 2011). Activation and repression relationships between genes are indicated by arrows and T-shaped lines, respectively

лы передаются на ген-интегратор *CONSTANS* (*CO*). Данный ген выявлен у большинства покрытосеменных растений (Putterill et al., 1995; Imaizumi et al., 2005). Он кодирует транскрипционный фактор, который в индуктивных условиях (определенная длина светового дня) активирует транскрипцию гена *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) (Valverde, 2011). Последний является центральным геном-интегратором, объединяющим *CO*-зависимый и *CO*-независимый каскады. Белок FT, экспрессирующийся в листьях, через флоэму поступает в клетки апикальной меристемы побега, где в составе флориген-активирующего комплекса (Florigen Activation Complex, FAC) совместно с транскрипционным фактором *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) активирует экспрессию генов-интеграторов меристемы: *SOC1* (*Suppressor of Overexpression of Constans 1*) и *AP1* (*APETALA1*) (Collani et al., 2019). Последние в свою очередь активируют ген идентичности меристемы *LFY* (*LEAFY*) и инициируют сигнальный каскад гомеотических генов, контролирующих закладку органов цветка (Putterill, Varkonyi-Gasic, 2016). Помимо внешнего сигнала фотопериода в регуляции генов идентичности цветковых меристем

принимает участие внутренняя сигнальная система на основе восприятия гормона – гиббереллиновой кислоты. Данный гормон индуцирует деградацию белков семейства DELLA-репрессоров *SOC1* и *LFY* (Schwechheimer, Willige, 2009) (см. рис. 1).

Также в этой системе существуют гены регуляции экспрессии репрессора цветения *FLC* (*Flowering Locus C*), оказывающего супрессирующий эффект на *SOC1*. К ним относятся усиливающие экспрессию *FLC* гены модификаторов хроматина и сигнального пути *FRI* (*FRIGIDA*), а также подавляющие *FLC* гены автономного пути и яровизации – реакции на низкую температуру (Michaels, Amasino 1999; Levy et al., 2002; Yu et al., 2004; Farrona et al., 2008; Li et al., 2008; Michaels, 2008). Однако у подсолнечника ортологи этих генов, включая *FLC*, пока не найдены (см. рис. 1).

По результатам картирования 30 генов, гомологичных известным генам цветения арабидопсиса, 18 колокализовались с ранее установленными QTL подсолнечника, контролирующими этот признак (Blackman et al., 2011). В популяции, полученной от скрещивания контрастных по реакции

P-значения генов-кандидатов, контролирующих время цветения у подсолнечника, по результатам MLHKA-тестирования (Blackman et al., 2011)

P-values of candidate genes that control flowering time in sunflower, according to the results of MLHKA test (Blackman et al., 2011)

| Ген | Хромосома | Элита | Ландрасы | Ди́кари | Время отбора ^а |
|------------------------------------|-----------|----------|----------|---------|---------------------------|
| <i>HaFT1</i> | 6 | 0.014* | 0.045* | 0.468 | Доместикация |
| <i>HaFT2</i> | 6 | 0.001*** | 0.123 | 0.895 | Улучшение |
| <i>HaFT3</i> | 6 | 0.001*** | 0.086 | 0.475 | Улучшение |
| <i>HaFT4</i> | 14 | 0.001** | 0.122 | 0.728 | Улучшение |
| <i>HaCOL1</i> | 9 | 0.906 | 0.839 | 0.961 | Улучшение |
| <i>HaCOL2</i> | 14 | 0.330 | 0.533 | 0.944 | – |
| <i>HaCDFL1</i> | 7 | 0.909 | 0.922 | 0.616 | – |
| <i>HaPHYB</i> | 1 | 0.075 | 0.876 | 0.764 | – |
| <i>HaTFL1</i> | 7 | 0.001*** | 0.103 | 0.914 | – |
| <i>HaSOC1</i> | 6 | 0.841 | 0.914 | 0.931 | Улучшение |
| <i>HAM75 (AP1)</i> | 8 | 0.813 | 0.548 | 0.737 | – |
| <i>HaLFY</i> | 9 | 0.495 | 0.480 | 0.758 | – |
| <i>HaDELLA2</i> | 17 | 0.909 | 0.968 | 0.859 | – |
| 7 референсных локусов ^б | | 0.517 | 0.600 | 0.207 | – |

^а Определено на основе интерпретации значений *p*, полученных в MLHKA-тесте. Доместикация – начальный этап селекции; улучшение – последующие этапы. ^б *P*-значения для референсных, нейтральных локусов

* *p* < 0.05, ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001

на фотопериод образцов, теми же авторами проведен анализ ковариации уровня экспрессии генов-кандидатов и полиморфизма белковых последовательностей. В результате число генов-кандидатов было сокращено до 13. Проведенный далее тест MLHKA (Maximum Likelihood ratio Hudson–Kreitman–Aguade) позволил оценить вероятность модели нейтральной эволюции генов относительно селективной модели. Пять из 13 тестированных генов, относящиеся к семейству *FT-TFL1*, продемонстрировали значения, подтверждающие селективную модель (табл. 1). Таким образом, указанные гены являются наиболее перспективными для селекции по признаку времени цветения у подсолнечника.

Роль *FT-TFL1*-генов в регуляции времени цветения у подсолнечника

Основной, контролирующей время цветения ген *FT* представлен у подсолнечника в виде четырех паралогов, возникших в результате относительно недавних дупликаций (Blackman et al., 2010). Паралоги *HaFT1-3* находятся в одном QTL на 6-й хромосоме, который отвечает за 36 % вариации данного количественного признака (Burke et al., 2002; Wills, Burke 2007; Vaasck et al., 2008). Ген *HaFT4* картирован на хромосоме 14. Только два паралога, *HaFT2* и *HaFT4*, экспрессируются в листьях и активируют цветение, тогда как *HaFT3* является псевдогеном, а *HaFT1* экспрессируется в апикальную меристему побега и у культурного подсолнечника выполняет роль репрессора цветения или антифлоригена. Эта роль возникла в результате мутации сдвига рамки считывания в 3-м экзоне, что привело к увеличению длины кодируемого белка на 17 аминокислот (аллель *HaFT1-D*). В исследованиях показано, что данный аллель, по-видимому, появился еще у дикого подсолнечника и в ходе ранней доместикации был отобран в определенных географических зонах Северной Америки,

где он обуславливал более позднее цветение по сравнению с дикими формами, содержащими нативный аллель *HaFT1*. Между *HaFT1-D* и другими активными паралогами существуют сложные взаимоотношения, которые установлены с помощью теста на комплементацию. Для этого скрещивали трансгенные растения арабидопсиса, содержащие высоко экспрессирующиеся паралоги *HaFT*, с мутантными по *FT* растениями того же вида. В результате показано, что сверхэкспрессия *HaFT4* комплементирует мутантный фенотип и ускоряет цветение, а совместная сверхэкспрессия аллеля *HaFT1-D* и *HaFT4* обуславливает более позднее цветение у мутантов *ft*, то есть аллель *HaFT1-D* подавляет действие *HaFT4* (Blackman et al., 2010). Интересно, что в аналогичном эксперименте влияния *HaFT1-D* на другой активный ген, *HaFT2*, не обнаружено, хотя последний имеет сходную с *HaFT4* функцию. Следует также отметить, что эпистатическое влияние *HaFT1-D* на *HaFT4* проявляется только в индуктивных для *HaFT2*/*HaFT4* условиях, то есть при длинном световом дне. Аллель *HaFT1-D* функционально близка гомологу гена *FT* арабидопсиса – *TFL1* (*TERMINAL FLOWER 1*), также выполняющему функцию антифлоригена (Hanzawa et al., 2005; Wigge et al., 2005; Ahn et al., 2006). *FT-TFL1*-подобные белки описаны у разных покрытосеменных растений, при этом их противоположные роли обусловлены заменами аминокислот в определенных консервативных позициях белка (Pin et al., 2010; Harig et al., 2012; Wickland, Hanzawa, 2015). В основе механизма действия *TFL1* лежит возможность замещения им *FT*-белка в составе FAC, в результате чего ослабляется действие этого комплекса на гены, необходимые для закладки флоральных меристем (Zhu et al., 2020). Возникающие в ходе эволюции мутации в генах *FT-TFL1* закреплялись отбором, что обеспечивало их скоординированное действие при адаптации к конкретным условиям внешней среды и отразилось на разнообразии сроков цветения.

На хромосоме 7 генома подсолнечника в качестве минорного QTL была картирована последовательность антифлоригена *TFL1* арабидопсиса (Burke et al., 2002; Wills, Burke 2007). В составе данного локуса идентифицирован ген, принадлежащий семейству *INDETERMINATE1/EARLY HEADING DATE2 (ID1/Ehd2)*. Представители этого семейства кодируют содержащий «цинковый палец» транскрипционный фактор и являются специфичными для однодольных регуляторами гена *FT* (Matsubara et al., 2008). По-видимому, семейство *ID1/Ehd2* развивалось независимо у дву- и однодольных, поскольку прямых ортологов этого гена у двудольного арабидопсиса не обнаружено (Colasanti et al., 2006). Таким образом, пока нельзя утверждать, что указанный ген действительно является антифлоригеном *TFL1* у *H. annuus*.

Гены *CONSTANS*

Функция *CO* заключается в передаче сигнала от генов циркадного ритма и восприятия света гену-интегратору *FT* (см. выше). Этот блок генов консервативен для всех высших растений, но результаты их взаимодействия различаются. У таких растений, как подсолнечник и арабидопсис, ген *CO* активирует экспрессию *FT* в условиях длинного дня, тогда как у растений короткого дня, например у риса, *CO* является репрессором *FT* в тех же условиях (Valverde, 2011). Ген *CO* экспрессируется в тканях листа в зависимости от циркадного ритма, при этом уровень экспрессии колеблется в течение суток: в начале дня он минимален, затем растет, достигая максимума к вечеру, после чего вновь снижается. На рисунке 2 представлены белковые продукты генов, оказывающие влияние на экспрессию *CO*. Регуляция транскрипции *CO* происходит с участием белков *GI* (*Gigantea*) и *FKF1* (*Flavin-binding Kelch repeat F-box 1*). Белок *FKF1* содержит домен, который активируется под воздействием синего света, что стимулирует образование комплекса *FKF1-GI*. При длинном дне регулируемая циркадным ритмом экспрессия *FKF1* и *GI* синхронно достигает пика и взаимодействие этих белков способствует накоплению комплекса *FKF1-GI* в дневное время. Указанный комплекс связывается с промотором *CO*, с которым также связан репрессор транскрипции – белок *CDF1* (*Cycling Dof Factor 1*). При этом под действием *FKF1* происходит деградация *CDF1*, что приводит к индукции транскрипции *CO*, пик которой наблюдается ближе к концу дня. При коротком дне экспрессия *FKF1* достигает пика в темноте, несинхронно с *GI*, таким образом что количества образующегося комплекса недостаточно для деградации *CDF1* и деблокирования транскрипции *CO* (Imaizumi et al., 2005; Sawa et al., 2007). На накопление продукта гена *CO* также влияет скорость его протеолитического гидролиза с участием белка *COP1* (*Constitutive Photomorphogenic 1*); на свету имеет место опосредованное криптохромами подавление активности *COP1*, что значительно снижает скорость гидролиза. Таким образом, накопление белка *CO* наблюдается при длинном фотопериоде, когда пик суточного колебания экспрессии *CO* приходится на светлое время суток (см. рис. 2).

Гены семейства *CO* впервые обнаружены у арабидопсиса с помощью индуцированного мутагенеза, который позволил получить множество мутантов, отличающихся по

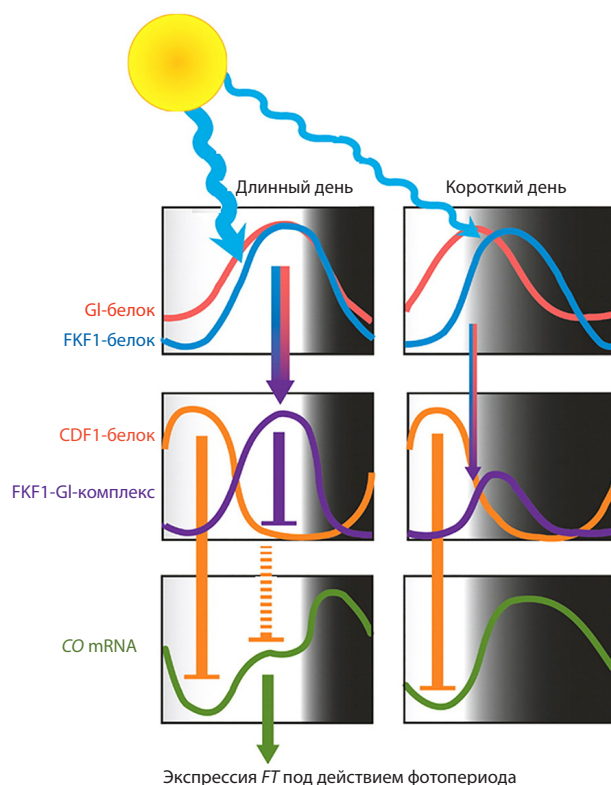


Рис. 2. Регуляция транскрипции гена *CO* в зависимости от фотопериода (Sawa et al., 2007)

Fig. 2. Regulation of *CO* gene transcription depending on photoperiod (Sawa et al., 2007)

реакции на фотопериод (Redei, 1962). Среди них были мутанты, названные *constans* (от лат. постоянный), поскольку они поздно зацветали при длинном дне и не реагировали на короткий, демонстрируя независимость цветения от фотопериода. В дальнейшем из такого мутанта выделен соответствующий ген и изучена его структура. Ген *CO* кодирует транскрипционный фактор, который встречается только у растений и содержит три домена: домен В, отвечающий за взаимодействие с другими белками, ССТ-домен (сигнал ядерной локализации) и ДНК-связывающий домен «цинковые пальцы» (Putterill et al., 1995). Последний отвечает за связывание с промотором гена *FT*. В отличие от растений дикого типа у мутантов *co* экспрессия гена *FT* не усиливается с увеличением фотопериода, что с большой вероятностью связано с мутациями в составе ДНК-связывающего или В-доменов *CO* (Kardailsky et al., 1999).

CO-подобные (*COL*) последовательности были обнаружены в большом числе копий в геномах большинства высших растений (Griffiths et al., 2003). Двадцать два *COL*-гена недавно идентифицированы в составе 10 хромосом подсолнечника (Niu et al., 2022). Филогенетический анализ этих генов показал, что в процессе эволюции они дивергировали на три группы, различающиеся по представленности у одно- и двудольных растений. Эти и другие данные указывают на интенсивный процесс неофункционализации, затрагивающий данное семейство, и, по-видимому, только небольшая часть этих генов сохранила исходную функцию, связанную

с реакцией на фотопериод, а преобладающая часть приобрела новые, в частности обеспечивающие защиту от абиотического стресса (Niu et al., 2022).

Ранее продемонстрировано, что гены *HaCOL1-2* могут быть выбраны в качестве кандидатов для селекции подсолнечника по признаку «время цветения», поскольку они демонстрировали полиморфизм белковых последовательностей в геномах линий, различающихся реакцией на фотопериод (Blackman et al., 2011). Однако требуются дальнейшие исследования для доказательства участия этих генов в определении данного признака. Такие доказательства для генов *COL* уже получены у большого числа видов, включая рис (Tan et al., 2016), ячмень (Kikuchi et al., 2012), томат (Yang et al., 2020) и сою (Wu et al., 2014).

Другие генетические локусы, контролирующие время цветения

В одной из первых работ по картированию рассматриваемого признака у подсолнечника сообщалось о 10 QTL, включая 5 аддитивных (на хромосомах 1, 6, 8 и два QTL на хромосоме 9), три доминантных (на хромосомах 8 и 17) и 2 частично рецессивных (хромосомы 4 и 7) (Burke et al., 2002). Z. Lai и коллеги (2005) картировали на хромосоме 8 локус HT160, в составе которого выявлен ген, кодирующий APETALA2-подобный белок. В работе 2007 г. по двуродительскому картированию установлены QTL на хромосомах 6, 7 и 15, причем последний локус не был идентифицирован в других работах и отвечал за 46.9 % вариации по сроку цветения (Wills, Burke, 2007). Наиболее близок к этому локусу SSR-маркер ORS687. Чуть позже идентифицированы 5 генов-кандидатов в ранее установленном интервале на хромосоме 7 (Charman et al., 2008). Два из них, *c1921* и *c2588*, были гомологичны Dof-подобному и ID1/Ehd2 (TFL1) белкам соответственно, каждый из которых вовлечен в регуляцию процесса цветения у других видов (Imaizumi et al., 2005; Colasanti et al., 2006). E.J. Vaasck и коллеги (2008) картировали QTL на хромосомах 6, 9 и 14 по результатам возделывания двуродительской картирующей популяции в двух различных регионах США. При этом локус на хромосоме 9 совпал с ранее выявленным в работе под руководством J.M. Burke (2002). J.M. Dechaine с коллегами (2009) добавили в генетическую карту подсолнечника новые QTL на хромосомах 1, 6, 7, 8, 14, которые отвечают за 6–22 % изменчивости по данному признаку.

В основополагающей работе исследовательской группы во главе с В.К. Blackman (2011) идентифицирован ряд генов, которые могут контролировать длину вегетации у подсолнечника в зависимости от фотопериода (см. табл. 1). Так, уровень экспрессии генов *HaCDFL1*, *HaPHYB* и *HaDELLA2* был выше в индуктивных условиях у линии CMSHA89, чувствительной к длинному фотопериоду, по сравнению с нечувствительным образцом дикого подсолнечника Ann1238. Ген *HaLFY* также демонстрировал раннюю экспрессию у CMSHA89 на длинном дне, хотя более ранняя его экспрессия наблюдалась и у Ann1238 на коротком дне. Экспрессия гена *HaSOC1* различается в листьях и апикальной меристеме побега. При этом были установлены противоположные паттерны экспрессии в обоих образцах подсолнечника на

коротком и длинном дне. Экспрессия *HaSOC1* в апикальной меристеме побега линии CMSHA89 наблюдалась раньше, чем у Ann1238, при этом в функциональном К-домене гена первой линии обнаружена несинонимичная замена. Противоположные паттерны экспрессии у указанных образцов были характерны и для генов *HaFT1*, *HaFT2* и *HaFT4*, которые служат наилучшими кандидатами для маркерной селекции по времени цветения (см. выше). Следует еще раз отметить, что установленная В.К. Blackman с коллегами (2011) локализация генов *HaFT1-3* совпадает с мажорным QTL на 6-й хромосоме, выявленным в других работах (Burke et al., 2002; Wills, Burke, 2007; Corbi et al., 2018).

С появлением ассоциативного картирования (Genome-Wide Association Study; GWAS) значительно расширились возможности для локализации QTL, отвечающих за те или иные количественные признаки. Так, J.R. Mandel и коллеги (2013) с использованием 10K SNP-чипа (10,000 SNP) нашли достоверную ассоциацию времени цветения с 10 локусами, расположенными на 8 хромосомах, в том числе новые QTL на хромосомах 1, 3, 4, 10, 12, 13. Годом позже те же авторы (Mandel et al., 2014) с применением MLNKA-теста для поиска генов-кандидатов выявили ряд генов с наибольшим индексом селективной эволюции, в том числе ранее обсуждаемый в работе В.К. Blackman с коллегами (2011) ген фитохрома В (*HaPHYB*). Данный ген играет важную роль в восприятии света и фотопериодическом контроле перехода вегетативной стадии развития в генеративную (Filiault et al., 2008; Neff, 2012) (см. рис. 1). Позже команда G.J. Baute (2015) идентифицировала два гена на хромосомах 1 и 10, один из которых гомологичен репрессору транскрипции гена *CO* (см. выше) – *HaCDF1*, также ранее упомянутому группой авторов во главе с В.К. Blackman (2011) в качестве гена-кандидата.

E. Cadic и коллеги (2013) с помощью GWAS идентифицировали 11 локусов на 10 хромосомах, контролирующих время цветения подсолнечника. Из них было выбрано несколько генов-кандидатов, функциональная связь которых с изучаемым признаком установлена ранее. Один из этих кандидатов, локализованный на хромосоме 5, ортологичен гену *B5H* арабидопсиса, который вместе с *SWI3B* принимает участие в эпигенетической регуляции репрессора цветения *FLC* (Sarnowski et al., 2002). Другой ген-кандидат на 10-й хромосоме гомологичен гену *GID1B*, кодирующему рецептор гиббереллина у арабидопсиса. Этот рецептор связывается с белками DELLA, что приводит к конформационным изменениям последних и делает их доступными для протеасом, осуществляющих деградацию белков. Гиббереллиновый каскад регулирует время цветения арабидопсиса, как было описано выше (см. рис. 1). Показано, что генетическая вариация в составе данного пути объясняет различия сроков цветения у кукурузы (Andersen et al., 2005) и предположительно у рапса (Raman et al., 2012).

В работе F. Vonnafous и коллег (2018) проведено сравнение пяти моделей GWAS для выявления геномных областей, контролирующих сроки цветения гибридов подсолнечника. С помощью 4 моделей из 5 выявлен наиболее интересный QTL на хромосоме 9, в котором сконцентрированы 5 SNP, влияющие на время цветения. Этот локус находится вблизи

гена *GAI*, который участвует в гиббереллиновом пути регуляции цветения (Wilson, Somerville, 1995). Однако связь указанных SNP с геном *GAI* пока не установлена.

Наконец, в ходе секвенирования 72 образцов подсолнечника, различающихся по сроку цветения, было идентифицировано 270 генов, в разной степени контролирующих этот признак (Badouin et al., 2018). Продемонстрированный в этой работе интегративный подход, включающий полногеномное секвенирование, GWAS и анализ генных сетей, позволил обнаружить новые гены-кандидаты, в том числе *AGL24* (*AGAMOUS-LIKE 24*), принимающий участие в регуляции генов идентичности меристем (Yu et al., 2004). Полученные авторами данные показывают многофакторность детерминации времени цветения у подсолнечника, при этом сложность этой системыкратно увеличивается за счет наличия большого числа дублированных копий генов. Последнее обстоятельство необходимо учитывать при разработке молекулярных маркеров для селекции указанной культуры.

Заключение

Время цветения подсолнечника контролируется большим числом генов, преобладающая часть которых ранее охарактеризована у модельного объекта – арабидопсиса. Это в первую очередь гены реакции на фотопериод, включая интегратор *CO*, гены гиббереллинового сигнального пути, идентичности цветковых меристем. Отдельно стоит отметить центральный ген-интегратор *FT*, представленный у подсолнечника в виде четырех паралогов, три из которых находятся в одном локусе QTL, отвечающем за значительную часть вариации по сроку цветения. За контроль этой вариации у domesticiрованных форм отвечает пара паралогов – *HaFT1* и *HaFT4*, при этом последний ген является активатором цветения (флоригеном), а первый – репрессором (антифлоригеном), возникшим в результате мутации *FT*-белка у дикого подсолнечника и отобранным при доместикации. Помимо этих генов картировано большое количество других генов и QTL, контролирующих указанный признак. Однако использованию этих генов в качестве мишеней для маркер-ориентированной селекции препятствуют наличие множества копий, возникших в ходе древних событий полиплоидизации, а также недостаточная изученность ассоциации генетических полиморфизмов со временем цветения в различных географических регионах. Последнее особенно актуально для РФ, в которой требуется создание более приспособленных к холодному климату сортов этой важной сельскохозяйственной культуры.

Список литературы / References

Векленко В.И. Мировые тенденции и прогноз производства семян подсолнечника. *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии*. 2022;1:121-128 [Veklenko V.I. Global trends and forecast of seed production sunflower seeds. *Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy*. 2022;1:121-128 (in Russian)]

Лебедева М.А., Додуева И.Е., Ганчева М.С., Творогова В.Е., Кузнецова К.А., Лутова Л.А. Эволюционные аспекты регуляции цветения: «флоригены» и «антифлоригены». *Генетика*. 2020;56(11):1279-1303. DOI 10.31857/S0016675820110065

[Lebedeva M.A., Dodueva I.E., Gancheva M.S., Tvorogova V.E., Kuznetsova K.A., Lutova L.A. The evolutionary aspects of flowering control: florigens and anti-florigens. *Rus. J. Genet.* 2020;56(11):1323-1344. DOI 10.1134/S102279542011006X]

Лошкормойников В.И. Исходный материал для селекции гибридов подсолнечника в Западно-Сибирском регионе. Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Тюмень, 2013 [Loskomoinikov V.I. Source material for the selection of sunflower hybrids in the West Siberian region. Cand. Sci. (Biol.) Dissertation. Tyumen, 2013 (in Russian)]

Лукомец В.М., Зеленцов С.В., Кривошлыков К.М. Перспективы и резервы расширения производства масличных культур в Российской Федерации. *Масличные культуры*. 2015;4(164):81-102 [Lukomets V.M., Zelentsov S.V., Krivoshlykov K.M. Prospects and reserves for expanding the production of oilseeds in the Russian Federation. *Maslichnyye Kultury = Oilseeds*. 2015;4(164):81-102 (in Russian)]

Пузиков А.Н., Суворова Ю.Н. Перспективы селекции подсолнечника на Сибирской опытной станции ВНИИМК. *Земледелие*. 2001;6:11-12 [Puzikov A.N., Suvorova Yu.N. Prospects for sunflower breeding at the Siberian Experimental Station VNIIMK. *Zemledelie = Agriculture*. 2001;6:11-12 (in Russian)]

Andersen J.R., Schrag T., Melchinger A.E., Zein I., Lubberstedt T. Validation of Dwarf8 polymorphisms associated with flowering time in elite European inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(2):206-217. DOI 10.1007/s00122-005-1996-6

Ahn J., Miller D., Winter V.J., Banfield M.J., Lee J.H., Yoo S.Y., Henz S., Brady R.L., Weigel D. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J.* 2006;25(3):605-614. DOI 10.1038/sj.emboj.7600950

Baack E.J., Sapir Y., Chapman M.A., Burke J.M., Rieseberg L.H. Selection on domestication traits and quantitative trait loci in crop-wild sunflower hybrids. *Mol. Ecol.* 2008;17(2):666-677. DOI 10.1111/j.1365-294X.2007.03596.x

Badouin H., Gouzy J., Grassa C.J., Murat F., Staton S.E., Cottret L., Lelandais-Brière C., ... Mangin B., Burke J.M., Salse J., Muñoz S., Vincourt P., Rieseberg L.H., Langlade N.B. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature*. 2017;546(7656):148-152. DOI 10.1038/nature22380

Barker M.S., Kane N.C., Matvienko M., Kozik A., Michelmore R.W., Knapp S.J., Rieseberg L.H. Multiple paleopolyploidizations during the evolution of the Compositae reveal parallel patterns of duplicate gene retention after millions of years. *Mol. Biol. Evol.* 2008;25(11):2445-2455. DOI 10.1093/molbev/msn187

Baute G.J., Kane N.C., Grassa C.J., Lai Z., Rieseberg L.H. Genome scans reveal candidate domestication and improvement genes in cultivated sunflower, as well as post-domestication introgression with wild relatives. *New Phytol.* 2015;206(2):830-838. DOI 10.1111/nph.13255

Blackman B.K. Interacting duplications, fluctuating selection, and convergence: The complex dynamics of flowering time evolution during sunflower domestication. *J. Exp. Botany*. 2013;64(2):421-431. DOI 10.1093/jxb/ers359

Blackman B.K., Strasburg J.L., Raduski A.R., Michaels S.D., Rieseberg L.H. The role of recently derived *FT* paralogs in sunflower domestication. *Curr. Biol.* 2010;20(7):629-635. DOI 10.1016/j.cub.2010.01.059

Blackman B.K., Rasmussen D.A., Strasburg J.L., Raduski A.R., Burke J.M., Knapp S.J., Michaels S.D., Rieseberg L.H. Contributions of flowering time genes to sunflower domestication and improvement. *Genetics*. 2011;187(1):271-287. DOI 10.1534/genetics.110.121327

Bonnafous F., Fievet G., Blanchet N., Boniface M.C., Carrère S., Gouzy J., Legrand L., Marage G., Bret-Mestries E., Munos S., Pouilly N., Vincourt P., Langlade N., Mangin B. Comparison of GWAS models to identify non-additive genetic control of flowering time in sunflower hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131(2):319-332. DOI 10.1007/s00122-017-3003-4

Burke J.M., Tang S., Knapp S.J., Rieseberg L.H. Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics*. 2002;161(3):1257-1267. DOI 10.1093/genetics/161.3.1257

Cadic E., Coque M., Vear F., Grezes-Besset B., Pauquet J., Piquemal J., Lippi Y., Blanchard P., Romestant M., Pouilly N., Rengel D., Gouzy J., Langlade N., Mangin B., Vincourt P. Combined linkage and associa-

- tion mapping of flowering time in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(5):1337-56. DOI 10.1007/s00122-013-2056-2
- Chapman M.A., Pashley C.H., Wenzler J., Hvala J., Tang S., Knapp S.J., Burke J.M. A genomic scan for selection reveals candidates for genes involved in the evolution of cultivated sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Cell.* 2008;20(11):2931-2945. DOI 10.1105/tpc.108.059808
- Corbi J., Baack E.J., Dechaine J.M., Seiler G., Burke J.M. Genome-wide analysis of allele frequency change in sunflower crop-wild hybrid populations evolving under natural conditions. *Mol. Ecol.* 2018;27(1):233-247. DOI 10.1111/mec.14202
- Colasanti J., Tremblay R., Wong A.Y., Coneva V., Kozaki A., Mable B.K. The maize *INDETERMINATE1* flowering time regulator defines a highly conserved zinc finger protein family in higher plants. *BMC Genomics.* 2006;7:158. DOI 10.1186/1471-2164-7-158
- Collani S., Neumann M., Yant L., Schmid M. *FT* modulates genome-wide DNA-binding of the bZIP transcription factor FD. *Plant Physiol.* 2019;180(1):367-380. DOI 10.1104/pp.18.01505
- Dechaine J.M., Burger J.C., Chapman M.A., Seiler G.J., Brunick R., Knapp S.J., Burke J.M. Fitness effects and genetic architecture of plant-herbivore interactions in sunflower crop-wild hybrids. *New Phytol.* 2009;184(4):828-841. DOI 10.1111/j.1469-8137.2009.02964.x
- Farrona S., Coupland G., Turck F. The impact of chromatin regulation on the floral transition. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008;19(6):560-573. DOI 10.1016/j.semcdb.2008.07.015
- Filiault D.L., Wessinger C.A., Dinneny J.R., Maloof J.N. Amino acid polymorphisms in *Arabidopsis* phytochrome B cause differential responses to light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(8):3157-3162. DOI 10.1073/pnas.0712174105
- Goyne P.J., Schneiter A.A. Temperature and photoperiod interactions with the phenological development of sunflower. *Agron. J.* 1988;80(5):777-784. DOI 10.2134/agronj1988.00021962008000050017x
- Goyne P.J., Schneiter A.A., Cleary K.C., Creelman R.A., Stegmeier W.D., Wooding F.J. Sunflower genotype response to photoperiod and temperature in field environments. *Agron. J.* 1989;81(5):826-831. DOI 10.2134/agronj1989.00021962008100050025x
- Griffiths S., Dunford R.P., Coupland G., Laurie D.A. The evolution of *CONSTANS*-like gene families in barley, rice, and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2003;131(4):1855-1867. DOI 10.1104/pp.102.016188
- Hanzawa Y., Money T., Bradley D. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(21):7748-7753. DOI 10.1073/pnas.0500932102
- Harif L., Beinecke F.A., Oltmanns J., Muth J., Müller O., Rüping B., Twyman R.M., Fischer R., Prüfer D., Noll G.A. Proteins from the *FLOWERING LOCUS T*-like subclade of the PEBP family act antagonistically to regulate floral initiation in tobacco. *Plant J.* 2012;72(6):908-921. DOI 10.1111/j.1365-3113.2012.05125.x
- Heiser C.B. The sunflower among the North American Indians. *Proc. Am. Philos. Soc.* 1951;95(4):432-448
- Heiser C.B. Variation and subspeciation in the common sunflower, *Helianthus annuus*. *Am. Midl. Nat.* 1954;51(1):287-305. DOI 10.2307/2422222
- Imaizumi T., Schultz T.F., Harmon F.G., Ho L.A., Kay S.A. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Science.* 2005;309(5732):293-297. DOI 10.1126/science.1110586
- Kardailsky I., Shukla V.K., Ahn J.H., Dagenais N., Christensen S.K., Nguyen J.T., Chory J., Harrison M.J., Weigel D. Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science.* 1999;286(5446):1962-1965. DOI 10.1126/science.286.5446.1962
- Kikuchi R., Kawahigashi H., Oshima M., Ando T., Handa H. The differential expression of *HvCO9*, a member of the *CONSTANS*-like gene family, contributes to the control of flowering under short-day conditions in barley. *J. Exp. Bot.* 2012;63(2):773-784. DOI 10.1093/jxb/err299
- Lai Z., Livingstone K., Zou Y., Church S.A., Knapp S.J., Andrews J., Riesberg L.H. Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(8):1532-1544. DOI 10.1007/s00122-005-0082-4
- Levy Y.Y., Mesnage S., Mylne J.S., Gendall A.R., Dean C. Multiple roles of *Arabidopsis VRN1* in vernalization and flowering time control. *Science.* 2002;297(5579):243-246. DOI 10.1126/science.1072147
- Li D., Liu C., Shen L., Wu Y., Chen H., Robertson M., Helliwell C.A., Ito T., Meyerowitz E., Yu H. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Dev. Cell.* 2008;15(1):110-120. DOI 10.1016/j.devcel.2008.05.002
- Mandel J.R., Nambeesan S., Bowers J.E., Marek L.F., Ebert D., Riesberg L.H., Knapp S.J., Burke J.M. Association mapping and the genomic consequences of selection in sunflower. *PLoS Genet.* 2013;9(3):e1003378. DOI 10.1371/journal.pgen.1003378
- Mandel J.R., McAssey E.V., Nambeesan S., Garcia-Navarro E., Burke J.M. Molecular evolution of candidate genes for crop-related traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *PLoS One.* 2014;9(6):e99620. DOI 10.1371/journal.pone.0099620
- Matsubara K., Yamanouchi U., Wang Z.X., Minobe Y., Izawa T., Yano M. *Ehd2*, a rice ortholog of the maize *INDETERMINATE1* gene, promotes flowering by up-regulating *Ehd1*. *Plant Physiol.* 2008;148(3):1425-1435. DOI 10.1104/pp.108.125542
- Michaels S.D. Flowering time regulation produces much fruit. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008;12(1):75-80. DOI 10.1016/j.pbi.2008.09.005
- Michaels S.D., Amasino R.M. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell.* 1999;11(5):949-956. DOI 10.1105/tpc.11.5.949
- Neff M.M. Light-mediated seed germination: connecting phytochrome B to gibberellic acid. *Dev. Cell.* 2012;22(4):687-688. DOI 10.1016/j.devcel.2012.04.003
- Niu T., Wang X., Abbas M., Shen J., Liu R., Wang Z., Liu A. Expansion of *CONSTANS*-like genes in sunflower confers putative neofunctionalization in the adaptation to abiotic stresses. *Ind. Crops Prod.* 2022;176:114400. DOI 10.1016/j.indcrop.2021.114400
- Pin P.A., Benlloch R., Bonnet D., Wremerth-Weich E., Kraft T., Gielen J.J.L., Nilsson O. An antagonistic pair of *FT* homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. *Science.* 2010;330(6009):1397-1400. DOI 10.1126/science.1197004
- Putterill J., Varkonyi-Gasic E. *FT* and florigen long-distance flowering control in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2016;33:77-82. DOI 10.1016/j.pbi.2016.06.008
- Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R., Coupland G. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell.* 1995;80(6):847-857. DOI 10.1016/0092-8674(95)90288-0
- Raman H., Raman R., Eckermann P., Coombes N., Manoli S., Zou X., Edwards D., Meng J., Prangnell R., Stiller J., Batley J., Luckett D., Wratten N., Dennis E. Genetic and physical mapping of flowering time loci in canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2012;126(1):119132. DOI 10.1007/s00122-012-1966-8
- Redei G.P. Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics.* 1962;47(4):443-460. DOI 10.1093/genetics/47.4.443
- Sarnowski T.J., Swiez S., Pawlikowska K., Kaczanowski S., Jerzmanowski A. AtSWI3B, an *Arabidopsis* homolog of SWI3, a core subunit of yeast Swi/Snf chromatin remodeling complex, interacts with FCA, a regulator of flowering time. *Nucl. Acids. Res.* 2002;30(15):3412-3421. DOI 10.1093/nar/gkf458
- Sawa M., Nusinow D.A., Kay S.A., Imaizumi T. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for daylength measurement in *Arabidopsis*. *Science.* 2007;318(5848):261-265. DOI 10.1126/science.1146994
- Schwechheimer C., Willige B.C. Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009;12(1):57-62. DOI 10.1016/j.pbi.2008.09.004
- Tan J., Jin M., Wang J., Wu F., Sheng P., Cheng Z., Wang J., Zheng X., Chen L., Wang M., Zhu S., Guo X., Zhang X., Liu X., Wang C., Wang H., Wu C., Wan J. *OsCOL10*, a *CONSTANS*-like gene, functions as a flowering time repressor downstream of *Ghd7* in rice. *Plant Cell Physiol.* 2016;57(4):798-812. DOI 10.1093/pcp/pcw025
- Valverde F. *CONSTANS* and the evolutionary origin of photoperiodic timing of flowering. *J. Exp. Bot.* 2011;62(8):453-463. DOI 10.1093/jxb/erq449
- Wickland D.P., Hanzawa Y. The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* gene family: Functional evolution and molecular mechanisms. *Mol. Plant.* 2015;8(7):983-997. DOI 10.1016/j.molp.2015.01.007

- Wigge P.A., Kim M.C., Jaeger K.E., Busch W., Schmid M., Lohmann J.U., Weigel D. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*. 2005;309(5737):1056-1059. DOI 10.1126/science.1114358
- Wills D.M., Burke J.M. Quantitative trait locus analysis of the early domestication of sunflower. *Genetics*. 2007;176(4):2589-2599. DOI 10.1534/genetics.107.075333
- Wilson R.N., Somerville C.R. Phenotypic suppression of the gibberellin-insensitive mutant (gai) of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 1995;108(2):495-502. DOI 10.1104/pp.108.2.495
- Wu F., Price B.W., Haider W., Seufferheld G., Nelson R., Hanzawa Y. Functional and evolutionary characterization of the *CONSTANS* gene family in short-day photoperiodic flowering in soybean. *PLoS One*. 2014;9(1):e85754. DOI 10.1371/journal.pone.0085754
- Yang T., He Y., Niu S., Yan S., Zhang Y. Identification and characterization of the *CONSTANS* (*CO*)/*CONSTANS*-like (*COL*) genes related to photoperiodic signaling and flowering in tomato. *Plant Sci*. 2020;301:110653. DOI 10.1016/j.plantsci.2020.110653
- Yu H., Ito T., Wellmer F., Meyerowitz E.M. Repression of *AGAMOUS-LIKE 24* is a crucial step in promoting flower development. *Nat. Genet*. 2004;36(2):157-161. DOI 10.1038/ng1286
- Zhu Y., Klasfeld S., Jeong C.W., Jin R., Goto K., Yamaguchi N., Wagner D. TERMINAL FLOWER 1-FD complex target genes and competition with FLOWERING LOCUS T. *Nat. Commun*. 2020;11(1):5118. DOI 10.1038/s41467-020-18782-1

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.08.2023. После доработки 09.11.2023. Принята к публикации 10.11.2023.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-25

Оригинальное исследование

Создание фиолетовозерных гибридов в отдаленных скрещиваниях тритикале, мягкой пшеницы и полбы методом эмбриокультуры *in vitro*

Н.В. Петраш , П.И. Стёпочкин

Аннотация: В настоящее время в селекционном процессе, связанном с получением отдаленных гибридов, широко применяют биотехнологические подходы. Проблему неразвития эндосперма и гибели зародыша на ранних стадиях эмбриогенеза у гибридных зерновок можно решить с помощью метода культуры ткани. В данной работе представлены результаты получения гибридов в прямых и обратных скрещиваниях гексаплоидной тритикале (сортов Орден, Садко, линии ДТ-43 и селекционной линии Сиарс), мягкой пшеницы-донора фиолетовой окраски зерна (линия i:S29^{PF}) и фиолетовозерной полбы (линии 27-3/17 и 31/16) с использованием метода эмбриокультуры *in vitro*. Этот способ позволил получить в общей сложности 41 растение F₁ из 114 выделенных эксплантов. Получены фертильные растения F₂ из комбинаций с донорами фиолетовой окраски зерна Орден × i:S29^{PF}, i:S29^{PF} × Орден и Садко × 27-3/17, которые в дальнейшем будут включены в селекционный процесс. Таким образом, биотехнологические подходы играют важную роль в создании исходного селекционного материала и преодолении несовместимости родительских форм в отдаленных скрещиваниях пшеницы с тритикале.

Ключевые слова: мягкая пшеница; тритикале; полба; отдаленная гибридизация; эмбриокультура; фиолетовая окраска зерна.

Для цитирования: Петраш Н.В., Стёпочкин П.И. Создание фиолетовозерных гибридов в отдаленных скрещиваниях тритикале, мягкой пшеницы и полбы методом эмбриокультуры *in vitro*. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):218-223. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-25

Благодарности: Работа поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0037.

Original article

Development of purple-grain hybrids in distant crosses of triticale, bread wheat and emmer using the embryo culture

N.V. Petrash , P.I. Stepochkin

Abstract: Currently, in the breeding process associated with obtaining distant hybrids, biotechnological technics are widely used. The problem of non-development of the endosperm and death of the embryo at the early stage of embryogenesis in hybrid caryopses can be solved using the method of tissue culture. This paper presents the results of obtaining hybrids in forward and back crosses of hexaploid triticale (cultivars Orden, Sadko, and lines DT-43, Siars), common wheat – the donor of anthocyanin grain color (line i:S29^{PF}) and anthocyanin grain emmer (lines 27-3/17 and 31/16) using the *in vitro* embryo culture method. Using this method, we obtained a total of 41 F₁ plants from 114 isolated explants. Fertile F₂ plants were obtained from the combinations with donors of purple grain color Order × i:S29^{PF}, i:S29^{PF} × Order and Sadko × 27-3/17. They will be included in the breeding process in the future. Thus, biotechnological technics are of great importance in creating initial breeding material and overcoming parental incompatibility in distant crosses wheat with triticale.

Key words: bread wheat; triticale; emmer; distant hybridization; embryoculture; purple grain.

Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия
Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

 pnv11@bionet.nsc.ru

 Петраш Н.В., Стёпочкин П.И., 2023

For citation: Petrash N.V., Stepochkin P.I. Development of purple-grain hybrids in distant crosses of triticale, bread wheat and emmer using the embryo culture. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(4):218-223. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-25 (in Russian)

Acknowledgements: This work was supported by Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, budget project No. FWNR-2022-0037.

Введение

Тритикале (*x Triticosecale* Wittmack) – искусственно созданный вид, сочетающий ценные свойства пшеницы и ржи и все чаще применяемый как продовольственная и кормовая культура. Основой селекционного процесса любой культуры служит расширение генетического разнообразия с целью выявления желаемых сочетаний признаков (Белан и др., 2021). Генетический потенциал отдельных видов по ряду хозяйственно ценных признаков уже в значительной степени исчерпан. Применение отдаленной гибридизации позволяет расширить генофонд исходного материала и дает возможность создания новых форм с уникальным сочетанием признаков. Опыт мировой селекционной практики показывает, что отдаленная гибридизация имеет важное значение для дальнейшего прогресса в селекции зерновых. Перспективным направлением обогащения пшеницы является создание сортов с повышенным содержанием антоцианов – веществ с высокой биологической активностью, которые повышают устойчивость растений к стрессам и положительно влияют на здоровье человека (Khoo et al., 2017).

Сложности создания отдаленных гибридов обусловлены барьерами несовместимости при скрещивании растений разных таксонов. В отдаленной гибридизации успех оплодотворения зависит от совместимости мужского и женского растения. Гибель образовавшегося в результате оплодотворения зародыша вызвана как нарушениями в клетках самого зародыша, так и отрицательным влиянием на его рост аномально развивающегося эндосперма и тканей зародышевого мешка. Как правило, это проявляется в нарушении формирования эндосперма или полном его отсутствии, что приводит к гибели зародыша. С целью преодоления постгамной несовместимости во многих экспериментах по созданию отдаленных гибридов растений успешно применяют метод культуры зародышей *in vitro*, или эмбриокультуры.

Эмбриокультуру широко используют как в фундаментальных (Kumlehn et al., 1998), так и прикладных (Котлярова и др., 2007; Дьячук и др., 2011; Бунцевич и др., 2014; Коваленко, Поливар, 2014) исследованиях. Эта технология особенно актуальна в спасении эмбрионов при отдаленных скрещиваниях в сельском хозяйстве и плодоводстве. Кроме того, культуру незрелых зародышей применяют в активно развивающемся направлении *speed breeding* (ускоренная селекция), когда гибридный зародыш в возрасте ~21 дня дает проросток на питательной среде, минуя созревание и период покоя (Haslam, Yeung, 2011; Zheng et al., 2013; Wang et al., 2021). Для эмбриокультуры в основном используют базовые питательные среды для культивирования клеток и тканей растений, такие как среды Уайта, Нитчей, Гамборга (B5), Мурасиге–Скуга.

Скрещивание гексаплоидной пшеницы ($2n = 6x = 42$, AABBDD) с гексаплоидной тритикале ($2n = 6x = 42$, AABBRR)

характеризуется постгамной несовместимостью с нарушением эбрио- и эндоспермогенеза (Гордей, 1992; Alikina et al., 2016). Семена лишены эндосперма, поэтому для получения проростков требуется обязательное культивирование зародышей на питательной среде *in vitro*. По данным В.Н. Акининой, завязываемость гибридных зерновок в скрещиваниях пшеницы с формами тритикале, при которых материнской формой служит мягкая пшеница, составляет 52%, однако жизнеспособность таких зародышей составляет всего 37.1% (Акинина и др., 2020). Метод эмбриокультуры помогает преодолеть постгамную несовместимость при создании межвидовых гибридов, тем самым позволяет сохранить генотип и расширить генетическое разнообразие исходного селекционного материала.

Цель представленной работы заключалась в создании исходного селекционного материала с фиолетовой окраской зерна в отдаленных скрещиваниях тритикале с мягкой пшеницей и полбой методом эмбриокультуры.

Материалы и методы

В отдаленную гибридизацию были включены образцы гексаплоидной тритикале (*x Triticosecale* Wittmack), фиолетовозерной полбы (*Triticum dicoccum* Schuebl [Schrank]) и мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Использованы сорта тритикале Орден, Садко и селекционные линии ДТ-43, Сиарс. Линии фиолетовозерной полбы 27-3/17 и 31/16 получены ранее на основе сложных скрещиваний сорта голозерной полбы Гремме, безостой полбы (к-25516, Чувашия, Россия) из мировой коллекции ВИР и эфиопской пшеницы *T. aethiopicum* Jakubz. (TRI 15744) – донора фиолетовой окраски перикарпа зерна из коллекции IPK (Gatersleben, Германия). Донором фиолетовой окраски также была мягкая пшеница i:S29Pp-D1Pp3^{PF} (сокращенно i:S29^{PF}). Изогенная линия пшеницы i:S29^{PF} имеет антоциановую окраску колеоптиле и перикарпа зерна (Gordeeva et al., 2020). Она получена на основе сорта Саратовская 29, донором служила селекционная линия Purple Feed (к-49426, Канада) (Arbuzova et al., 1998).

Гибридизацию проводили в полевых условиях. На 16–23-е сут после опыления завязавшиеся зерновки выделяли из колоса и предварительно стерилизовали в 70% спирте, затем в асептических условиях погружали в 1% раствор моющего средства с гипохлоритом натрия на 10 мин, после чего выполняли трехкратное промывание в стерильной дистиллированной воде. Выделение зародыша из зерновки проводили в стерильных условиях под стереоскопическим микроскопом «Альтами СМ0655» (ООО «Альтами», Россия). Зародыши инокулировали щитком вниз на питательную среду Гамборга (B5) (Gamborg, Eveleigh, 1968) с добавлением сахарозы и агара в концентрациях 30 и 5 г/л соответственно. В дальнейшем зародыши культивировали под освещением. Хорошо развитые растения вынимали из пробирок, тща-



Рис. 1. Зерновки пшеницы изогенной линии $i:S29^{PF}$ (слева) и гибридная зерновка $F_1 i:S29^{PF} \times$ гексаплоидная тритикале (справа)

Fig. 1. Wheat grains of the near isogenic line $i:S29^{PF}$ (left) and hybrid grains $F_1 i:S29^{PF} \times$ hexaploid triticale (right)

тельно отмывали корни от питательной среды, пересаживали в вегетационные сосуды с грунтом и выращивали до полной зрелости.

Результаты и обсуждение

Получение новых отдаленных гибридов тритикале с пшеницей и полбой обогащает генофонд новыми ценными признаками. Одним из таких признаков является антоциановая окраска зерна. Экспериментально подтверждено, что антоцианы и их метаболиты обладают антиоксидантными, противовоспалительными, гипогликемическими, антимутагенными, антидиабетическими, противораковыми и нейропротекторными свойствами, а также полезны для здоровья глаз (Юдина и др., 2021).

Семена отдаленных гибридов тритикале с донорами фиолетовой окраски зерна лишены эндосперма, поэтому требуется проводить спасение незрелых зародышей на питательных средах. Необходимость спасения зародышей подтвердилась при доведении до созревания гибридных зерновок $F_1 i:S29^{PF} \times$ гексаплоидная тритикале. Зерна щуплые, невыполненные, эндосперм отсутствует (рис. 1, справа). Такие зерновки не имеют всхожести, и генотип будет утрачен, тогда как материнская линия $i:S29^{PF}$ имеет выполненные всхожие семена (см. рис. 1, слева).

Проведены скрещивания по семи комбинациям, завязываемость зерновок варьировала от 18.2 до 76.0 % (таблица). Для получения регенерантов по прямому пути (проростки получают из экспланта-зародыша) на безгормональную питательную среду выкладывали зародыши на 16–23-й день после опыления. Согласно периодизации эмбриогенеза, предложенной Н.Н. Кругловой, такой зародыш сформирован и способен развиваться в нормальное растение на безгормональной питательной среде (Круглова, 2014, 2023). В настоящей работе при отдаленной гибридизации отмечено не только нарушение развития эндосперма, но и самого

зародыша. Многие гибридные зерновки имели оболочку, но не имели зародыша (рис. 2, а), либо зародыш развивался аномально и представлял собой небольшое скопление пролиферируемых клеток, которые в дальнейшем не развивались на питательной среде; такие зародыши не учитывали в опыте. В случае самоопыления зерновка пшеницы к 15–17-му дню развития имеет правильно развивающийся эндосперм и зародыш (см. рис. 2, в). Экспланты-зародыши, выделенные из зерновок без эндосперма, визуально выглядели как сформированные зародыши (см. рис. 2, б) и были перенесены на питательную среду.

На 2–10-й день культивирования в зависимости от степени автономности и сформированности выделенных эксплантов отмечено несколько вариантов развития: прорастание зародышей по типу зрелого зародыша с образованием проростка и корней, развитие одного корня, развитие листа без пазушных почек и отсутствие роста зародыша с его последующей дегенерацией. Жизнеспособными считали зародыши, которые формировали растение с побегом и корнем.

В таблице представлены результаты гибридизации образцов тритикале, пшеницы, полбы и культивирования незрелых зародышей на питательной среде *in vitro*. Завязываемость гибридных зерновок в скрещиваниях пшеницы и тритикале, при которых материнской формой служила мягкая пшеница, составила 60.4 %, в обратных – 22.8 %. Однако частота жизнеспособных зародышей в прямом скрещивании была ниже, составив 27.5 %, из которых удалось получить одно (12.5 %) растение, а в обратных скрещиваниях – 100 %, из которых получено 15 (83 %) растений. Эти результаты согласуются с данными, полученными при отдаленной гибридизации в трибе Triticeae О.А. Орловской и коллегами (2010).

В скрещивании тритикале на полбу формировались жизнеспособные зародыши с частотой 79.4 %, из которых 20 (74.1 %) развились в зеленые проростки. Отмечено, что

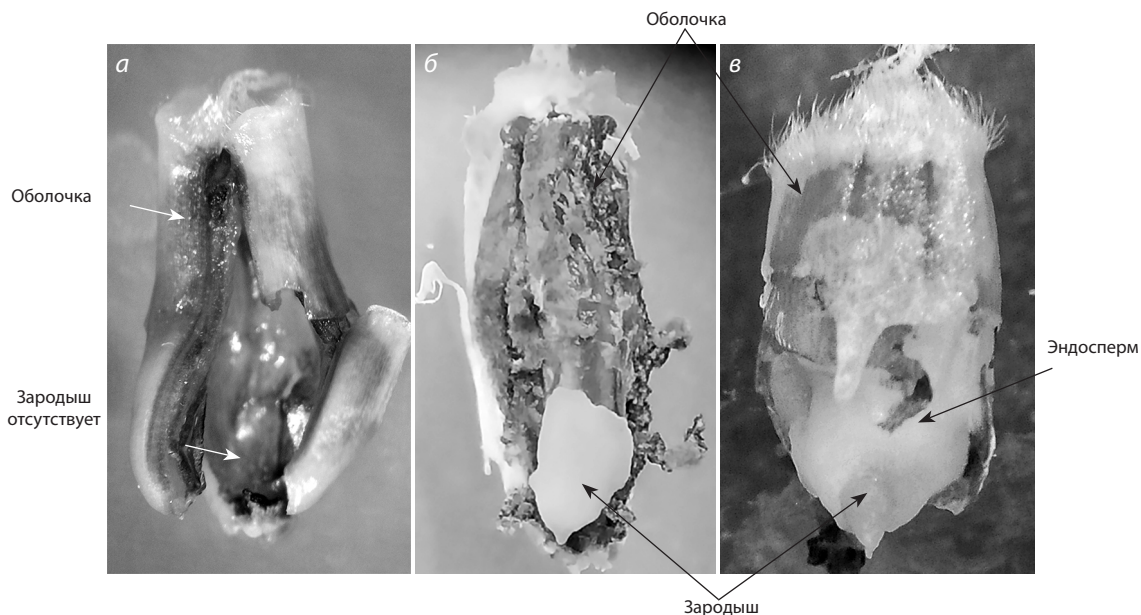


Рис. 2. Стереомикроскопические снимки развития зерновок и зародышей: *a, б* – гибридная зерновка (пшеницы × тритикале), 20-й день после опыления; *в* – зерновка пшеницы, 15–17-й день после самоопыления

Fig. 2. Stereomicroscopic images of the development of grains and embryos: *a, b* – hybrid grain (wheat × triticale), 20 days from pollination; *c* – wheat grains 15–17 days from self-pollination

Результаты гибридизации образцов тритикале, пшеницы, полбы и культивирования незрелых зародышей на питательной среде *in vitro*

Results of hybridization of samples of triticale, wheat, emmer and *in vitro* immature embryo culture

| Комбинация | Опылено цветков, шт. | Завязалось зерновок | | Сформировалось зародышей | | Получено растений F ₁ | | Получено фертильных растений, шт. | |
|---|-----------------------------|---------------------|-----|--------------------------|---------------|----------------------------------|----------------|-----------------------------------|------|
| | | шт. | % | шт. | % от зерновок | шт. | % от зародышей | | |
| <i>Triticosecale</i> × <i>T. aestivum</i> | Орден × i:S29 ^{PF} | 70 | 18 | 22.8 | 18 | 100.0* | 15 | 83.0* | 5 |
| <i>T. aestivum</i> × <i>Triticosecale</i> | i:S29 ^{PF} × Орден | 48 | 29 | 60.4 | 8 | 27.5 | 1 | 12.5 | 1 |
| <i>Triticosecale</i> × <i>T. dicoccum</i> | Садко × 27-3/17 | 96 | 34 | 35.4 | 27 | 79.4 | 20 | 74.1* | 1 |
| | 31/16 × Садко | 83 | 43 | 51.8 | 20 | 46.51 | 4 | 20.0 | 0 |
| <i>T. dicoccum</i> × <i>Triticosecale</i> | 27-3/17 × ДТ-43 | 66 | 12 | 18.2 | 7 | 58.3 | 1 | 14.28 | 0 |
| | 31/16 × Сиарс | 46 | 35 | 76.0* | 20 | 57.14 | 0 | 0 | 0 |
| | 27-3/17 × Сиарс | 132 | 40 | 30.3 | 14 | 35.0 | 0 | 0 | 0 |
| Всего | | 541 | 211 | 39.0 | 114 | 54.03 | 41 | 35.96 | 7 |
| Среднее значение | | | | 42.13 | | 57.69 | | 29.13 | 1.75 |
| Стандартное отклонение | | | | 21.24 | | 25.21 | | 34.65 | |

* Достоверное отличие от среднего значения

для комбинации «полба × тритикале» зародыши замирали на ранних стадиях эмбриогенеза и к моменту их переноса на среду являлись нежизнеспособными: из 61 зародыша только 5 развились в растения. В случае когда отцовской формой служила селекционная линия тритикале Сиарс, все зародыши были нежизнеспособными.

Дальнейшее выращивание растений F₁ показало, что основная часть колосьев были стерильны вследствие нарушений мейоза, вызванных взаимодействием разных геномов. Лишь у некоторых растений наблюдалась частичная фертильность, завязывалось от одного до трех зерен на колос. Из них в искусственных условиях получены фертиль-



Рис. 3. Колосья и зерно родительских форм и гибридов F_2 . Слева направо: тритикале сорта Орден, линия пшеницы $i:S29^{PF}$ и гибрид F_2 (Орден \times $i:S29^{PF}$)

Fig. 3. Ears and grains of parental forms and F_2 hybrids. From left to right: triticale variety Orden, wheat line $i:S29^{PF}$ and hybrid F_2 Orden \times $i:S29^{PF}$

ные растения F_2 (рис. 3). Колосья растений F_2 отличаются от родительских форм, колос типа мягкой пшеницы, более рыхлый, чем колос тритикале, имеет небольшие остевидные отrostki. Фиолетовая окраска зерна унаследована от линии пшеницы. В дальнейшем планируется проводить размножение и изучение полученных гибридов по элементам структуры урожая и качества зерна.

Выводы

Проведена отдаленная гибридизация, в которую были вовлечены тритикале, мягкая пшеница и полба. Завязываемость гибридных зерновок была наибольшей в комбинации «полба \times тритикале» (до 76 %), при которой материнской формой служила линия полбы 31/16, однако жизнеспособность зародышей была низкой. В скрещивании тритикале на полбу завязывалось меньше зерновок (35.4 %), но жизнеспособность зародышей была выше (74.1 %), чем в обратном скрещивании. В комбинации тритикале на пшеницу наблюдались низкая завязываемость зерновок (22.8 %) и высокая жизнеспособность зародышей (83 %), тогда как в обратном скрещивании завязываемость была выше (60.4 %), а жизнеспособность ниже (12.5 %). Использование метода эмбриокультуры (*in vitro*) позволило сохранить в общей сложности 41 растение F_1 из 114 выделенных эксплантов. Таким обра-

зом, биотехнологические подходы играют важную роль в создании исходного селекционного материала и преодолении постгамной несовместимости в отдаленных скрещиваниях мягкой пшеницы и полбы с тритикале.

Список литературы / References

- Акинина В.Н., Дьячук Т.И., Жилин С.В., Калашникова Э.В. Методы культуры ткани *in vitro* для создания исходного материала для селекции тритикале в Поволжье. *Зерновое хозяйство России*. 2020;1(67):64-68. DOI 10.31367/2079-8725-2020-67-1-64-68 [Akinina V.N., Diyachuk T.I., Zhilin S.V., Kalashnikova E.V. *In vitro* fabric culture methods to develop the initial material for triticale breeding in the Volga region. *Zernovoe Hozyaistvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2020;1(67):64-68. DOI 10.31367/2079-8725-2020-67-1-64-68 (in Russian)]
- Белан И.А., Россеева Л.П., Блохина Н.П., Григорьев Ю.П., Мухин Я.В., Трубачеева Н.В., Першина Л.А. Ресурсный потенциал сортов пшеницы мягкой яровой для условий Западной Сибири и Омской области (аналитический обзор). *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2021;22(4):449-465. DOI 10.30766/2072-9081.2021.22.4.449-465 [Belan I.A., Rosseeva L.P., Blokhina N.P., Grigoriev Yu.P., Mukhina Ya.V., Trubacheeva N.V., Pershina L.A. Resource potential of soft spring wheat varieties for the conditions of Western Siberia and Omsk region (analytical review). *Agrarnaya Nauka Euro-Severo-Vostoka = Agricultural Science Euro-North-East*. 2021;22(4):449-465. DOI 10.30766/2072-9081.2021.22.4.449-465 (in Russian)]
- Бунцевич Л.Л., Захарченко В.В., Беседина Е.Н., Костюк М.А. Эмбриокультура в селекции вишни и черешни. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2014;27(3):23-29

- [Buncevich L.L., Zaharchenko V.V., Besedina E.N., Kostyuk M.A. Embryoculture in cherry breeding. *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South Russia*. 2014;27(3):23-29 (in Russian)]
- Гордей И.А. Тритикале. Генетические основы создания. Минск: Наука и техника, 1992
[Gordej I.A. Triticale. Genetic basis of creation. Minsk: Nauka i Tekhnika Publ., 1992 (in Russian)]
- Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Акинина Н., Итальянская Ю.В., Сафронова Н.Ф., Медведева Л.П. Клеточные биотехнологии и создание материала для селекции тритикале. *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2011;(4):32-34
[Diyachuk T.I., Homyakova O.V., Akinina N., Italiyanskaya Yu.V., Safronova N.F., Medvedeva L.P. Cellular biotechnologies and production of material for triticale breeding. *Vestnik Rossijskoj Akademii Sel'skhozajstvennyh Nauk = Vestnik of the Russian Agricultural Science*. 2011;(4):32-34 (in Russian)]
- Коваленко Н.Н., Поливарова Н.В. Эмбриокультура в селекции косточковых плодовых и декоративных культур. *Субтропическое и декоративное садоводство*. 2014;(51):200-206
[Kovalenko N.N., Polivara N.V. Embryoculture in selection of stone fruit and ornamental crops. *Subtropicheskoe i Dekorativnoe Sadovodstvo*. 2014;(51):200-206 (in Russian)]
- Котлярова Е.Б., Жидкова Е.Н., Подвигина О.А. Применение методов *in vitro* для получения межвидовых и межродовых гибридов растений семейства *Brassicaceae* (Обзор). *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2007;(2):64-70
[Kotlyarova E.B., Zhidkova E.N., Podvigina O.A. The application of methods *in vitro* for production interspecific and intergeneric hybrids of the plants of family *Brassicaceae* (Review). *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2007;(2):64-70 (in Russian)]
- Круглова Н.Н. Выявление автономности зародыша пшеницы как этап разработки экспресс-диагностической биотехнологии получения засухоустойчивых образцов. *Пермский аграрный вестник*. 2014;1(5):38-43
[Kruglova N.N. Identification of the autonomy of the wheat germ as a stage in the development of express diagnostic biotechnology for obtaining drought-resistant samples. *Perm Agrarian Journal*. 2014;1(5):38-43 (in Russian)]
- Круглова Н.Н. Выявление критических стадий раннего онтогенеза как методологический подход в изучении биологии развития растений в биотехнологических целях. *Экобиотех*. 2023;6(1):24-34. DOI 10.31163/2618-964X-2023-6-1-24-34
[Kruglova N.N. Distinguishing of the critical stages of early ontogenesis as a methodological approach in the study of plant development biology for biotechnological purposes. *Ecobiotech*. 2023;6(1):24-34. DOI 10.31163/2618-964X-2023-6-1-24-34 (in Russian)]
- Орловская О.А., Корень Л.В., Хотылева Л.В. Цитологическая характеристика гибридов пшеницы, созданных при отдаленной гибридизации в трибе *Triticeae*. *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. бйял. навук*. 2010;(4):50-54
[Orlovskaya O.A., Koren' L.V., Hotyleva L.V. Cytological characteristics of wheat hybrids created by distant hybridization in the *Triticeae* tribe. *Vesti Natsyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*. 2010;(4):50-54 (in Russian)]
- Юдина Р.С., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Тихонова М.А., Хлесткина Е.К. Антоцианы как компоненты функционального питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022
[Yudina R.S., Gordeeva E.I., Shoeva O.Yu., Tikhonova M.A., Khlestkina E.K. Anthocyanins as functional food components. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022 (in Russian)]
- Alikina O., Chernobrovkina M., Dolgov S., Miroshnichenko D. Tissue culture efficiency of wheat species with different genomic formulas. *Crop. Breed. Appl. Biotechnol.* 2016;16(4):307-314. DOI 10.1590/1984-70332016v16n4a46
- Arbuzova V.S., Maystrenko O.I., Popova O.M. Development of near-isogenic lines of the common wheat cultivar 'Saratovskaya 29'. *Cereal Res. Commun.* 1998;26(1):39-46. DOI 10.1007/BF03543466
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 1968;46(5):417-421. DOI 10.1139/o68-063
- Gordeeva E., Shamanin V., Shoeva O., Kukoeva T., Morgounov A., Khlestkina E. The strategy for marker-assisted breeding of anthocyanin-rich spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars in Western Siberia. *Agronomy*. 2020;10(10):1603. DOI 10.3390/agronomy10101603
- Haslam T.M., Yeung E.C. Zygotic Embryo Culture: An Overview. In: Thorpe T., Yeung E. (Eds.). *Plant Embryo Culture. Methods in Molecular Biology*. Vol. 710. Humana Press, 2011;3-15. DOI 10.1007/978-1-61737-988-8_1
- Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* 2017;61(1):1361779. DOI 10.1080/16546628.2017.1361779
- Kumlehn J., Lörz H., Kranz E. Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants. *Planta*. 1998;205:327-333. DOI 10.1007/s004250050327
- Wanga M.A., Shimelis H., Mashilo J., Laing M.D. Opportunities and challenges of speed breeding: A review. *Plant Breed.* 2021;140(2):185-194. DOI 10.1111/pbr.12909
- Zheng Z., Wang H.B., Chen G.D., Yan G.J., Liu C.J. A procedure allowing up to eight generations of wheat and nine generations of barley per annum. *Euphytica*. 2013;191:311-316. DOI 10.1007/s10681-013-0909-z

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.09.2023. После доработки 12.10.2023. Принята к публикации 20.10.2023.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-26

Обзор

Юбилей профессора Людмилы Николаевны Трут

Л.Л. Васильева

Для цитирования: Л.Л. Васильева Юбилей проф. Людмилы Николаевны Трут. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):224-226. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-26

Review

Anniversary of Professor Lyudmila Nikolaevna Trut

L.L. Vasilyeva

For citation: L.L. Vasilyeva. Anniversary of Professor Lyudmila Nikolaevna Trut. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(4):224-226. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-26 (in Russian)



Людмила Николаевна Трут



Л.Н. Трут с сотрудниками лаборатории

Заканчивается богатый событиями 2023 год...

Наиболее ожидаемым и значимым событием для меня и многих моих коллег и друзей было 6 ноября, 90-летний юбилей профессора Людмилы Николаевны Трут (Фото 1), академика Американской Академии Искусств и Наук (2020). Людмила Николаевна занимает центральное место в плеяде незаурядных талантливых русских и советских женщин-ученых.

Я с глубокой признательностью пишу о Людмиле Николаевне, оказавшей колоссальное влияние на всю мою жизнь, а также жизни многих и многих людей. Людмила Николаевна - мой Учитель в науке и жизни, научный руководитель моей работы в ИЦиГе с последующей защитой кандидатской диссертации (1992).

Жизнь — это чудо в любом ее проявлении. Мне невероятно повезло участвовать в уникальном, беспрецедентно смелом, революционном эксперименте по отбору серебристо-чёрных лисиц (*Vulpes vulpes* L.) на ручное поведение, к работе в котором я была приглашена академиком Дмитрием Константиновичем Беляевым после собеседования с ним, Людмилой Николаевной и Павлом Михайловичем Бородиным в феврале 1985 г.

Мой опыт работы в науке включает изучение межвидового взаимодействия муравьев, *Formica sanguinea* и *F. cunicularia*, на поведении которых я защитила мою дипломную работу в НГУ под руководством Жанны Ильиничны Резниковой, и позже исследование крошечной почвенной элегантной нематоды *Caenorhabditis elegans*, 100 сестринским линиям которых было позволено независимо накапливать спонтанные мутации в течении многих сотен поколений;

эксперимент, начатый еще в Университете Орегона, США, в лаборатории Dr. Michael Lynch, академика Американской Академии Наук (с 2009).

Однако самой радостной, приносящей огромное эмоциональное удовлетворение в моей работе с животными была, конечно, работа с одомашниваемыми лисицами. Представьте себе, вы входите в шед (два ряда клеток под одной крышей) и каждая лисица в клетке смеется и плачет от радости просто потому, что видит тебя! Каждый, кому повезло иметь собаку, знает этот блаженный собачий восторг, когда ты, наконец, возвращаешься домой даже после краткой разлуки. Точно также всякий раз, когда ты приезжаешь на ферму, ты омываешься этим, вроде, незаслуженным океаном радости одомашниваемых лисиц. Просто так, потому что ты человек. Это был самый счастливый период моей работы в науке.

Мне невероятно повезло участвовать в этом беспрецедентном эксперименте с 1985 г., примерно после 27 лет с момента его начала Дмитрием Константиновичем Беляевым в 1958 году. В том же 1958 году Д. К. Беляев пригласил Людмилу Николаевну Трут принять участие в одомашнивании лисиц. Так, после окончания Московского государственного университета им. Ломоносова с красным дипломом Людмила Николаевна стала практическим куратором эксперимента и непосредственным селекционером лисиц. Полагают, что и тысячелетия назад именно женщины были инициаторами одомашнивания и селекционерами тогда еще диких животных на ручное поведение, или по сути, селекцией животных на изменение их межвидового социального поведения.



Л.Л. Васильева и Л.Н. Трут

Последний раз я была на ферме в 2017 году, когда эксперименту было уже почти 60 лет. В это время уже можно было открыть случайную клетку и легко взять на руки практически любого лисенка из одомашниваемой популяции. Изменение поведения с 1992 г. за последние годы селекции на ручное поведение было колоссально! Воочию, отбор, направленный на изменение сложного поведения, многократно ускорял темпы эволюции! Вектор эволюции, как многократно подчеркивала Людмила Николаевна, является решающим фактором в скорости эволюционных процессов.

Людмила Николаевна не только была у истоков этого удивительного эксперимента, но остаётся его ангелом-хранителем. В 1990-х гг., в те сложные для учёных, для всей нашей страны и науки времена, эти уникальные лисицы, результат смелых идей и огромной работы многих людей были на грани гибели, а уникальный полувековой эксперимент на грани исчезновения из-за недостатка еды и лекарств для животных. Я хорошо помню весну еще 1992 г., когда было нечем кормить моего кота. Это был всего один кот, и мы могли пойти в кооперативный магазин, что был тогда на Морском проспекте, и купить ему немного еды. А накормить много сотен лисиц! Задача воистину эпического масштаба!

В августе 1998 г. я была в Академгородке (Фото 2 и 3) с моей пятилетней дочерью, Сонечкой, но поехать на ферму и показать ей удивительных лисиц с собачьим поведением не смогла: Людмила Николаевна посоветовала не делать этого,

поскольку лисицы были нездоровы и могли бы быть опасны для ребенка.

Об этом отчаянном времени, когда миниатюрная хрупкая женщина-ученый взяла на свои плечи задачу сохранения этого уникального, поистине революционного эксперимента написано в книге Lee Alan Dugatkin, Ludmila Trut «How to tame a Fox (and build a dog)», изданной в 2017 году к столетию академика Дмитрия Константиновича Беляева (17.07.17-14.11.1985) или на русском А.Л. Дугаткин и Л.Н. Трут «Как приручить лису (и превратить в собаку): Сибирский эволюционный эксперимент», изданную чуть позже в 2019 г.

Ситуация значительно улучшилась после публикации статьи Людмилы Николаевны в журнале «American Scientist» весной 1999 г., где была объяснена суть эксперимента, его исключительная продолжительность, его феноменальные результаты, его значение и потенциальные перспективы для науки.

Думается, что осмысление результатов этого многолетнего эксперимента по отбору лисиц по сложному межвидовому социальному поведению, особенно важно в наши дни, когда поведение и психика самих людей претерпевает невероятные преобразования прямо сейчас на наших глазах.

В заключение хотелось бы горячо поздравить Людмилу Николаевну с 90-летним юбилеем, и пожелать ей крепкого здоровья и успехов во всех планах и задумках.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.09.2023. После доработки 12.10.2023. Принята к публикации 20.10.2023.

Сетевое издание «Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции» – реестровая запись СМИ Эл № ФС77-75536, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 08 мая 2019 г.

Основано в 2015 году (до 2019 года выходило под названием «Письма в Вавиловский журнал»). На страницах издания публикуются результаты экспериментальных, методических и теоретических исследований, аналитические обзоры по всем разделам генетики и селекции, а также по смежным областям биологических и сельскохозяйственных наук; материалы и документы по истории генетики и селекции; описания сортов растений и пород животных; рецензии; письма, адресованные редактору; персоналии и мемориальные статьи; хроника и информация из региональных отделений Вавиловского общества генетиков и селекционеров.

Цель издания – донести новейшие результаты фундаментальных и прикладных исследований в области генетики растений, животных, человека, микроорганизмов, описание новых методов и селекционных достижений до наибольшего числа ученых, включая специалистов из смежных областей науки и техники, а также до преподавателей вузов, читающих курсы лекций по генетике и селекции.

Сетевое издание «Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции» с 15.06.2023 включено в [Перечень рецензируемых научных изданий](#), в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, по специальностям и отраслям науки:

- 1.5.7. Генетика (биологические науки)
- 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки)
- 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (биологические науки)
- 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки)

Индексируется в РИНЦ, включено в DOAJ.

Прием статей осуществляется через электронную почту редакции: pismavavilov@bionet.nsc.ru

Адрес издания в сети интернет: <https://pismavavilov.ru/>

При перепечатке материалов ссылка на издание обязательна.

Учредитель и издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)
Почтовый адрес учредителя и издателя: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090
Почтовый адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090
Телефон редакции: (383) 363 4963, доб. 5316
✉ Электронный адрес редакции: pismavavilov@bionet.nsc.ru

Выпуск подготовлен информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН.

Дата публикации: 14.12.2023