

Письма

в

**ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ
ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ**

Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding

2021
М А Р Т

Обзоры • Оригинальные статьи • Воспоминания

Том 7
№1

PISMAVAVILOV@BIONET.NSC.RU

ПИСЬМА В ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Научный рецензируемый журнал
Листья



ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 2015 году
Периодичность один раз в квартал

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-07

Учредитель

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

Главный редактор

А.В. Кочетов – чл.-кор. 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)

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

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

Ю.Э. Гербек – канд. биол. наук (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия)

Е.И. Гултыяева – 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 Национальной академии наук 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 – д-р биол. наук (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия)

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

А.Ю. Летягин – д-р мед. наук, профессор (НИИКЭЛ – филиал 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 Латвийской АН, д-р биол. наук, профессор (Институт биологии Латвийского университета, Саласпилс, Латвия)

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

А.А. Соловьев – д-р биол. наук, профессор (Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, 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, 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)

Scientific Peer Reviewed Journal

Letters

to **VAVILOV JOURNAL
OF GENETICS AND BREEDING**

Founded in 2015

Published once a quarter

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-07

Founder

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

Editor-in-Chief

A.V. Kochetov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Deputy Editors-in-Chief

N.P. Goncharov – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

E.A. Salina – Dr. Sci. in Biol., Professor (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Executive Secretary

O.Yu. Shoeva – Cand. Sci. in Biol. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Editorial board

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

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

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

Yu.E. Herbeck – Cand. Sci. in Biol. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

E.I. Gulyaeva – Dr. Sci. in Biol. (All-Russia Research Institute for Plant Protection, St. Petersburg, Russia)

N.I. Dubovets – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the NASB, Docent (Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus)

I.K. Zakharov – Dr. Sci. in Biol., Professor (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

K.V. Krutovsky – Cand. Sci. in Biol., Professor (Georg-August University of Gottingen, Gottingen, Germany)

A.M. Kudryavtsev – Dr. Sci. in Biol. (Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia)

S.A. Lashin – Cand. Sci. in Math. Biol. Bioinf. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

A.Y. Letyagin – Dr. Sci. in Med., Professor (Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

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

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

A.S. Pilipenko – Cand. Sci. in Biol. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

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

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

R.R. Sadoyan – Dr. Sci. in Biol., Docent (Armenian State Pedagogical University after Kh. Abovyan, Yerevan, Armenia)

A.A. Soloviev – Dr. Sci. in Biol., Professor (All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia)

N.A. Surin – Dr. Sci. in Agricul., Corr. Member of the RAS, Professor (Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture – Division of Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center, SB RAS", Krasnoyarsk, Russia)

V.A. Trifonov – Dr. Sci. in Biol., Professor (Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia)

V.S. Fishman – Cand. Sci. in Biol. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

S.V. Shekhovtsov – Cand. Sci. in Biol. (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia)

СОДЕРЖАНИЕ • 2021 • 7 • 1

- Оригинальные статьи**
- 5 Масса зерна колоса и масса тысячи зерен как признаки продуктивности у сортов яровой мягкой пшеницы разных групп спелости в условиях лесостепи Приобья
Е.В. Агеева, И.Н. Леонова, И.Е. Лихенко, В.В. Советов
- 12 Экспрессия генов адrenoцепторов в сосудистой стенке у гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAN)
М.А. Рязанова, А.Л. Маркель
- Обзоры**
- 17 Секвенирование виридов
Н.В. Шацкая
- 23 Мировой опыт создания пивоваренных сортов ячменя на основе беспроантоцианидиновых мутантов
О.Ю. Шоева
- Методы**
- 34 Создание библиотек баркодированных плазмид с помощью метода клонирования по Гибсону
А.В. Смирнов, А.М. Юнусова, А.А. Муравьева, Э.С. Валеев, В.С. Фишман, Н.Р. Баттулин
- Мемориальные статьи**
- 46 Памяти профессора Айгуль Изтелеуовны Абугалиевой (1959–2020)
Н.П. Гончаров, А.И. Моргунов, В.П. Шаманин, В.И. Цыганков, М.А. Есимбекова, И.Г. Лоскутов, К. Гузман, П.Р. Шеври, М. Эль-Солх

CONTENTS • 2021 • 7 • 1

- Original articles**
- 5 The ear grain weight and the thousand grain weight as productivity traits in varieties of spring bread wheat of different ripening groups in the conditions of the Priob'e steppe
E.V. Ageeva, I.N. Leonova, I.E. Likhenko, V.V. Sovetov
- 12 Expression of adrenergic receptor genes in the vascular wall of hypertensive ISIAH rats
M.A. Ryazanova, A.L. Markel
- Reviews**
- 17 Methods of viroid sequencing
N.V. Shatskaya
- 23 The world experience of malting barley cultivars breeding based on proanthocyanidin-free mutants
O.Yu. Shoeva
- Methods**
- 34 Creation of barcoded plasmids libraries using the Gibson cloning method
A.V. Smirnov, A.M. Yunusova, A.A. Muravyova, E.S. Valeev, V.S. Fishman, N.R. Battulin
- Memorial articles**
- 46 In memory of professor Aigul I. Abugalieva (1959–2020)
N.P. Goncharov, A.I. Morgunov, V.P. Shamanin, V.I. Tsygankov, M.A. Yessimbekova, I.G. Loskutov, C. Guzman, P.R. Shewry, M. El Solh

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-01

Оригинальное исследование

Масса зерна колоса и масса тысячи зерен как признаки продуктивности у сортов яровой мягкой пшеницы разных групп спелости в условиях лесостепи Приобья

Е.В. Агеева¹, И.Н. Леонова^{1,2}, И.Е. Лихенко^{1,2}, В.В. Советов¹

Аннотация: Подбор и изучение исходного материала – важный этап селекционного процесса, который необходим для выделения источников хозяйственно ценных признаков. В статье приведены данные сравнительного анализа показателей массы зерна колоса и массы 1000 зерен у сортов яровой мягкой пшеницы различных групп спелости в экологических условиях лесостепи Приобья в 2018–2019 гг. В целом погодные условия изучаемых лет были благоприятными для формирования урожая. Обильное выпадение осадков в июне 2018 г. способствовало увеличению продолжительности периода «всходы – колошение» у рассматриваемого набора сортов, а в 2019 г. дефицит осадков и теплая погода в этот же период вегетации привели к более раннему вступлению растений изучаемых генотипов в фазу колошения. Продолжительность вегетационного периода сортообразцов варьировала от 71 (раннеспелый сорт Новосибирская 16 в 2018 г.) до 104 (среднепоздний сорт Велют в 2018 г.) сут. Между продолжительностью вегетационного периода и температурным режимом отмечена высокая достоверная взаимосвязь ($r = 0.91–0.94$). Масса зерна колоса у сортов изучаемого набора в 2018 г. варьировала от 0.83 (Новосибирская 16) до 1.55 (Бэль) г, в 2019 г. – от 0.55 (Новосибирская 31) до 1.00 (Обская 2) г. Масса 1000 зерен колебалась в пределах от 26.8 (сорт Тризо, 2018 г.) до 41.5 (сорт Чернява 13, 2018 г.) г. Перспективными для использования в селекции на высокую продуктивность колоса и массу 1000 зерен отмечены генотипы среднераннего сорта Чернява 13 и среднеспелого сорта Бэль.

Ключевые слова: сорт; яровая мягкая пшеница; масса зерна колоса; масса тысячи зерен; вегетационный период.

Благодарности: Экспериментальная работа выполнена при поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № 0259-2021-0018. Статистическая обработка и оформление результатов проведены при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-16-00011-П.

Для цитирования: Агеева Е.В., Леонова И.Н., Лихенко И.Е., Советов В.В. Масса зерна колоса и масса тысячи зерен как признаки продуктивности у сортов яровой мягкой пшеницы разных групп спелости в условиях лесостепи Приобья. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(1):5-11. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-01

Original article

The ear grain weight and the thousand grain weight as productivity traits in varieties of spring bread wheat of different ripening groups in the conditions of the Priob'e steppe

E.V. Ageeva¹, I.N. Leonova^{1,2}, I.E. Likhenko^{1,2}, V.V. Sovetov¹


Abstract: The selection and study of the wheat varieties is an important stage in the breeding process, which is necessary to identify the sources of agronomically valuable traits. The article presents the data of a comparative analysis of the ear grain weight and the 1000 grain weight in varieties of spring soft wheat of various groups of ripeness in the ecological conditions of the forest-steppe of the Ob region for the period 2018–2019. Overall, the weather conditions of the studied years were favorable for the formation of the yield in the varieties of soft spring wheat. Abundant precipitation in June 2018 contributed to an increase in the duration of the sprouting–heading period in the set of varieties under consideration, and in 2019, a lack of precipitation and warm weather during the same growing season contributed to the fact that the plants of the studied genotypes entered the heading phase earlier. In general, the duration of the growing season of the studied varieties varied from 71 (early ripening variety Novosibirskaya 16 in 2018) to 104 (medium late variety Velut in 2018) days. There was a high reliable relationship between the duration of the growing season and the temperature regime ($r = 0.91–0.94$). The grain weight of an ear in the varieties of the studied set varied from 0.83 (Novosibirskaya 16) to


¹ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

² Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

¹ Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 elenakolomeec@mail.ru

 Агеева Е.В., Леонова И.Н., Лихенко И.Е., Советов В.В., 2021

1.55 (Bel) g in 2018, and in 2019 from 0.55 (Novosibirskaya 31) to 1.00 (Obskaya 2) g. Over the years of research, the mass of 1000 grains varied from 26.8 (in the Trizo variety in 2018) to 41.5 (in the Chernyava 13 variety in 2018) g. The mid-early variety Chernyava 13 and the mid-season variety Bel were identified as promising genotypes for use in breeding for high ear productivity and 1000 grain weight.

Key words: variety; spring soft wheat; ear grain weight; 1000 grain weight; vegetation period.

For citation: Ageeva E.V., Leonova I.N., Likhenco I.E., Sovetov V.V. The ear grain weight and the thousand grain weight as productivity traits in varieties of spring bread wheat of different ripening groups in the conditions of the Priob'e steppe. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(1):5-11. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-01 (in Russian)

Введение

Яровая мягкая пшеница является одной из наиболее важных зерновых культур, выращиваемых в Западно-Сибирском регионе. Площади посевов яровой пшеницы насчитывают 12.3 млн гектаров, что составляет более 15% всех посевов в Российской Федерации¹. Новосибирская область входит в двадцатку крупнейших регионов по посевным площадям пшеницы (Силаева, Баринаева, 2019)². Урожайность мягкой пшеницы значительно зависит от устойчивости генотипов к биотическим (болезни, насекомые) и абиотическим (засуха, засоление) факторам, что в свою очередь влияет на степень адаптивности и экологической пластичности сорта (Bell et al., 1995; Morgounov et al., 2010).

Непосредственное влияние на урожайность пшеницы оказывает продуктивность колоса, при этом степень продуктивности колоса зависит от проявления генетических факторов, детерминирующих признаки, в различных условиях вегетации растений (Цильке, 2005; Лепехов, Коробейников, 2013). В качестве элементов структуры продуктивности колоса оценивают такие параметры, как число фертильных и стерильных колосков в колосе, степень озерненности колоска и главного колоса, масса зерна с колоса и масса 1000 зерен. В условиях континентального климата Западной Сибири для повышения урожайности яровой мягкой пшеницы основное значение придают массе зерна колоса и массе 1000 зерен (Пискарев и др., 2016).

На адаптивность яровой мягкой пшеницы и возможность защиты ее растений от неблагоприятных факторов среды существенно влияет продолжительность вегетационного периода. Значимость продолжительности вегетационного периода возрастает в условиях континентального климата и нестабильных погодных условий Западной Сибири, сопровождающихся весенней засухой и ранним наступлением холодов в начале осени. Установлено, что позднеспелые сорта яровой пшеницы не всегда успевают созреть до наступления ранних осенних заморозков (Шаманин и др., 2017). В то же время раннеспелые сорта утрачивают способность использовать благоприятные условия, которые наступают после окончания весенне-летней засухи, поскольку основные этапы органогенеза пройдены (Лубнин, Советов, 1999).

Важным этапом селекционного процесса являются подбор и изучение исходного материала в различных условиях вегетации для выделения источников, характеризующихся

ценными в хозяйственном отношении признаками. В связи с тем что основной вклад в урожайность яровой мягкой пшеницы вносят такие признаки, как масса зерна колоса и масса 1000 зерен, для создания новых сортов необходимо иметь источники, характеризующиеся высокой выраженностью этих признаков. Цель данной работы – изучение количественных признаков «масса зерна колоса» и «масса 1000 зерен» у сортообразцов яровой мягкой пшеницы различных групп спелости для выявления генотипов, наиболее адаптированных к эколого-климатическим условиям региона и сочетающих высокие значения этих показателей.

Материалы и методы

Исследования проведены в 2018–2019 гг. на опытном поле лаборатории селекции, семеноводства и технологии возделывания полевых культур СибНИИРС – филиала ИЦиГ СО РАН (Новосибирская область).

Почвенный покров опытного поля представлен черноземом выщелоченным среднесуглинистым малогумусным среднесуглинистым. Содержание гумуса составляет 4.2%, общего азота – 0.34%, подвижного фосфора и калия по Чирикову – 29 и 13 мг/100 г почвы соответственно, рН – 6.7–6.8, глубина пахотного слоя – 41–46 см.

Материалом исследований служили 11 сортов яровой мягкой пшеницы отечественной селекции различных групп спелости, большинство из которых рекомендованы для выращивания в Западно-Сибирском регионе (табл. 1). Опыт закладывался по общепринятой методике (Методика государственного сортоиспытания..., 1989). Посев проводился во второй декаде мая, площадь опытной делянки – 2 м², повторность – двукратная, размещение – систематическое.

В полевых условиях во время фенологических наблюдений отмечены даты наступления основных фаз развития растений. Корреляционный анализ данных проводили по Б.А. Доспехову (1985) с использованием Microsoft Office Excel 2013. Сравнение образцов по признакам с целью выделения лучших выполняли по 9-балльной системе выражения количественных признаков, применяемой в отделе генетических ресурсов пшеницы ВИР (Зуев и др., 1999; Пискарев и др., 2018), где 9 – самое высокое, 7 – высокое, 5 – среднее, 3 – низкое, 1 – самое низкое значение признака. Принцип расчетов был следующим: для каждого признака в пределах одного года исследований определяли максимальные и минимальные значения, разницу делили на пять, находили интервал балла. Для установления лучших образцов по отдельным селекционно ценным признакам использовали средний балл, рассчитанный как среднее арифметическое

¹ Посевные площади пшеницы в России. Итоги 2019 года. *Агровестник*; 2019 [обновлено 21 августа 2019; процитировано 29 июля 2020]. Доступно: <https://www.agrovesti.net>

² Об итогах работы агропромышленного комплекса Новосибирской области за 2019 год. *Агровестник*; 2020 [обновлено 24 мая 2020; процитировано 29 июля 2020]. Доступно: <https://www.agrovesti.net>

Таблица 1. Исследованные сортообразцы яровой мягкой пшеницы, группа спелости и происхождение

Образец	Группа спелости	Оригинатор
Новосибирская 15	Раннеспелый	СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН
Новосибирская 16		СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН
Новосибирская 29	Среднеранний	Тюменский научный центр СО РАН
Чернява 13		СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН
Новосибирская 31		СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН
Бэль	Среднеспелый	СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН
Обская 2		ФАНЦ Юго-Востока
Саратовская 29		СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН
Новосибирская 18		Deutsche Saatveredelung AG (DSV), Германия
Тризо	Среднепоздний	ИЦиГ СО РАН
Велют		

за конкретные годы изучения. Для статистического анализа брали по 25 растений каждого сорта.

Погодные условия изучаемых лет сложились благоприятно для формирования урожая у сортов мягкой яровой пшеницы (рис. 1, 2). За летний период в 2018 г. выпало 380.3 мм осадков, в 2019 г. – 194.7 мм, тогда как среднемноголетнее значение составляет 220.0 мм.

В начале вегетации в 2018 г. наблюдалась холодная и дождливая погода. В мае отклонение от среднемноголетнего значения температуры составило 4 °С, гидротермический коэффициент Г.Т. Селянинова (ГТК) > 2. В первую половину вегетации превышение количества выпавших осадков в среднем за два месяца было более 80% среднемноголетних данных (211.4 мм). Наиболее дождливым в этот год оказался июнь – 130.2 мм осадков (ГТК = 2.8). В то же время в июне зафиксирована жаркая погода: показания температуры воздуха были выше среднемноголетних значений на 2.2 °С. Во второй половине вегетации не наблюдалось таких резких перепадов температурного режима, лишь в августе отмечен дефицит осадков (49.7% среднемноголетних значений, ГТК = 0.4).

В 2019 г. также отмечены неравномерное выпадение осадков и заметное колебание температуры в конце вегетации. Дождливая погода зафиксирована в мае (43.2 мм осадков) и июле (89.9 мм), в июне и августе недобор осадков в среднем составил 50% (ГТК 0.7 и 0.5 соответственно). Нарастание температуры установлено в третьей декаде июля и сохранялось в первой декаде августа – 19–21 °С. В среднем отклонение от среднемноголетних значений температуры воздуха в июле составило +0.4 °С, в августе +2.2 °С.

Результаты и обсуждение

Вегетационный период. Огромное значение при формировании урожайности растения имеет период от всходов до колошения. В ряде работ показано, что обеспеченность влагой растений пшеницы в период формирования трубки и колошения является определяющим для формирования урожая фактором (Добротворская и др., 2013; Лазарев, Скин, 2013; Волкова, 2016). Варьирование продолжительности периода «всходы – колошение» у изучаемых генотипов

было в пределах 33–48 сут, при этом отмечены существенные различия в сроках колошения между образцами (табл. 2). Наиболее продолжительный период «всходы – колошение» как в 2018 г., так и 2019 г. наблюдался у сорта Велют (47 и 48 сут соответственно). У большинства образцов наступление фазы колошения отмечено за 39–41 сут, лишь у раннеспелых сортов Новосибирская 15 и Новосибирская 16 продолжительность фазы составила от 33 до 35 сут.

Обильное выпадение осадков в первой половине вегетации 2018 г. (особенно в июне) способствовало увеличению продолжительности периода «всходы – колошение» у рассматриваемых сортов, а в 2019 г. дефицит осадков и теплая погода в этот же период вегетации (июнь) привели к более раннему вступлению растений изучаемых генотипов в фазу колошения.

По одной из предложенных моделей сорта для лесостепной зоны оптимальная продолжительность вегетационного периода составляет 75–88 сут (Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2009). Продолжительность вегетационного периода изученных сортообразцов варьировала от 71 (раннеспелый сорт Новосибирская 16 в 2018 г.) до 104 (среднепоздний сорт Велют в 2018 г.) сут. Несмотря на такой диапазон продолжительности вегетационного периода, все генотипы смогли сформировать урожай в условиях лесостепи Приобья за оба года изучения. Между продолжительностью вегетационного периода и температурным режимом отмечена высокая достоверная взаимосвязь. Величина коэффициента корреляции в 2018 г. составила 0.94, в 2019 г. – 0.91. Высокая взаимосвязь также установлена между продолжительностью вегетационного периода и количеством осадков ($r = 0.72$ и 0.87 соответственно).

Наибольший интерес для Западной Сибири представляют сорта с коротким вегетационным периодом, способные сочетать оптимальные сроки созревания и урожайность. В связи с этим при сравнении образцов по системе селекционно ценных признаков, применяемой в ВИР, максимальный балл (9) присваивался сортам, рано входившим в фазы колошения и созревания. В результате обильного выпадения осадков в первый год исследования большинство генотипов при оценке по системе селекционно ценных признаков

Таблица 2. Продолжительность периодов «всходы – колошение» и «всходы – созревание» у сортов яровой мягкой пшеницы (2018–2019 гг.)

Сорт	Всходы – колошение		Всходы – созревание	
	Сутки	Балл	Сутки	Балл
Новосибирская 15	35.0	9.0	73.0	9.0
Новосибирская 16	34.0	9.0	72.0	9.0
Новосибирская 29	39.5	7.0	84.5	5.0
Чернява 13	40.0	6.0	87.0	4.0
Новосибирская 31	41.5	5.0	83.5	6.0
Бэль	39.5	6.0	83.5	6.0
Обская 2	40.5	6.0	89.0	4.0
Саратовская 29	40.0	6.0	86.5	4.0
Новосибирская 18	39.0	7.0	83.0	6.0
Тризо	41.0	5.0	86.0	5.0
Велют	47.5	1.0	97.5	1.0
Среднее	39.8	–	84.1	–
НСР ₀₅	3.5	–	5.9	–

Примечание: здесь и далее в табл. 3 представлено среднее значение признака за исследуемый период

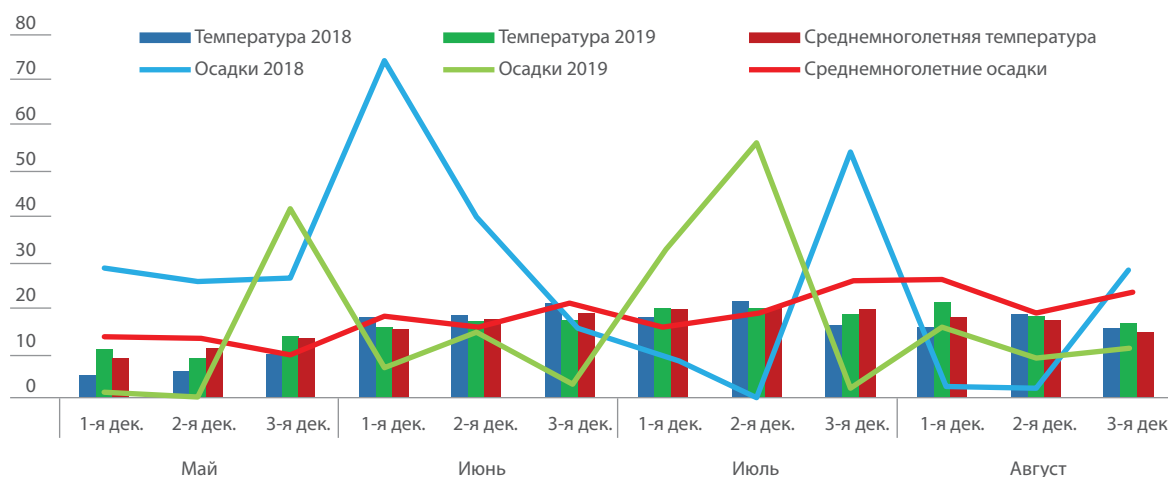


Рис. 1. Метеорологические условия вегетационных периодов 2018–2019 гг. (по данным гидрометеостанции пос. Огурцово, Новосибирская область)

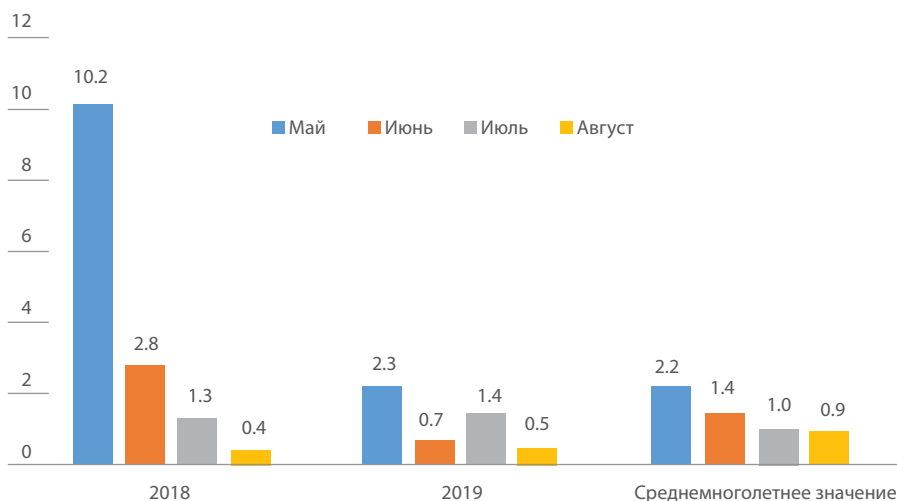


Рис. 2. Гидротермический коэффициент Г.Т. Селянинова за вегетационные периоды 2018–2019 гг.

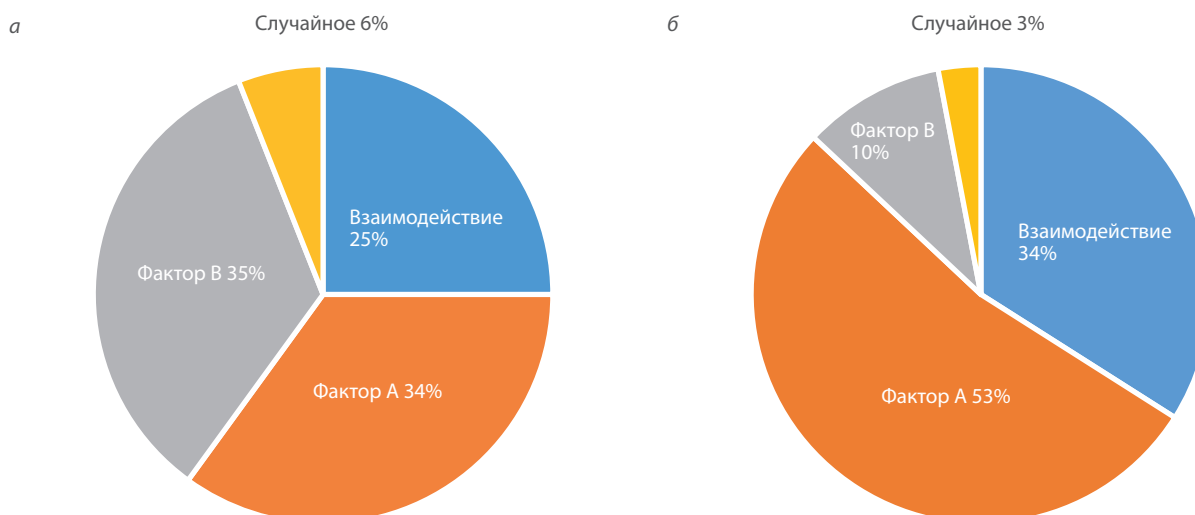


Рис. 3. Результаты дисперсионного анализа данных массы зерна колоса (а) и массы 1000 зерен (б) у сортов яровой мягкой пшеницы. Факторы А и В указывают на влияние генотипа и условий внешней среды соответственно на фенотипическое проявление признаков

попали в группу со средним (Бэль, Новосибирская 31, Новосибирская 18 и Саратовская 29) или низким (Новосибирская 29, Чернява 13, Тризо и Обская 2) значением. В 2019 г. в эти группы вошли всего четыре образца: Чернява 13 (81 сут), Обская 2 (81 сут), Тризо (81 сут) и Саратовская 29 (85 сут). Минимальный балл за период изучения продемонстрировал сорт Велют с вегетационным периодом 91–104 сут.

Средние баллы по продолжительности периода от всходов до созревания за оба года исследований с высоким средним баллом (9–7 баллов) имели местные раннеспелые и среднеспелые сорта (Новосибирская 15, Новосибирская 16 и Новосибирская 18).

Масса зерна колоса. Оптимальная масса зерна колоса, по мнению Н.П. Гончарова и П.Л. Гончарова (2009), составляет 0.8–1.0 г. Масса зерна колоса у изучаемых сортов в 2018 г. варьировала от 0.83 (Новосибирская 16) до 1.55 (Бэль) г, в 2019 г. – от 0.55 (Новосибирская 31) до 1.00 (Обская 2) г.

Достоверное превышение средней массы зерна колоса отмечено у генотипов Бэль (1.19 г) и Чернява 13 (1.08 г), но масса зерна колоса у этих сортов значительно варьировала за годы исследований (табл. 3).

Масса зерна колоса у сортов Новосибирская 15, Новосибирская 29, Бэль, Чернява 13, Обская 2 и Велют в условиях вегетационного периода 2018 г. была значительно выше, чем в 2019 г. У скороспелых сортов под воздействием колебаний температур за вегетацию масса зерна колоса меняется в меньшей степени, чем у среднеспелых и позднеспелых (Пискарёв и др., 2010), что наблюдалось в проведенном эксперименте. Разница по признаку в пределах одного сорта составила от 0.33 (Новосибирская 15) до 0.73 (Бэль) г.

Следует выделить сорт Обская 2, у которого масса зерна колоса в 2019 г. была выше полученной массы зерна колоса в 2018 г. на 0.2 г и составила 1 г, что является благоприятным вкладом в урожайность сорта.

Высоким средним за годы изучения баллом (8–9) при оценке массы зерна колоса характеризовались 7 образцов,

исходя из этого они представляют интерес для селекции по данному признаку.

Двухфакторный дисперсионный анализ данных массы зерна колоса (рис. 3, а) показал, что вклад изменчивости, вызванный условиями выращивания (фактор В), составляет 35%, а генотипическая изменчивость (фактор А) и взаимодействие факторов А и В – 34 и 25% соответственно от общего фенотипического варьирования признака. В то же время на долю изменчивости, вызванной случайными факторами, приходится 6%, что может быть связано с агротехническими условиями.

Масса 1000 зерен также играет существенную роль в формировании продуктивности колоса. За годы исследований данный признак варьировал от 26.8 (у сорта Тризо в 2018 г.) до 41.5 (у сорта Чернява 13 в 2018 г.) г. В 2018 г. массой 1000 зерен выделились сортообразцы Бэль (37.2 г), Чернява 13 (41.5 г) и Новосибирская 18 (35.3 г), в 2019 г. – Бэль (36.5 г), Чернява 13 (36.5 г), Новосибирская 16 (36.6 г) и Саратовская 29 (37.8 г).

Величина массы 1000 зерен зависит не только от условий среды, но и сортовой специфики, о чем свидетельствуют показатели у сортов Обская 2 и Новосибирская 18, у которых за исследуемый период масса 1000 зерен была неизменной и высокой – 39.7 и 35.5 г. соответственно.

Несмотря на нестабильные погодные условия, в 2019 г. в среднем у большинства сортов наблюдалось формирование более крупного зерна (34.7 г), чем в 2018 г. (33.9 г). Возможно, это связано с тем, что во второй половине вегетации второго года исследований сложились более благоприятные условия для интенсивной работы фотосинтетического аппарата и аккумуляции накопленных продуктов фотосинтеза в зерне.

В среднем раннеспелые сорта (Новосибирская 15 и Новосибирская 16) превосходили по массе 1000 зерен такие сорта, как Тризо, Новосибирская 31 и Велют. Среднюю и выше средней массу 1000 зерен (4–8) имели 7 образцов.

Таблица 3. Масса зерна колоса и масса 1000 зерен у сортов яровой мягкой пшеницы (2018–2019 гг.)

Сорт	Масса зерна колоса		Масса 1000 зерен	
	Грамм	Балл	Грамм	Балл
Новосибирская 15	0.84	7.0	32.3	4.0
Новосибирская 16	0.76	6.0	34.8	5.0
Новосибирская 29	0.87	8.0	33.9	3.0
Чернява 13	1.08	9.0	39.0	8.0
Новосибирская 31	0.72	6.0	30.5	2.0
Бэль	1.19	9.0	36.9	6.0
Обская 2	0.90	8.0	39.7	8.0
Саратовская 29	0.92	8.0	33.2	5.0
Новосибирская 18	0.96	8.0	35.5	4.0
Тризо	0.75	7.0	30.8	2.0
Велют	0.98	8.0	30.7	2.0
Среднее	0.90	–	34.3	–
НСР ₀₅	0.1		1.3	

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа массы 1000 зерен показали, что вклад изменчивости, вызванный условиями выращивания (фактор В), составляет 10%, что значительно меньше, чем изменчивость, обусловленная влиянием генотипа (фактор А, 53%) (см. рис. 3, б). Взаимодействие факторов А и В составило 34% общего фенотипического варьирования признака.

Сравнение сортов по степени выраженности обоих признаков показывает, что сорта среднепоздней группы спелости характеризовались значительно меньшими показателями массы 1000 зерен, при этом не уступали другим сортам по массе зерна колоса. Данные других авторов также свидетельствуют, что выраженность элементов продуктивности (число зерновок, масса зерна колоса, урожайность) ниже у среднепоздних сортов по сравнению со среднеранними при выращивании в различных регионах Западной Сибири (Беляев, Соколова, 2015; Бойко и др., 2015).

Заключение

Значительный интерес в условиях лесостепи Новосибирской области представляют сорта, способные за короткий вегетационный период сформировать колос с высокой продуктивностью и крупностью зерна. Оптимальное сочетание показателей изученных признаков выявлено для сортов среднеранней и среднеспелой групп спелости. Сорта образцами, сочетающими высокие показатели массы зерна колоса и массы 1000 зерен, являются среднеранний сорт Чернява 13 и среднеспелый сорт Бэль. Эти сорта можно рекомендовать в качестве перспективных генотипов для использования в селекции на высокую продуктивность колоса и массу 1000 зерен.

Список литературы / References

Беляев В.И., Соколова Л.В. Изменчивость урожайности яровой мягкой пшеницы различных групп спелости в Восточно-Кулундинской зоне Алтайского края. *Вестник АГАУ*. 2015;4(126):16-21.

[Belyaev V.I., Sokolova L.V. Yield variation of spring soft wheat varieties of different maturity groups in the East-Kulundinskaya zone of the Altai region. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University*. 2015;4(126):16-21. (in Russian)]

Бойко Н.И., Пискарев В.В., Тимофеев А.А. Особенности формирования урожайности пшеницы мягкой яровой в контрастных условиях лесостепи Приобья. *Вестник АПК Ставрополья*. 2015;3(19):135-141.

[Boyko N.I., Piskarev V.V., Timofeev A.A. Features of formation of soft spring wheat yield in the contrasting weather conditions of forest-steppe Ob' region. *Vestnik APK Stavropol'ya = Agricultural Bulletin of Stavropol Region*. 2015;3(19):135-141. (in Russian)]

Волкова Л.В. Урожайность яровой мягкой пшеницы и ее связь с элементами продуктивности в разные по метеорологическим условиям годы. *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2016;6(55):9-14. [Volkova L.V. Productivity of spring wheat and its relation to elements of yield structure in years differ by meteorological conditions. *Agrarnaya Nauka Evro-Severo-Vostoka = Agricultural Science Euro-North-East*. 2016;6(55):9-14. (in Russian)]

Гончаров Н.П., Гончаров П.Л. Методические основы селекции растений. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2009.

[Goncharov N.P., Goncharov P.L. Methodical Bases of Plant Breeding. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2009. (in Russian)]

Добротворская Н.И., Каличкин В.К., Сорокина О.Л. Влияние гидротермических условий на урожайность и качество зерна яровой пшеницы в лесостепи Новосибирского Приобья. *Достижения науки и техники АПК*. 2013;(12):16-18.

[Dobrotvorskaya N.I., Kamchkin V.K., Sorokina O.L. Effect of hydrothermal conditions on yield and grain quality of spring wheat in the forest steppe of Novosibirsk Ob region. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2013;(12):16-18. (in Russian)]

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта М.: Агропромиздат, 1985;269-297.

[Dospikhov B.A. Field experiment technique. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985;269-297. (in Russian)]

Зуев Е.В., Ляпунова О.А., Брыкова А.Н., Сурганова Л.Д., Никифоров М.Н., Разумова И.И., Плотникова Л.Н., Потокина С.Н., Бородин Р.К., Иванова О.А., Кожушко Н.Н., Жукова А.Э., Чмелева З.В., Климентьева Н.Ф. Характер изменчивости скороспелых образцов яровой мягкой пшеницы в различных эколого-географических условиях. Каталог мировой коллекции ВИР. СПб.: ВИР, 1999;708:67.

- [Zuev E.V., Lyapunova O.A., Brykova A.N., Surganova L.D., Nikiforov M.N., Razumova I.I., Plotnikova L.N., Potokina S.N., Borodina R.K., Ivanova O.A., Kozhushko N.N., Zhukova A.E., Chmeleva Z.V., Kliment'eva N.F. The pattern of variability of early-ripening soft spring wheat accessions under various ecogeographical conditions. VIR World Collection Catalogue. St. Petersburg: VIR Publ., 1999;708:67. (in Russian)]
- Лазарев А.П., Скипин Л.Н. Возможности использования климатического фактора на черноземах Западной Сибири. *Вестник КрасГАУ*. 2013;10(85):59-64.
[Lazarev A.P., Skipin L.N. The climatic factor use possibilities on the Western Siberia chernozems. *Vestnik KrasGAU = Bulletin of KrasGAU*. 2013;10(85):59-64. (in Russian)]
- Лепехов С.Б., Коробейников Н.И. Модель урожайных сортов яровой мягкой пшеницы для степной зоны Алтайского края. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2013;1(230):23-29.
[Lepekhov S.B., Korobeynikov N.I. Field and agronomic drought resistance of soft wheat varieties in forest-steppe conditions of the Altai region. *Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences*. 2013;1(230):23-29. (in Russian)]
- Лубнин А.Н., Советов В.В. Итоги селекционной работы по яровой пшенице, изучение ее растительных ресурсов в зоне селекцентра СибНИИРС за 30 лет (1969-1998). *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 1999;(3-4):70-75.
[Lubnin A.N., Soviets V.V. The results of breeding work on spring wheat, the study of its plant resources in the area of the selection center SibNIIRS for 30 years (1969-1998). *Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences*. 1999;(3-4):70-75. (in Russian)]
- Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур / Гос. комисс. по сортоиспытанию с.-х. культур при М-ве с. хоз-ва СССР; под общей ред. В.И. Головачева, Е.В. Кирилловской. Москва: Калининская областная типография управления издательств, полиграфии и книжной торговли Калининского облисполкома, 1989.
[Methodology of state variety testing of agricultural crops / State Commission according to variety testing of agricultural products at Ministry with households of the USSR / V.I. Golovachev, E.V. Kirilovskaya (Eds.). Moscow: Kalinin Regional Printing House of the Publishing House, Printing and Book Trade of the Kalinin Regional Executive Committee, 1989. (in Russian)]
- Пискарев В.В., Бойко Н.И., Кондратьева И.В. Источники хозяйственно ценных признаков для селекции пшеницы мягкой яровой (*Triticum Aestivum* L.) в условиях лесостепи Приобья Новосибирской области. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(3):277-285.
[Piskarev V.V., Boyko N.I., Kondratyeva I.V. Sources of economically valuable traits for breeding soft spring wheat (*Triticum Aestivum* L.) in the forest-steppe conditions of the Ob region of the Novosibirsk region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(3):277-285. (in Russian)]
- Пискарев В.В., Зуев Е.В., Брыкова А.Н. Исходный материал для селекции яровой мягкой пшеницы в условиях Новосибирской области. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(7):784-794. DOI 10.18699/VJ18.422.
[Piskarev V.V., Zuev E.V., Brykova A.N. Sources for the breeding of soft spring wheat in the conditions of Novosibirsk region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(7):784-794. DOI 10.18699/VJ18.422. (in Russian)]
- Пискарев В.В., Цильке Р.А., Москаленко В.М., Тимофеев А.А. Изменчивость и наследование количественных признаков мягкой яровой пшеницы в контрастных эколого-климатических условиях Западной Сибири и Северного Казахстана. Новосибирск: ГНУ СибНИИРС СО Россельхозакадемии, 2010.
[Piskarev V.V., Tsilke R.A., Moskalenko V.M., Timofeev A.A. Variation and inheritance of quantitative traits of soft spring wheat in contrasting ecological and climatic conditions of Western Siberia and Northern Kazakhstan. Novosibirsk: State Scientific Institution SibNIIRS SB Russian Agricultural Academy, 2010. (in Russian)]
- Силаева Л.П., Барина Е.В. Современное состояние и условия рационального размещения производства пшеницы. *Экономический журнал*. 2019;1(53):33-42. DOI 10.24411/2072-8220-2019-00003.
[Silaeva L.P., Barinova E.V. The current state and conditions for the rational distribution of wheat production. *Ekonomicheskyy zhurnal*. 2019;1(53):33-42. DOI 10.24411/2072-8220-2019-00003. (in Russian)]
- Цильке Р.А. Генетические основы селекции мягкой яровой пшеницы на продуктивность в Западной Сибири: монография. Новосибирск: НГАУ, 2005;321.
[Tsilke R.A. Genetic bases of breeding of soft spring wheat for productivity in Western Siberia: Monograph. Novosibirsk: NSAU Publ., 2005;321. (in Russian)]
- Шаманин В.П., Потоцкая И.В., Шепелев С.С., Пожерукова В.Е., Трущенко А.Ю., Чурсин А.С., Моргунов А.И. Оценка линий синтетической пшеницы (*Triticum durum/Aegilops tauschii*) по вегетационному периоду и устойчивости к болезням. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(3):347-353. DOI 10.18699/VJ17.252.
[Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Shepelev S.S., Pozherukova V.E., Truschenko A.Yu., Chursin A.S., Morgunov A.I. Evaluation of synthetic wheat lines (*Triticum durum/Aegilops tauschii*) for vegetative period and resistance to diseases. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(3):347-353. DOI 10.18699/VJ17.252. (in Russian)]
- Bell M.A., Fischer R.A., Byerlee D., Sayre K. Genetic and agronomic contributions to yield gains: a case study for wheat. *Field Crops Research*. 1995;44:55-65.
- Morgounov A., Zykin V., Belan I., Roseeva L., Zelenskiy Yu., Hugo Ferney Gomez-Becerrad, Budakd H., Bekes F. Genetic gains for grain yield in high latitude spring wheat grown in Western Siberia in 1900–2008. *Field Crops Research*. 2010;117:101-112. DOI 10.1016/j.fcr.2010.02.001.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.08.2020. После доработки 09.11.2020. Принята к публикации 09.11.2020.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-02

Оригинальное исследование

Экспрессия генов адренорецепторов в сосудистой стенке у гипертензивных крыс линии ИСИАГ (ISIAH)

М.А. Рязанова¹, А.Л. Маркель^{1,2}

Аннотация: Артериальная гипертония – широко распространенное заболевание, снижающее качество жизни и приводящее к фатальным сердечно-сосудистым осложнениям. Симпатоадренальная система участвует в регуляции артериального давления и патогенезе артериальной гипертонии. Также симпатоадренальная система является одной из ведущих причин появления реакции на стрессовые события. На сегодняшний день известно, что стресс в совокупности с наследственной предрасположенностью является одним из важных факторов, способствующих развитию артериальной гипертонии в человеческой популяции. В Институте цитологии и генетики СО РАН путем селекции на повышение артериального давления в условиях мягкого эмоционального стресса получены крысы линии ИСИАГ (ISIAH), которые характеризуются рядом морфологических и физиологических признаков, свойственных больным артериальной гипертонией. Исследования указывают на повышенную функцию симпатоадренальной системы у крыс гипертензивной линии ИСИАГ. Повышение артериального давления в ответ на стрессовую стимуляцию может также зависеть от генетически обусловленного изменения профиля экспрессии генов адренорецепторов в артериальной стенке. Цель работы – исследовать экспрессию генов альфа1A-, альфа1B-, альфа2A-, бета1- и бета2-адренорецепторов в сосудистой стенке артерии у крыс ИСИАГ со стресс-чувствительной артериальной гипертонией. Методом ПЦР в реальном времени показано снижение уровня экспрессии мРНК генов *Adra1A* и *Adra1B* адренорецепторов, опосредующих вазоконстрикцию в хвостовой артерии у крыс ИСИАГ, что может указывать на компенсаторные изменения экспрессии генов адренорецепторов при артериальной гипертонии. Показано отсутствие экспрессии мРНК гена бета1-адренорецепторов в артериальной стенке у крыс ИСИАГ, что свидетельствует о преобладающей роли бета2-адренорецепторов в этом сосуде.

Ключевые слова: альфа1A-адренорецепторы; альфа1B-адренорецепторы; альфа2A-адренорецепторы; бета1-адренорецепторы; бета2-адренорецепторы; ПЦР в реальном времени; артериальные сосуды; артериальная гипертония; крысы ИСИАГ.

Благодарности: Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта № 0259-2021-0016.

Для цитирования: Рязанова М.А., Маркель А.Л. Экспрессия генов адренорецепторов в сосудистой стенке у гипертензивных крыс линии ИСИАГ (ISIAH). *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(1):12-16. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-02

Original article

Expression of adrenergic receptor genes in the vascular wall of hypertensive ISIAH rats

М.А. Ryazanova¹, A.L. Markel^{1,2}

Abstract: Arterial hypertension is a common disease, which reduces the quality of life and leads to fatal cardiovascular complications. The sympathetic adrenal system is involved in the regulation of blood pressure and in the pathogenesis of arterial hypertension. To date, it is known that stress, together with a hereditary predisposition, is one of the important factors contributing to the development of arterial hypertension in the human population. Using selection for an increase in blood pressure under conditions of mild emotional stress, ISIAH rats that are characterized by a number of morphological and physiological traits typical for patients with essential hypertension were obtained at the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia). The studies point to increased sympathetic adrenal system function in the hypertensive ISIAH line. However, an increase in blood pressure in response to stress stimulation is possible may depend on a genetically determined change in the expression profile of adrenergic receptor genes in the arterial wall. The aim of the work was to study the expression of alpha1A-, alpha1B-, alpha2A-, beta1-, beta2-adrenergic receptor genes in the vascular artery wall of ISIAH rats with stress-sensitive arterial hypertension. Decreased mRNA levels of *Adra1A* and *Adra1B* adrenoceptor genes mediating vasoconstriction in the tail artery in ISIAH rats have been found, which may indicate compensatory changes under conditions of arterial hypertension. In addition, the absence of mRNA expression of the beta1-adrenergic receptor gene in the arterial wall of the studied rat strain was shown, which indicates on predominant role the beta2-adrenergic receptors in this vessel.


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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 ocean-2006@yandex.ru

 Рязанова М.А., Маркель А.Л., 2021

Key words: alpha1A-adrenergic receptors; alpha1B-adrenergic receptors; alpha2A-adrenergic receptors; beta1-adrenergic receptors; beta2-adrenergic receptors; real-time PCR; arterial vessels; arterial hypertension; ISIAH rats.

For citation: Ryazanova M.A., Markel A.L. Expression of adrenergic receptor genes in the vascular wall of hypertensive ISIAH rats. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(1):12-16. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-02 (in Russian)

Введение

Артериальная гипертония – широко распространенное заболевание, снижающее качество жизни и приводящее к фатальным сердечно-сосудистым осложнениям. Симпато-адреналовая система (САС) участвует в регуляции артериального давления (АД) и патогенезе артериальной гипертонии. Также САС является одной из ведущих причин реакции на стрессовые события. На сегодняшний день известно, что стресс в совокупности с наследственной предрасположенностью способствует развитию гипертонии в человеческой популяции. В Институте цитологии и генетики СО РАН путем селекции на повышение АД в условиях мягкого эмоционального стресса (Markel, 1992) получены крысы линии НИСАГ (ISIAH), которые характеризуются рядом морфологических и физиологических признаков, свойственных пациентам с гипертонической болезнью, в том числе гипертрофией стенок левого желудочка и мелких артериальных сосудов (Маркель и др., 1985; Markel, 1992; Максимов и др., 1999).

В действительности сердце и сосуды являются тем конечным звеном, на которое направлена стимуляция со стороны САС и ренин-ангиотензиновой системы, приводящая к повышению АД. Ранее показано, что гипертензивное состояние у крыс НИСАГ связано не с гиперфункцией ренин-ангиотензиновой системы (Amstislavsky et al., 2005) (гипертонию у крыс НИСАГ можно охарактеризовать как низкорениновую), а скорее с повышением тонуса САС (Markel et al., 1999; Markel et al., 2007; Рязанова, 2012). Это ожидаемо, так как селекция линии крыс НИСАГ велась на повышение уровня АД в условиях мягкого эмоционального стресса, связанного с активацией центральной нервной системы и ее симпатического отдела. Однако повышение АД в ответ на стрессовую стимуляцию возможно не только по причине усиленного ответа со стороны САС, но и вследствие увеличения реактивности сердечно-сосудистой системы на симпатический разряд. В нашем случае можно предположить, что в результате селекции на повышенный уровень АД в условиях стресса могла сформироваться соответствующая генетическая база, обеспечивающая повышенный ответ мелких артериальных сосудов, от которых зависит общее сопротивление кровотоку и уровень АД, на симпатическую стимуляцию. Такое повышение реактивности сосудов может быть следствием генетически обусловленного изменения профиля экспрессии генов адренорецепторов в артериальной стенке.

Задачей работы было изучение транскрипционной активности генов адренорецепторов в стенке артерий мышечного типа у крыс линии НИСАГ в сравнении с нормотензивными крысами Вистар (WAG). В качестве мишени избрана вентральная артерия хвоста крысы. Исследована экспрессия генов следующих адренорецепторов: альфа1А, альфа1В, альфа2А, бета1 и бета2.

Материалы и методы

Исследование проведено на трехмесячных крысах-самцах двух инбредных линий: НИСАГ (ISIAH), $n = 6$, и WAG (Wistar Albino Glaxo), $n = 5$. Крыс содержали в стандартных условиях вивария Института цитологии и генетики СО РАН со свободным доступом к воде и сбалансированному корму. Исследование выполнено в соответствии с международными правилами по работе с экспериментальными животными (Этический кодекс от 1985 г.). В возрасте 3 мес. крыс взвешивали, измеряли АД непрямым методом (tail-cuff method) на аппарате CODA-HT8 (Kent Scientific, США). Через 5 дней крыс декапитировали, хвостовую артерию быстро выделяли и помещали в жидкий азот, а затем хранили при -70°C для дальнейшего выделения РНК.

Выделение суммарной РНК из хвостовой артерии проводили с использованием TRI Reagent (RNA/DNA/Protein isolation agent, Molecular Research Center, США) согласно рекомендациям производителя, с некоторыми модификациями.

Примеси геномной ДНК удаляли с помощью ДНКазы (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию РНК измеряли в водном растворе с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США) по поглощению на 260 нм. Качественными считали образцы РНК, для которых $D260/D280 \approx 2.0$. Для получения кДНК смешивали 1 мкг РНК и 0.25 нмоль случайных (random N9) праймеров-наномеров (ПАО «Биосинтез», Россия). Конечный раствор смеси реакции обратной транскрипции объемом 50 мкл содержал: 1 мкг РНК и 0.25 нмоль случайных праймеров-наномеров (ПАО «Биосинтез», Россия), 5 мкл буфера F2, 5 мкл 4 мМ dNTP, 25 мкл 40% трегалозы, 1 мкл BSA (10 мг/мл) и 5 мкл 40 ед. акт. обратной транскриптазы MoMLV (реактивы производства АО «Вектор-Бест», Россия). Синтез кДНК проводили при $37^\circ\text{C} - 1 \text{ ч}$, $42^\circ\text{C} - 50 \text{ мин}$, $50^\circ\text{C} - 10 \text{ мин}$. Фермент инактивировали при 75°C в течение 5 мин.

Для проверки отсутствия геномной ДНК в полученных растворах проводили ПЦР с раствором РНК и праймерами на ген *Adra2A* (Рязанова и др., 2017). Оценку качества обратной транскрипции для каждого образца кДНК проверяли постановкой ПЦР в реальном времени с праймерами на ген *Rpl₃₀* (Рязанова и др., 2017).

ПЦР в реальном времени проходила в следующем температурном режиме: предварительный прогрев при $94^\circ\text{C} - 2 \text{ мин}$, затем 38–45 циклов: денатурация при $94^\circ\text{C} - 15 \text{ с}$, отжиг – 20 с, элонгация при $72^\circ\text{C} - 20 \text{ с}$, сбор данных по флуоресценции – 10 с (таблица). После окончания ПЦР снимали кривые плавления для контроля специфичности реакции. Полуколичественную оценку экспрессии мРНК исследуемых генов осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени

Праймеры, используемые для ПЦР в реальном времени
Gene-specific primers used for RT-PCR

Ген / Gene	Праймеры / Primer sequence	T, °C		Длина продукта, п.н. / Amplificate fragment, bp.
		Отжиг / Annealing	Регистрация / Detection	
<i>Rpl₃₀</i>	F: 5'-ATGGTGGCTGCAAAGAAGAC-3' R: 5'-CAAAGCTGGACAGTTGTTGG-3'	61–64	84	165
<i>Adra1A</i>	F: 5'-TGCCATCTTTGAGATCCTG-3' R: 5'-GGTAGCTCACACCAATGTA-3'	64	87	143
<i>Adra1B</i>	F: 5'-CCAAAACCTTGGGCATTGTA-3' R: 5'-TAGATGATGGGATTGAGGCA-3'	64	87	166
<i>Adra2A</i>	F: 5'-TATGGGCTACTGGTACTTT-3' R: 5'-CCCACACAGTGACAATGAT-3'	63	90	191
<i>Adrb1</i>	F: 5'-CAAGACACTGGGCATCAT-3' R: 5'-CCAGTTGAAGAAGACGAAGA-3'	64	87	124
<i>Adrb2</i>	F: 5'-ACTCTGCCTTCAATCCTCTTA-3' R: 5'-TTCATTTCTTCTCCTGCC-3'	62	85	188

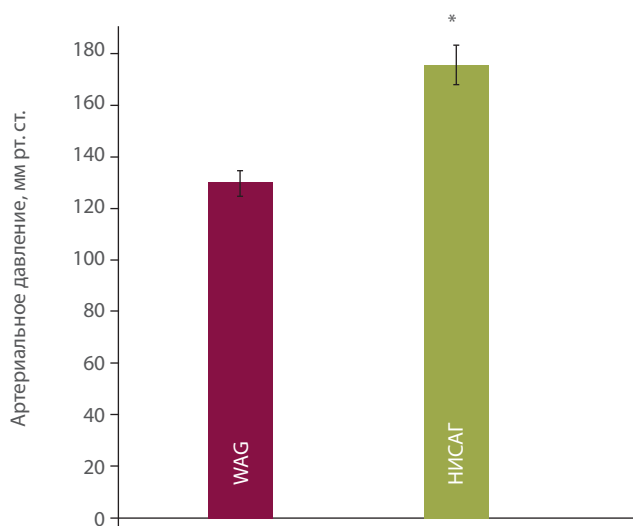


Рис. 1. Величина артериального давления у крыс линий WAG и ИСАГ при стрессе (измерение при помещении животного в сетчатую трубку)

* $p < 0.05$ по сравнению с крысами WAG, критерий Манна – Уитни

Fig. 1. The value of blood pressure in WAG rats and ISIAH rats under stress (measurement in a mesh tube)

* significantly different from WAG, $p < 0.05$, Mann – Whitney U-test

относительно количества мРНК гена домашнего хозяйства *Rpl₃₀*. Из полученных образцов кДНК для каждой структуры делали усредненный раствор кДНК, который использовали для построения калибровочных кривых, по которым определяли относительный уровень кДНК для целевых генов и гена сравнения в образцах. Праймеры, используемые для определения экспрессии генов (см. таблицу), были подобраны с использованием онлайн-олигоанализатора (<https://www.eu.idtdna.com>) и проверены в базе данных Blast (Basic Local Alignment Search Tool) на специфичность.

Статистическую обработку данных проводили с исполь-

зованием пакета программ Statistica 10.0. Анализ экспрессии генов выполняли с помощью методов непараметрической статистики с использованием критерия Манна – Уитни.

Результаты

Масса тела трехмесячных крыс ИСАГ составила 295.8 ± 10.5 г, WAG – 282.3 ± 7.6 г. Уровень АД у крыс ИСАГ был достоверно выше, чем у крыс WAG (рис. 1). Исследование экспрессии генов адренорецепторов в стенке хвостовой артерии у крыс гипертензивной линии ИСАГ показало статистически значимое снижение количества мРНК генов альфа1А- и альфа1В-адренорецепторов (рис. 2) по сравнению с крысами WAG. Экспрессии генов альфа2А- и бета2-адренорецепторов достоверно не различались у нормо- и гипертензивных крыс, а экспрессия бета1-адренорецептора у обеих исследованных линий крыс была очень низкой (на грани чувствительности метода) (см. рис. 2).

Обсуждение

Симптоадренальная система опосредует реакцию на стрессовые воздействия путем взаимодействия норадреналина и адреналина со специфическими мембранными G-белок-связанными адренергическими рецепторами, вызывая соответствующие физиологические ответы организма. Регуляция просвета кровеносных сосудов является важным параметром, определяющим общее сопротивление кровяного русла кровотоку и, как следствие, уровень АД. Именно поэтому активацию САС рассматривают в качестве одного из основных факторов патогенеза эссенциальной артериальной гипертензии. Предполагают, что периодическая избыточная активация САС, в том числе в условиях хронического стресса, напрямую участвует в развитии гипертонической болезни (Fink, 2009; Hering et al., 2015). Повышенное АД впоследствии становится фактором развития изменений структуры и функции сосудов различного калибра, которые в свою очередь рассматриваются как органы-мишени при гипертензии. Эти изменения, вызванные повышенным артериальным давлением, способствуют формированию патологии в различных органах, главным обра-

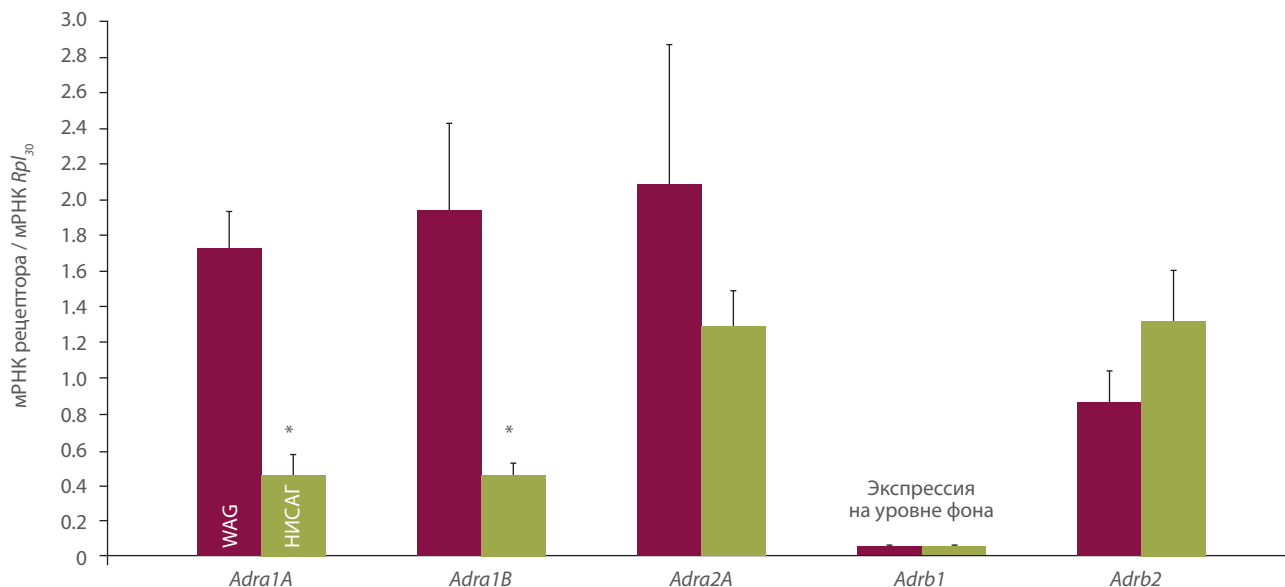


Рис. 2. Содержание мРНК генов адренорецепторов в хвостовой артерии у крыс линий WAG и НИСАГ

* $p < 0.05$ по сравнению с крысами WAG, критерий Манна – Уитни

Fig. 2. mRNA content of adrenergic receptor genes in the tail artery of WAG and ISIAH rats

* significantly different from WAG rats, $p < 0.05$, Mann – Whitney U-test

зом почках, поддерживая высокое АД (Grassi et al., 2009; Назарова О.А., Назарова А.В., 2012). В регуляции сосудистого тонуса со стороны САС принимают участие альфа1-, альфа2- и бета-адренорецепторы, локализованные в стенке сосудов (Guimaraes, Moura, 2001). В данной работе исследованы альфа1A-, альфа1B-адренорецепторы как наиболее распространенные в сосудах и реализующие вазоконстрикторные эффекты норадреналина (Piascik et al., 1990; Jähnichen et al., 2004; Docherty, 2010), а также альфа2A-адренорецепторы как основные регуляторы выхода норадреналина в синаптическую щель посредством отрицательной обратной связи (Altman et al., 1999; Hein et al., 1999; Bucheler et al., 2002). Кроме того, исследованы бета1- и бета2-адренорецепторы, стимуляция которых вызывает главным образом релаксацию гладкомышечных клеток сосудов. При этом следует учесть, что вовлечение каждого подтипа бета-адренорецепторов в этот процесс зависит от локализации в сосуде и вида животного (O'Donnell, Wanstall, 1984; Guimaraes et al., 1993; Shen et al., 1994; Begonha et al., 1995).

Наличие стойкого гипертензивного статуса у крыс линии НИСАГ предполагало повышение экспрессии генов адренорецепторов альфа1A и альфа1B, посредством которых и реализуются вазоконстрикторные влияния САС. Однако вопреки ожиданиям в нашем случае экспрессия генов этих адренорецепторов оказалась значительно ниже (см. рис. 2). При этом следует учитывать, что продукция норадреналина и адреналина – факторов, стимулирующих адренорецепторы, – у крыс НИСАГ значительно повышена (Markel et al., 2007). То есть наблюдается типичная картина реципрокного взаимоотношения концентраций лиганда и рецептора, которая описана для разнообразных регуляторных си-

стем (Wilkinson et al., 1994; Ranheim et al., 1995; Morel et al., 2000; Red-Horse et al., 2001). Таким образом, можно сделать следующий главный вывод: рост уровня симпатической стимуляции сосудистой системы у крыс НИСАГ имеет центральное происхождение за счет повышения тонуса мозговых центров регуляции симпатической активности. Подтверждением этому служат недавно полученные данные об увеличении концентрации норадреналина в гипоталамусе крыс НИСАГ (неопубликованные результаты). В литературе также не представлено данных об усилении альфа-адренергического рецепторного звена в сосудистой системе у крыс с экспериментальной артериальной гипертонией (Michel et al., 1990; Luo et al., 2003). Результаты у больных артериальной гипертонией весьма противоречивы и не дают однозначной оценки, что свидетельствует о значительной гетерогенности патогенетических механизмов гипертензивной болезни у людей.

Заключение

Впервые получены данные об особенностях адренорецепторного звена сосудистой стенки у крыс НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертонией. Показан низкий уровень экспрессии мРНК генов альфа1A- и альфа1B-адренорецепторов, опосредующих вазоконстрикцию, что может указывать на компенсаторные изменения в условиях артериальной гипертензии. Кроме того, продемонстрировано отсутствие экспрессии мРНК гена бета1-адренорецептора в вентральной хвостовой артерии у исследованных линий крыс, что свидетельствует о преобладающей роли бета2-адренорецепторов в этом сосуде.

Список литературы / References

- Максимов В.Ф., Коростышевская И.М., Маркель А.Л., Филушина Е.Е., Шмерлинг М.Д., Якобсон Г.С. Метаболическое повреждение миокарда у нормотензивных и гипертензивных крыс (морфометрический анализ). *Морфология*. 1999;115(1):19-23.
- [Maksimov V.F., Korostyshevskaya I.M., Markel A.L., Filyushina E.E., Schmerling M.D., Jacobson G.S. Metabolic myocardial injury in normotensive and hypertensive rats (morphometric analysis). *Morfologia = Morphology*. 1999;115(1):19-23. (in Russian)]
- Маркель А.Л., Ерисковская Н.К., Еремеев С.И., Семенова Л.А., Целлариус Ю.Г. Адреналиновые повреждения миокарда у крыс с наследственно обусловленной артериальной гипертонией. *Бюлл. экпер. биол. и мед.* 1985;99(3):356-358.
- [Markel A.L., Eriskovskaya N.K., Eremeev S.I., Semenova L.A., Cellarius Yu.G. Adrenaline myocardial injury in rats with hereditary arterial hypertension. *Byulleten Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1985;99(3):356-358. (in Russian)]
- Назарова О.А., Назарова А.В. Поражение сосудов при артериальной гипертонии. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2012;17(2):60-66.
- [Nazarova O.A., Nazarova A.V. Vascular lesion in arterial hypertension. *Vestnik Ivanovskoy Medicinskoy Akademii = Bulletin of the Ivanovo Medical Academy*. 2012;17(2):60-66. (in Russian)]
- Рязанова М.А., Прокудина О.И., Плеканчук В.С., Алехина Т.А. Экспрессия генов системы катехоламинов в среднем мозге и реакция престаимпульного торможения у крыс с генетической кататонией. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(7):798-803. DOI 10.18699/VJ17.296.
- [Ryazanova M.A., Prokudina O.I., Plekanchuk V.S., Alekhina T.A. Expression of catecholaminergic genes in the midbrain and prepulse inhibition in rats with a genetic catatonia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(7):798-803. DOI 10.18699/VJ17.296. (in Russian)]
- Рязанова М.А. Экспрессия генов альфа1А- и альфа2А-адренорецепторов в миокарде и ткани почки у гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH). *Бюлл. СО РАМН*. 2012;32(1):43-47.
- [Ryazanova M.A. Expression of the Alpha1A and Alpha2A adrenergic receptor genes in myocardial and kidney tissues of hypertensive ISIAH rats. *Bull. SO RAMN = Bull. SB RAMS*. 2012;32(1):43-47. (in Russian)]
- Altman J.D., Trendelenburg A.U., Macmillan L., Bernstein D., Limbird L., Starke K., Kobilka B.K., Hein L. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in $\alpha 2A$ -adrenergic receptor knockout mice. *Mol. Pharmacol.* 1999;56:154-161. DOI 10.1124/mol.56.1.154.
- Amstislavsky S., Welker P., Fruhauf J.H., Maslova L., Ivanova L., Jensen B., Markel A.L., Bachmann S. Renal and endocrine changes in rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH). *Histochem Cell Biol.* 2005;8:1-9. DOI 10.1007/s00418-005-0118-5.
- Begonha R., Moura D., Guimaraes S. Vascular b-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. *J. Pharm. Pharmacol.* 1995;47:510-513. DOI 10.1111/j.2042-7158.
- Bucheler M.M., Hadamek K., Hein L. Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience*. 2002;109:819-826. DOI 10.1016/S0306-4522(01)00531-0.
- Docherty J.R. Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. *Cell Mol. Life Sci.* 2010;67(3):405-417. DOI 10.1007/s00018-009-0174-4.
- Fink G.D. Sympathetic activity, vascular capacitance, and long-term regulation of arterial pressure. *Hypertension*. 2009;53:307-312. DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119990.
- Grassi G., Arenare F., Pieruzzi F., Brambilla G., Mancina G. Sympathetic activation in cardiovascular and renal disease. *J. Nephrol.* 2009;22:190-195.
- Guimaraes S., Mota A., Begonha R. The effectiveness of b-adrenoceptor stimulation and the contribution of b-adrenoceptors increase from the proximal to the distal part of the canine saphenous vein. *Nahrung Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1993;347:596-600. DOI 10.1007/BF00166942.
- Guimaraes S., Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol. Rev.* 2001;53(2):319-356.
- Hein L., Altman J.D., Kobilka B.K. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*. 1999;402:181-184. DOI 10.1038/46040.
- Hering D., Lachowska K., Schlaich M. Role of the Sympathetic Nervous System in Stress-Mediated Cardiovascular Disease. *Curr. Hypertens. Rep.* 2015;17(10):80. DOI 10.1007/s11906-015-0594-5.
- Jähnichen S., Eltze M., Pertz H. Evidence that alpha (1B)-adrenoceptors are involved in noradrenaline-induced contractions of rat tail artery. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;488(1-3):157-67. DOI 10.1016/j.ejphar.2004.02.020.
- Luo M., Hess M.C., Fink G.D., Olson L.K., Rogers J., Kreulen D.L., Dai X., Galligan J.J. Differential alterations in sympathetic neurotransmission in mesenteric arteries and veins in DOCA-salt hypertensive rats. *Auton. Neurosci.* 2003;104(1):47-57. DOI 10.1016/S1566-0702(02)00287-4.
- Markel A.L. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. Genetic Hypertension. *Ed. J. Sassard*. London: John Libbey Eurotext. 1992;218:405-407.
- Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T., Bulygina V.V., Machanova N.A., Jacobson G.S. Development influences on blood pressure regulation in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. Genetic Hypertension. *Ed. J. Sassard*. London: John Libbey Eurotext. 1992;218:405-407.
- Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T., Bulygina V.V., Machanova N.A., Jacobson G.S. Development influences on blood pressure regulation in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J. Endocrinol.* 2007;195:439-450. DOI 10.1677/JOE-07-0254.
- Michel M.C., Brodde O.E., Insel P.A. Peripheral Adrenergic Receptors in Hypertension. *Hypertension*. 1990;16:107-120.
- Morel Y., Schiano de Colella J.M., Harrop J., Deen K.C., Holmes S.D., Wattam T.A., Khandekar S.S., Truneh A., Sweet R.W., Gastaut J.A., Olive D., Costello R.T. Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand Light on activated T cells: Light down-regulates its own receptor. *J. Immunol.* 2000;165:4397-4404. DOI 10.4049/jimmunol.165.8.4397.
- O'Donnell S.R., Wanstall J.C. Beta-1 and beta-2 adrenoceptor-mediated responses in preparations of pulmonary artery and aorta from young and aged rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1984;228:733-738.
- Piascik M.T., Kusiak J.W., Barron K.W. $\alpha 1$ -Adrenoceptor subtypes and the regulation of peripheral hemodynamics in the conscious rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1990;186(2-3):273-278. DOI 10.1016/0014-2999(90)90443-a.
- Ranheim E.A., Cantwell M.J., Kipps T.J. Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 1995;85(12):3556-3565.
- Red-Horse K., Drake P.M., Gunn M.D., Fisher S.J. Chemokine ligand and receptor expression in the pregnant uterus. Reciprocal patterns in complementary cell subsets suggest functional roles. *Am. J. Pathol.* 2001;159(6):2199-2213. DOI 10.1016/S0002-9440(10)63071-4.
- Shen Y.T., Zhang H., Vatner S.F. Peripheral vascular effects of beta-3 adrenergic receptor stimulation in conscious dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994;268:466-473.
- Wilkinson H.A., Fitzgerald K., Greenwald I. Reciprocal changes in expression of the receptor lin-12 and its ligand lag-2 prior to commitment in a *C. elegans* cell fate decision. *Cell*. 1994;79(7):1187-1198. DOI 10.1016/0092-8674(94)90010-8.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.09.2020. После доработки 25.09.2020. Принята к публикации 27.09.2020.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-03

Обзор

Секвенирование виридов

Н.В. Шацкая 

Аннотация: Вириды представляют собой небольшие патогенные РНК-молекулы длиной от 246 до 467 нуклеотидов, состоящие из одноцепочечной кольцевой РНК, без капсида и последовательностей, кодирующих белок. Вириды проникают в растения и используют систему хозяина для размножения. Они индуцируют структурные и физиологические изменения в клетках хозяйского организма, которые впоследствии приводят к развитию различных заболеваний. Выявление виридов непросто, с которой довольно успешно справляется NGS-секвенирование. С 2009 г. технологию NGS начали использовать в нескольких областях вирусологии растений, включая секвенирование геномов виридов, открытие новых видов и определение уже известных. Также NGS-секвенирование может быть использовано в экологии, эпидемиологии, изучении репликации и транскрипции виридов. В вирусологии растений данная технология наиболее удобна для определения уже известных и новых виридов в инфицированных растениях. Предполагается, что NGS будет играть значительную роль во многих исследованиях по вирусологии растений и в дальнейшем.

Ключевые слова: секвенирование нового поколения; вириды; патогены; биобезопасность.

Благодарности: Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект 20-46-07001.

Для цитирования: Шацкая Н.В. Секвенирование виридов. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(1):17-22. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-03

Review

Methods of viroid sequencing

N.V. Shatskaya 

Abstract: Viroids are small, single-stranded pathogenic RNA-molecules from 246 to 467 bp, circular, non-encapsulated and they do not code proteins. Viroids penetrate to plants and depend on host enzymes for their replication. They induce structural and physiological changes in host plant that become to diseases. Viroids detection is not so simple problem, and NGS-sequencing can help to solve it. In 2009, NGS technologies began to be applied to several areas of plant virology including virus/viroid genome sequencing, discovery and detection, ecology and epidemiology, replication and transcription. Identification and characterization of known and unknown viroid in infected plants are currently among the most successful applications of these technologies. It is expected that NGS will play very significant role in plant virology.

Key words: next generation sequencing; viroids; pathogens; biosafety.

For citation: Shatskaya N.V. Methods of viroid sequencing. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(1):17-22. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-03 (in Russian)

Со времен открытия вириды остаются одними из самых загадочных биологических молекул и являются самыми маленькими из известных инфекционных РНК. Вириды представляют собой РНК-репликоны длиной от 246 до 467 нуклеотидов, состоящие из одноцепочечной кольцевой РНК, в которой отсутствуют последовательности, кодирующие белок (Katsarou et al., 2015). Первый вириод открыт Теодором Динером в 1967 г. и впоследствии назван вириодом веретеновидности клубней картофеля (PSTVd) (Diener, Raymer,

1967). Вириды подразделяют на два семейства. Вириды семейства *Pospiviroidae* реплицируются в ядре по ассиметричному кольцевому механизму. Большинство членов этого семейства имеют структуру, состоящую из пяти доменов: терминального левого, патогенного, центрального, вариабельного и терминального правого. Выделяют пять родов: *Pospiviroid* (potato spindle tuber viroid, PSTVd), *Hostuviroid* (hop stunt viroid, HSVd), *Cocadviroid* (coconut cadang-cadang viroid, CCCVd), *Apscaviroid* (apple scar skin viroid, ASSVd) и

Coleviroid (*coleus blumei* viroid 1, CbVd-1).

Вириоды другого семейства, *Avsunviroidae*, – небольшая группа, состоящая из трех родов: *Avsunviroid* (*avocado sunblotch viroid*, ASBVd), *Pelamoviroid* (*peach latent mosaic viroid*, PLMVd) и *Elaviroid* (*eggplant latent viroid*, ELVd). Типичный представитель этого семейства – PLMVd, вириод латентной мозаики персика, кодирует саморазрезающиеся РНК (рибозимы типа hammerhead), которые реплицируются в хлоропластах через симметричный кольцевой механизм (Oliver, Fuchs, 2011).

Симптомы заражения и методы определения

Вириоды могут индуцировать структурные и физиологические изменения в клетках хозяйского организма (Di Serio et al., 2013), которые впоследствии приводят к развитию различных заболеваний (Flores et al., 2012). Симптомы инфицирования вириодами могут варьировать по степени проявления. Иногда эти проявления могут быть очень слабыми. Заражение вириодами может быть выражено только в отдельных органах растения или проходить бессимптомно, как в случае диких растений (Flores et al., 2005). Надо отметить, что вириоды переносятся механически и для своего размножения используют транскрипционный механизм хозяина. Репликация вириодов происходит по симметричному или ассиметричному круговому циклу и обусловлена активностью ДНК-зависимой РНК-полимеразы хозяина, которая использует РНК вириодов как матрицу для создания новых копий кольцевой РНК через промежуточную форму двуцепочечных РНК (дцРНК) (Flores et al., 2011). Производные дцРНК вириодов также реплицируются при помощи хозяйской РНК-зависимой РНК-полимеразы, включенной в механизм РНК-сайленсинга растения-хозяина (Di Serio et al., 2010).

В инфицированной вириодом клетке в процессе репликации происходят изменения в нуклеотидной последовательности вириодных потомков. Образовавшиеся популяции полиморфных молекул РНК могут служить источником адаптации к новым хозяевам и новым условиям жизненного цикла. Таким образом, после инфицирования каждый вариант вириода способен продуцировать свою популяционную динамику в хозяйском растении. Эта концепция носит название квазивидов и впервые предложена в 1993 г. (Eigen, 1993). Чрезвычайная изменчивость нуклеотидных последовательностей вириодов характеризует их как наиболее быстро развивающуюся из известных биологических систем (Matousek, 2002).

Как отдельный класс патогенов, вириоды отчетливо отличаются от вирусов. Хотя вириоды и демонстрируют некоторые структурные и биологические сходства с вирусом гепатита дельта, последний в пять раз больше и кодирует два белка с одной рамки считывания (Flores et al., 2016). Некоторые вириоды и вирусы могут иметь бессимптомное проявление в организме хозяина. Однако эти латентные агенты могут быть патогенами для других хозяев. Существующие специфические методы, такие как ПЦР, очень чувствительны, но детектируют только известные вириоды или вирусы. Эти методы не способны показать плохо охарактеризованные или сильно вариабельные вириоды. Более того, часто

хозяйское растение может быть заражено несколькими патогенами, как известными, так и экзотическими, которые стандартные скрининговые методы не могут обнаружить. В данном случае может быть полезно секвенирование нового поколения (next generation sequence, NGS) для выявления, исследования и сертификации патогенов.

Выбор платформы для секвенирования

Значительный прогресс в технологии секвенирования произошел в последние два десятилетия и привел к развитию новых подходов выявления и идентификации вириодов. Данные подходы относят к метагеномике, при которой производится полное секвенирование суммарной ДНК в образцах зараженных растений с помощью NGS с последующей идентификацией патогенов биоинформатическими методами. Поскольку обычно вириоды присутствуют в растениях в низких концентрациях и весьма вариабельны, их обнаружение – сложная задача для многих лабораторий, занимающихся патологией растений. Это является одной из причин того, что с момента открытия за 40 лет идентифицированы менее 40 видов вириодов из двух семейств. Платформа NGS появилась в начале 2000 г., и ее использование с 2004 г. изменило подход к исследованиям во многих областях, включая растительную вирусологию.

NGS-технологии можно разделить на две группы: первая – с короткими прочтениями (100–600 п.н.) и высокой точностью, вторая – с длинными прочтениями (900 × 10³ п.н.) и большим количеством ошибок. Это привело к разным подходам приготовления образцов, секвенирования, детекции и анализа данных (Васильев, 2014) (табл. 1). Наиболее часто используют короткие прочтения, поскольку этот вариант дешевле и точность прочтения выше. Однако при коротких прочтениях имеется ограничение в возможности прочтения сложных участков с повторами или последовательности гетерозигот, для которых больше подходят технологии с длинными прочтениями. Illumina, Ion Torrent, 454 Life Science, SOLiD – платформы, которые созданы для коротких прочтений (см. табл. 1). Среди приборов с длинными прочтениями – MinION, который использует технологию нанопорового секвенирования, и PacBio с детекцией молекул в реальном времени.

Выбор подхода секвенирования вириодной РНК

Поскольку вириоды содержат РНК, которая не кодирует полезные им в жизненном цикле белки, знание структуры, помогающей вириодам адаптироваться, важно как для понимания взаимодействия хозяина и патогена, так и самого цикла размножения вириода. С момента открытия вириодов их молекулярная структура оставалась неизвестной, поскольку они не проявляли физически узнаваемых характеристик, таких как клеточная структура у бактерий или белки у вирусов. Первая структура молекулы вириода получена для PSTVd с помощью секвенирования в геле и сборки перекрывающихся последовательностей (Gross et al., 1978). Характеризация вириодных РНК с помощью NGS выполнена в 2009 г. у винограда и персиков (Di Serio et al., 2009; Navarro et al., 2009). С этого времени NGS активно используют для анализа взаимодействий вириодов и хозяев у травянистых

Таблица 1. Платформы для NGS (Barba et al., 2014)

Прибор (производитель)	Метод амплификации	Метод детекции	Длина прочтения, п.н.	Скорость секвенирования, п.н./ч	Точность, %	Мисматчи, инсерции, делеции
454 Life Science (Roche)	Эмульсионная ПЦР	Пиросеквенирование	400–700	13 млн п.н.	99.9	0.10/0.3/0.02 (Archer et al., 2012)
Illumina (Illumina)	Мостиковая ПЦР	Обратимое терминирование	100–300	25 млн п.н.	99.9	0.12/0.004/0.006 (Archer et al., 2012)
SOLiD (Life Technologies)	Эмульсионная ПЦР	Лигирование	75–85	21–28 млн п.н.	99.9	Ошибка больше, чем в Illumina (Meyerand, Kircher, 2010)
PacBio (Pacific Biosciences)	Без амплификации	Флуоресцентно меченые нуклеотиды	15000–30000	50–115 млн п.н.	95	1, 2, 12 (Carniero et al., 2012)
Ion Torrent (Life Technologies)	Эмульсионная ПЦР	Детекция высвобождаемых ионов	100–400	100 млн п.н. – 64 млрд п.н.	99	Инсерции = 0.06, инсерции + делеции = 1.38 (Bragg et al., 2013)
MinION (Oxford Nanopore Technologies)	Нанопоровое секвенирование	Сила тока при прохождении через пору	900 × 10 ³		90–95	5–10%

Таблица 2. Новые вироиды, определенные с помощью NGS

Способ обогащения	Платформа NGS	Количество определенных вироидов	Хозяин	Источник литературы
Тотальная РНК	454	3	Виноград	Al Rwahnih et al., 2009
РНК без рибосомной фракции	Illumina	4	Виноград	Poojari et al., 2013
Двухпочечная РНК	454	3	Виноград	Al Rwahnih et al., 2009
Малые РНК	Illumina	1	Томат	Li et al., 2012
Малые РНК	Illumina	2	Виноград	Giampetruzzi et al., 2012; Wu et al., 2012; Seguin et al., 2014
Малые РНК	Illumina	2	Мандарин	Loconsole et al., 2012
Малые РНК	Illumina	2.2	Яблоко, виноград	Zhang et al., 2014

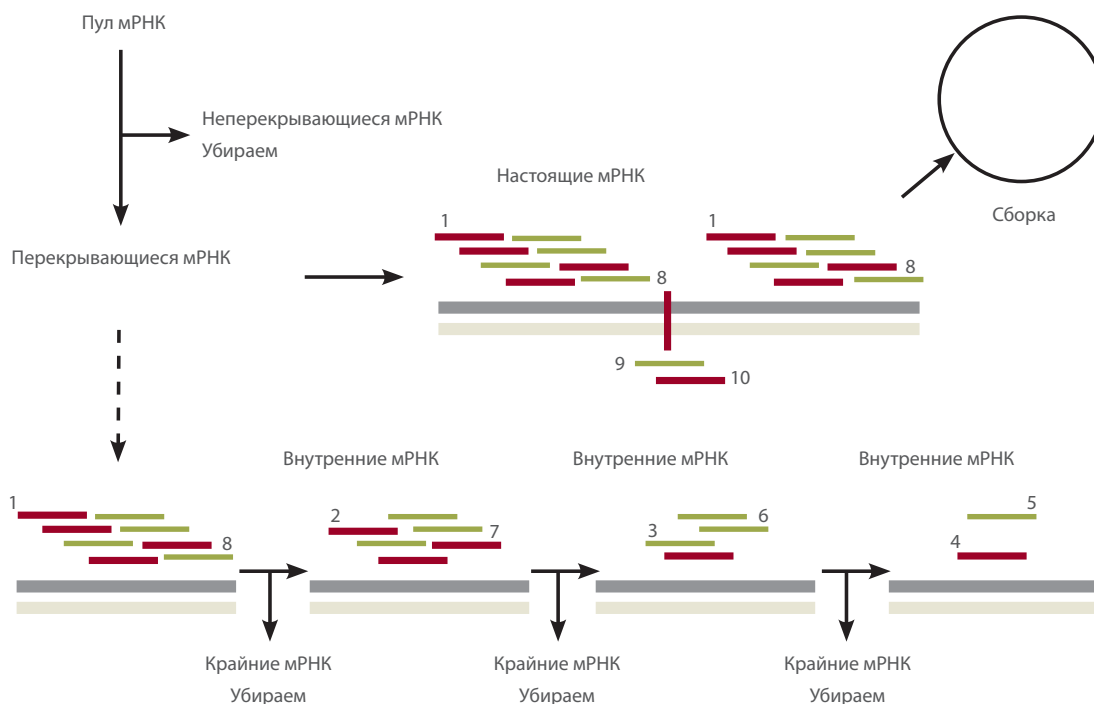
и древесных растений (Hadidi et al., 2016). Сочетание биоинформатических подходов со сборкой контигов и поиском гомологов виroidных последовательностей в базах данных NGS библиотек малых РНК широко и эффективно применяются для идентификации известных и новых виroidов. Разработанные в последнее время алгоритмы позволяют производить независимую от гомологии идентификацию новых виroidов или виroid-подобных РНК, например виroidов яблоч или винограда (Wu et al., 2012; Zhang et al., 2014).

Также необходимо отметить такую проблему, как гетерогенность виroidов. Например, для виroidа экзокортиса цитрусовых (CEVd) секвенировано 17 вариантов, которые делят на два класса, отличающихся как минимум на 26 нуклеотидов и с вариациями по длине от 370 до 375 нуклеотидов. Степень проявления симптомов у растения во время заражения может сильно варьировать. Один штамм виroidа может индуцировать несколько явных и серьезных

симптомов, в то время как другой штамм индуцирует незначительные проявления (Visvader, Symons, 1985). Варианты секвенирования PSTVd, с отличиями в несколько нуклеотидов (около 40 разных вариантов длиной 359–360 п.н.), были разделены на штаммы по симптомам проявления: мягкие, средние, обычные и летальные (Herold et al., 1992; Lakshman, Tavantzis, 1993).

Для увеличения выхода виroidной РНК возможны несколько стратегий обогащения и специфического секвенирования виroidов. Один из вариантов – избавление от хозяйской рибосомальной РНК (Poojari et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Например, при анализе полной последовательности РНК растений винограда Syrah использована платформа 454 Life Sciences и обнаружены последовательности HSVd (hot stunt viroid – виroid, замедляющий рост хмеля), GYSVd (grapevine yellow speckle viroid – желтый крапчатый виroid винограда)



Ключевые моменты компьютерных алгоритмов, которые фильтруют перекрывающиеся малые РНК (PFOR)

и AGVd (australian grapevine viroid – австралийский вироид винограда). В этом исследовании присутствие известных вириодов в образце может быть подтверждено поиском гомологичных последовательностей при помощи таких платформ, как VirFind, VirusDetect или Virtool (Ho, Tzanetakis, 2014; Rott et al., 2017; Zheng et al., 2017a).

Поскольку дцРНК синтезируется вирусами и вириодами и не производится самим растением, то секвенирование общей дцРНК сильно увеличивает число последовательностей, специфичных для вириодов. Например, сравнение глубокого секвенирования общей РНК и дцРНК растений показало, что число ридов вируса возросло с 2 до 53% после обогащения по дцРНК (Al Rwahnih et al., 2009) (табл. 2). Более того, дцРНК-интермедиаты вириодов, или сателлитные РНК, также процессируются в малые интерферирующие РНК (миРНК) в растениях.

Инфицирование вириодом запускает продукцию большого количества производных перекрывающихся миРНК, которые покрывают геном с высокой плотностью (Di Serio et al., 2009) и могут составлять до 30% общих РНК, выделенных из растения. Вироидные и вирусные миРНК являются продуктами ответа иммунной системы хозяина на инфекцию и имеют специфический профиль распределения по размерам в различных видах благодаря Dicer-подобным белкам. При обогащении и секвенировании миРНК анализируют последовательность с помощью компьютерных алгоритмов, которые фильтруют перекрывающиеся малые РНК (filtering of overlapping small RNAs, PFOR) (Wu et al., 2012, 2015) (рисунок). Вироидные миРНК не могут быть собраны в полный геном вириода с помощью обычных алгоритмов сборки, таких как Velvet, в силу высокой гетерогенности популяции вири-

идов. Алгоритм PFOR оставляет вириодные миРНК, подходящие для сборки генома, прогрессивно удаляя миРНК, которые не перекрываются или перекрываются, но не могут быть собраны точно с повторяющимися РНК. Последние обновления этого алгоритма значительно увеличили производительность с помощью изменений в программе на стадии фильтрации, которая занимает более 90% времени (Zhang et al., 2014). Новый вироид – латентный вироид винограда (grapevine latent viroid, GLVd) – идентифицирован с помощью такого подхода.

Изменения в транскриптом при инфицировании вириодами

Чтобы понимать взаимодействие хозяйского растения и вириода, изучают транскриптом растений и обнаруживают изменения в экспрессии генов, участвующих в фотосинтезе, структуре клеточной стенки, РНК-регуляции, биосинтезе гормонов, метаболизме белков и прочих ответах на стресс, который вызывает вироид. В основном эти данные относятся к семейству *Pospiviroidae* (Karragantu et al., 2017; Xia et al., 2017; Zheng et al., 2017b). Например, изучение транскриптома огурца, инфицированного двумя вариантами HSVd, показало, что заражение вириодом ингибирует фотосинтез, нарушает гормональный гомеостаз и запускает основные защитные механизмы и экспрессию генов, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу (Xia et al., 2017). Листья хмеля, инфицированные HSVd, продемонстрировали основное отличие в дифференциальной экспрессии генов, которые отвечают за защиту, и генов, участвующих в липидном и терпеноидном метаболизмах (Karragantu et al., 2017). При полном анализе транскриптома растений хмеля,

инфицированных CBCVd, выявлено массивное изменение активности около 2000 генов, включая генов, ответственных у растения за иммунный ответ, фитогормональные сигнальные пути, фотосинтез, метаболизм пигментов, белков и сахаров (Mishra et al., 2018). Наиболее часто для исследований берут листья, но для секвенирования РНК томатов, зараженных двумя вариантами веретеновидности клубней картофеля – слабым и обычным, использовали корни растений. Результаты показали дифференциальную экспрессию генов, связанных с клеточной стенкой. На ранних этапах инфицирования их экспрессия была подавлена, а на поздних стадиях количество генов с возросшей экспрессией значительно увеличилось. Также обнаружено влияние на экспрессию генов, связанных с биосинтезом и сигнальными путями ауксина и цитокинов, которые критичны для развития латеральных корней. При сравнении двух вариантов инфекции выявлено, что обычный вариант вироида индуцирует транскрипционные изменения сильнее, чем слабый вариант, особенно на поздних стадиях инфицирования. Таким образом, инфицирование патогеном провоцирует ответ иммунной системы хозяина (Góra-Sochacka et al., 2019).

Заключение

NGS является эффективным инструментом метагеномики растений, диагностики и идентификации новых вироидов. Также NGS-технология – мощный способ решения вопросов, связанных с карантином растений, требующих быстрой и аккуратной идентификации вироидов и вирусов в образцах. Исследование вирома является важным для биобезопасности, так как многие вирусы и вироиды не обладают морфологическими эффектами, но в то же время быстрая изменчивость делает их источником разных угроз (Kochetov et al., 2017; Pooggin, 2018; Takahashi et al., 2019).

Список литературы / References

- Васильев Г.В. Геномика. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(1):158-165.
[Vasil'ev G.V. Genomics. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(1):158-165. (in Russian)]
- Barba M., Czosnek H., Hadidi A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*. 2014;6:106-136. DOI 10.3390/v6010106.
- Di Serio F., De Stradis A., Delgado S., Flores R., Navarro B. Cytopathic effects incited by viroid RNAs and putative underlying mechanisms. *Front Plant Sci*. 2013;3:288. DOI 10.3389/fpls.2012.00288.
- Di Serio F., Gisel A., Navarro B., Delgado S., Martínez de Alba A.E., Donvito G., Flores R. Deep sequencing of the small RNAs derived from two symptomatic variants of a chloroplastic viroid: implications for their genesis and for pathogenesis. *PLoS One*. 2009;4:e7539. DOI 10.1371/journal.pone.0007539.
- Di Serio F., Martínez de Alba A.E., Navarro B., Gisel A., Flores R. RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a nuclear-replicating viroid. *J Virol*. 2010;84:2477-2489. DOI 10.1128/JVI.02336-09.
- Diener T.O., Raymer W.B. Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science*. 1967;158:378-381. DOI 10.1126/science.158.3799.378.
- Eigen M. The origin of genetic information: Viruses as models. *Gene*. 1993;135:37-47. DOI 10.1016/0378-1119(93)90047-7.
- Flores R., Grubb D., Elleuch A., Nohales M.Á., Delgado S., Gago S. Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: variations on a theme. *RNA Biol*. 2011;8:200-206. DOI 10.4161/rna.8.2.14238.
- Flores R., Serra P., Moino S., Di Serio F., Navarro B. Viroids: from genotype to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. *Front Microbiol*. 2012;3:217. DOI 10.3389/fmicb.2012.00217.
- Flores R., Hernández C., Martínez de Alba A.E., Darós J.-A., Di Serio F. Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2005;43:117-139. DOI 10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243.
- Flores R., Owens R.A., Taylor J. Pathogenesis by subviral agents: Viroids and hepatitis delta virus. *Curr. Opin. Virol*. 2016;17:87-94. DOI 10.1016/j.coviro.2016.01.022.
- Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R., Malossini U., Yoshikawa N. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Res*. 2012;163:262-268. DOI 10.1016/j.virusres.2011.10.010.
- Góra-Sochacka A., Wiesyk A., Fogtman A., Lirski M., Zagórski-Ostoja W. Root transcriptomic analysis reveals global changes induced by systemic infection of *Solanum lycopersicum* with mild and severe variants of potato spindle tuber viroid. *Viruses*. 2019;11:992. DOI 10.3390/v11110992.
- Gross H.J., Domdey H., Lossow C., Jank P., Raba M., Alberty H., Sängler H.L. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*. 1978;273:203-208. DOI 10.1038/273203a0.
- Hadidi A., Flores R., Candresse T., Barba M. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. *Front Microbiol*. 2016;7:1325. DOI 10.3389/fmicb.2016.01325.
- Herold T., Haas B., Singh R.P., Boucher A., Sängler H.L. Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid (PSTVd) is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant Mol. Biol*. 1992;19:329-333. DOI 10.1007/BF00027356.
- Ho T., Tzanetakis I.E. Development of a virus detection and discovery pipeline using next generation sequencing. *Virology*. 2014;471-473; 54-60. DOI 10.1016/j.virol.2014.09.019.
- Kappagantu M., Bullock J.M., Nelson M.E., Eastwell K.C. Hop stunt viroid: Effect on host (*Humulus lupulus*) transcriptome and its interactions with hop powdery mildew (*Podosphaera macularis*). *Mol. Plant-Microbe Interact*. 2017;30:842-851. DOI 10.1094/MPMI-03-17-0071-R.
- Katsarou K., Rao A.L., Tsagris M., Kalantidis K. Infectious long non-coding RNAs. *Biochimie*. 2015;117:37-47. DOI 10.1016/j.biochi.2015.05.005.
- Kochetov A.V., Glagoleva A.Y., Strygina K.V., Khlestkina E.K., Gerasimova S.V., Ibragimova S.M., Shatskaya N.V., Vasil'yev G.V., Afonnikov D.A., Shmakov N.A., Antonova O.Y., Gavrilenko T.A., Alpat'yeva N.V., Khiutti A., Afanasenko O.S. Differential expression of NBS-LRR encoding genes in the root transcriptomes of two *Solanum phureja* genotypes with contrasting resistance to *Globodera rostochiensis*. *BMC Plant Biology*. 2017;17(251):41-50. DOI 10.1186/s12870-017-1193-1.
- Lakshman D.K., Tavantzis S.M. Primary and secondary structure of a 360-nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid. *Arch. Virol*. 1993;128:319-331. DOI 10.1007/BF01309442.
- Li R., Gao S., Hernandez A.G., Wechter W.P., Fei Z., Ling K.S. Deep sequencing of small RNAs in tomato for virus and viroid identification and strain differentiation. *Plos One*. 2012;7:e37127. DOI 10.1371/journal.pone.0037127.
- Loconsole G., Onelge N., Potere O., Giampetruzzi A., Bozan O. Identification and characterization of Citrus yellow vein clearing virus, a putative new member of the genus *Mandarivirus*. *Phytopathol*. 2012;102:1168-1175. DOI 10.1094/PHYTO-06-12-0140-R.
- Matousek J. Viroids: Sequence Variability and Evolution of Pathogenic RNA. *Plant Protection Science*. 2002;38:173-176. DOI 10.17221/10348-PPS.
- Mishra A.K., Kumar A., Mishra D., Nath V.S., Jakše J., Kocábek T., Killi U.K., Morina F., Matoušek J. Genome-wide transcriptomic analysis reveals insights into the response to citrus bark cracking viroid (CBCVd) in hop (*Humulus lupulus* L.). *Viruses*. 2018;10:570. DOI 10.3390/v10100570.
- Navarro B., Pantaleo V., Gisel A., Moxon S., Dalmay T., Bisztray G., Di Serio F., Burgyán J. Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant viroid interaction. *PLoS One*. 2009;4:e7686. DOI 10.1371/journal.pone.0007686.
- Oliver J.E., Fuchs M.F. Tolerance and resistance to viruses and their vectors in *Vitis* sp.: A virologist's perspective of the literature. *Am J Enol Vitic*. 2011;62:438-451. DOI 10.5344/ajev.2011.11036.
- Pooggin M.M. Small RNA-Omics for Plant Virus Identification, Virome Reconstruction, and Antiviral Defense Characterization. *Front Microbiol*.

- 2018;9:2779. DOI 10.3389/fmicb.2018.02779.
- Poojari S., Alabi O.J., Fofanov V.Y., Naidu R.A. A leafhopper-transmissible DNA virus with novel evolutionary lineage in the family Geminiviridae implicated in grapevine redleaf disease by next-generation sequencing. *PLoS One*. 2013;8:e64194. DOI 10.1371/journal.pone.0064194.
- Rott M., Xiang Y., Boyes I., Belton M., Saeed H., Kesanakurti P., Hayes S., Lawrence T., Birch C., Bhagwat B., Rast H. Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. *Plant Dis*. 2017;101:1489-1149. DOI 10.1094/PDIS-03-17-0306-RE.
- Rwahnih M., Daubert S., Golino D., Rowhani A. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*. 2009;387:395-401. DOI 10.1016/j.virol.2009.02.028.
- Takahashi H., Fukuhara T., Kitazawa H., Kormelink R. Virus Latency and the Impact on Plants. *Front Microbiol*. 2019;10:2764. DOI 10.3389/fmicb.2019.02764.
- Visvader J.E., Symons R.H. Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Res*. 1985;13:2907-2920. DOI 10.1093/nar/13.8.2907.
- Wu Q., Ding S-W., Zhang Y., Zhu S. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2015;53:425-444. DOI 10.1146/annurev-phyto-080614-120030.
- Wu Q., Wang Y., Cao M., Pantaleo V., Burgyan J. Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109:3938-3943. DOI 10.1073/pnas.1117815109
- Xia C., Li S., Hou W., Fan Z., Xiao H., Lu M., Sano T., Zhang Z. Global transcriptomic changes induced by infection of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with mild and severe variants of hop stunt viroid. *Front. Microbiol*. 2017;8:2427. DOI 10.3389/fmicb.2017.02427.
- Zhang Z., Qi S., Tang N., Zhang X., Chen S., Zhu P., Ma L., Cheng J., Xu Y., Lu M., Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004553. DOI 10.1371/journal.ppat.1004553.
- Zheng Y., Gao S., Padmanabhan C., Li R., Galvez M., Gutierrez D., Fuentes S., Ling K.-S., Kreuze J., Fei Z. VirusDetect: An automated pipeline for efficient virus discovery using deep sequencing of small RNAs. *Virology*. 2017;500:130-138. DOI 10.1016/j.virol.2016.10.017.
- Zheng Y., Wang Y., Ding B., Fei Z. Comprehensive transcriptome analyses reveal that potato spindle-tuber Viroid triggers genome-wide changes in alternative splicing, inducible trans-acting activity of phased secondary small interfering RNAs, and immune responses. *J. Virol*. 2017;91(11):e00247-17. DOI 10.1128/JVI.00247-17.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.11.2020. После доработки 15.12.2020. Принята к публикации 17.12.2020.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-04

Обзор

Мировой опыт создания пивоваренных сортов ячменя на основе беспротоцианидиновых мутантов

О.Ю. Шоева  

Аннотация: Актуальным направлением отечественной селекции ячменя в настоящее время является получение пивоваренных сортов. Поскольку именно от качества используемого сырья в первую очередь зависит качество готового продукта, пивоваренная промышленность предъявляет высокие требования к таким сортам. Одной из главных качественных характеристик пива является его стойкость при хранении, которая определяется временем помутнения пива и влияет, таким образом, на срок годности. Различают биологическое помутнение, образующееся в результате размножения микроорганизмов, и небактериальное (коллоидное), в основе которого лежит взаимодействие белков и полифенолов пива с образованием стабильных нерастворимых комплексов. Традиционная селекция пивоваренных сортов направлена на снижение содержания белка, однако, как показал мировой опыт, высококачественные сорта можно также получить с помощью снижения содержания в зерне полифенольных соединений. В обзоре суммированы данные о синтезе главных полифенольных компонентов коллоидного помутнения пива – проантоцианидинов, которые легли в основу получения пивоваренных беспротоцианидиновых сортов ячменя. Реализованный в мировой практике опыт может быть полезен при разработке отечественных селекционных программ, направленных на создание высококачественных пивоваренных сортов ячменя.

Ключевые слова: конденсированные танины; индуцированный мутагенез; пиво; флавоноиды; полифенолы.

Благодарности: Знакомство автора с коллекцией безантоциановых/беспротоцианидиновых мутантов ячменя в Лундском университете (Лунд, Швеция) поддержано грантом Swedish Institute Visby Programme No. 25896/2018. Публикация подготовлена в рамках работы по проекту Минобрнауки России «Курчатовский центр геномных исследований мирового уровня» № 075-15-2019-1662.

Для цитирования: Шоева О.Ю. Мировой опыт создания пивоваренных сортов ячменя на основе беспротоцианидиновых мутантов. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(1):23-33. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-04

Review

The world experience of malting barley cultivars breeding based on proanthocyanidin-free mutants

O.Yu. Shoeva  

Abstract: Currently, the breeding of the barley malting cultivars is a priority direction of the domestic breeding programs. Since the quality of the raw materials used determine primarily the quality of the beer, the brewing industry makes high demands on such cultivars. One of the main quality characteristics of beer is its haze stability, which determines shelf life of beer. There are two types of turbidity: biological one is resulted from the propagation of microorganisms, and nonbiological (colloidal) one is based on the interaction of proteins and polyphenols of beer with the formation of stable insoluble complexes. Traditional breeding of malting cultivars is aimed at reducing the protein content, however, high-quality cultivars can also be obtained by reducing the content of polyphenolic compounds in grain as well. Here, the data on studies of the main polyphenolic components of colloidal haze of beer proanthocyanidins is summarized. These data represented the basis for breeding of malting proanthocyanidin-free cultivars. The world experience implemented in practice can be useful for the development of domestic breeding programs aimed at creating high-quality malting barley cultivars.


Key words: condense tannins; induced mutagenesis; beer; flavonoids; polyphenols.


For citation: Shoeva O.Yu. The world experience of malting barley cultivars breeding based on proanthocyanidin-free mutants. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(1):23-33. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-04 (in Russian)

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Курчатовский геномный центр Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

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

Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 olesya_ter@bionet.nsc.ru

 Шоева О.Ю., 2021

Пиво – слабоалкогольный напиток, получаемый спиртовым брожением солодового суслу с помощью пивных дрожжей, обычно с добавлением хмеля. Сырьем для приготовления пива служит ячменный солод. Его получают из пивоваренных сортов ячменя в процессе солодоращения – проращивания зерна в контролируемых условиях с целью накопления в них ферментов, способных расщеплять глюкозы, крахмалы и белки зерна на необходимые для спиртового брожения компоненты (Главачек, Лхотский, 1977).

К пивоваренным сортам предъявляют ряд требований, обусловленных как технологическим процессом производства солода, так и качественными характеристиками готового продукта. В нашей стране существует многоступенчатая система оценки сортов пивоваренного ячменя, при успешном прохождении которой сорта могут быть рекомендованы для внесения в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на территории РФ (Кобелев и др., 2015). Система оценки сортов включает полевые испытания на госсортоучастках, где оценивают их урожайность, устойчивость к болезням, полегаемость и другие сельскохозяйственные признаки, и лабораторные исследования, в ходе которых определяют качество зерна (по таким показателям, как крупность и натура, способность прорасти на 5-й день, пленчатость, содержание белка и крахмала, массовая доля экстракта в сухом веществе ячменя) и качество приготовленного из него солода (содержание белка, некрахмальных полисахаридов, число Кольбаха, продолжительность осахаривания, массовая доля экстракта в сухом веществе солода) (Кобелев и др., 2015).

Одной из важных характеристик пивоваренных сортов является содержание белка. Хотя белок служит источником усвояемых дрожжами азотистых соединений и определяет пенную стойкость пива, его содержание в зерне пивоваренного назначения не должно превышать 11.5%. Более высокое содержание белка снижает экстрактивность (сумму растворенных веществ, которые при затирании переходят в суслу), затрудняет фильтрацию и вызывает коллоидное помутнение пива (Steiner et al., 2011). Помутнение является главной причиной пониженной стойкости пива, которая определяется временем от розлива пива до образования заметного помутнения. Различают биологическое помутнение, образующееся в результате размножения дрожжей или других микроорганизмов, и небиологическое (коллоидное), возникающее при нарушении коллоидного равновесия (Главачек, Лхотский, 1977). Коллоидное помутнение пива наступает с понижением температуры и исчезает при нагревании. При длительном хранении и воздействии кислорода воздуха, света, ионов металлов холодное помутнение превращается в необратимое, исчезающее. Если проблема биологического помутнения на сегодняшний день успешно решена путем использования пастеризации и обеспложивающей фильтрации, то вопрос коллоидного помутнения является более сложным и, несмотря на пристальное внимание ученых, до конца не решен. Сегодня известно, что основу коллоидного помутнения составляют белковая и полифенольная фракции, а также в незначительных количествах другие вещества, главным образом сахараиды и некоторые катионы (Steiner et al., 2010). Традиционная селекция

пивоваренных сортов ячменя направлена на снижение содержания белковой фракции, однако, как показал мировой опыт, снижение полифенольной фракции также может быть эффективным способом повышения качества и продолжительности хранения готового пива (von Wettstein, 2007).

Благодаря шведской программе индуцированного мутагенеза в 70–90-х гг. получена уникальная коллекция мутантов ячменя, насчитывающая более 700 индивидуальных линий, у которых был нарушен синтез флавоноидных соединений. С помощью теста на аллелизм идентифицированы тридцать групп комплементации, мутации в которых приводили к нарушению синтеза антоцианов и/или проантоцианидинов на различных стадиях их синтеза (Jende-Strid, 1993). Наибольший интерес для пивоваренной промышленности представляли мутанты, у которых был нарушен синтез проантоцианидинов. Эти полимерные соединения образуются в оболочке зерна ячменя и сначала из солода, а потом из суслу попадают в готовое пиво, где во время охлаждения способны связываться с белками и приводить к его помутнению. В ходе селекционных программ в ряде европейских стран на основе некоторых мутантов созданы и зарегистрированы высокоурожайные пивоваренные сорта (von Wettstein, 2007).

В представленном обзоре отражены результаты многолетних исследований флавоноидного метаболизма у ячменя с использованием коллекции индуцированных мутантов, которые легли в основу селекционных программ, направленных на преодоление проблемы коллоидного помутнения пива. Представленные данные могут быть полезны при разработке отечественных селекционных программ по созданию высококачественных сортов ячменя пивоваренного назначения.

Фенольные соединения пива и их роль в коллоидном помутнении

Фенольные соединения являются важными компонентами пива, определяющими его вкус, цвет, коллоидную стабильность (Wannenmacher et al., 2018). К этим соединениям относятся простые фенолы, содержащие одну фенольную группу, и полифенолы, имеющие в своем строении несколько фенольных групп. Источниками фенольных соединений пива является сырье, из которого его готовят – ячмень и хмель. В зерне ячменя фенольные соединения представлены свободными и связанными фенольными кислотами, лигнанами, фениламидами (конъюгатами фенольных кислот с аминами) и флавоноидами, в том числе их полимерной группой – проантоцианидинами. Наибольшее содержание фенольных кислот обнаружено во внешних слоях зерновок ячменя (чешуях, перикарпе, оболочке зерна, клетках алейрона), где они присутствуют в основном в связанном с полисахаридами клеточных стенок виде. При этом в алейроновом слое зерновок преобладает транс-феруловая кислота, а в цветковых чешуях – *p*-кумаровая (Nordkvist et al., 1984).

Хмель добавляют в пиво для придания горечи, приятного хмелевого аромата и повышения его микробиологической стабильности. Ценными ингредиентами хмеля являются твердые и мягкие смолы, полифенолы и эфирные масла. Как и у ячменя, фенольные соединения хмеля пред-

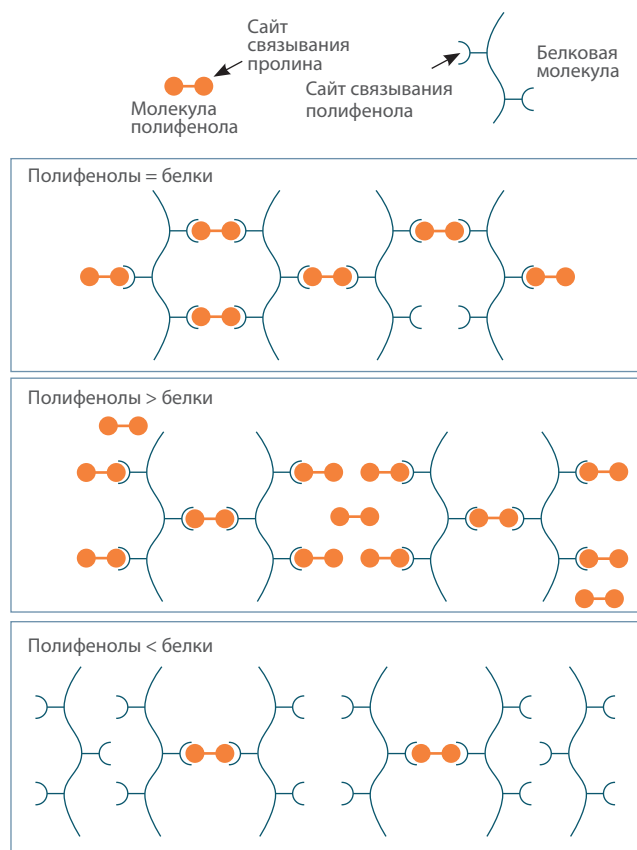


Рис. 1. Коллоидное помутнение пива связано со взаимодействием богатых пролином белков пива и полифенольных соединений (Siebert, Lynn, 1998)

Fig. 1. Beer haze formation is caused by interaction proline-rich proteins and polyphenolic compounds (Siebert, Lynn, 1998)

ставлены фенольными кислотами, моно- и олигомерными флавоноидными соединениями: флавонолами, гликозидами флавонолов (кемпферол, кверцетин), проантоцианидинами (Wannenmacher et al., 2018). Среди наиболее изученных фенольных соединений хмеля особое место занимает ксантогумол, обладающий высокой биологической активностью. Это соединение образуется из тетрагидроксихалкона с помощью реакции пренилирования и метилирования (Venturelli et al., 2016). Хотя ячменный солод содержит значительно меньше фенольных соединений на единицу массы, чем хмель, именно фенольные соединения ячменного происхождения составляют 70–80% всех фенольных соединений пива, вызывающих его коллоидное помутнение (Wannenmacher et al., 2018). Исследования компонентного состава помутнения показали, что активными в отношении помутнения белками являются богатые пролином запасные белки зерна ячменя – гордеины. При этом содержание пролина определяет степень помутнения: чем больше пролина, тем выше помутнение (Asano et al., 1982). Поиск фенольного компонента помутнения проведен с помощью модельной системы, в которой к активным в отношении образования помутнения белкам добавляли различные фенольные соединения. Так, установлено, что фенольные кислоты и большинство мономерных полифенолов ячменя и хмеля не

участвуют в формировании помутнения (Asano et al., 1984). Небольшое помутнение пива обнаружено при добавлении в систему мономеров проантоцианидинов – эпикатехина и катехина. Димеры (процианидин В3 и прodelьфинидин В3) и полимеры проантоцианидинов показали наибольшую активность в формировании помутнения, при этом чем выше степень полимеризации, тем большее помутнение наблюдалось (Asano et al., 1984; Siebert, Lynn, 1998). Исследование динамики помутнения в зависимости от соотношения в буферном растворе белков и полифенолов позволило предложить модель взаимодействия компонентов, согласно которой полифенольные соединения с как минимум двумя рядом расположенными гидроксильными группами связываются с пролинами разных белковых молекул с формированием сложных комплексов (рис. 1). При этом наиболее эффективное связывание наблюдается при почти равном соотношении полифенолов и связывающих их белков (Siebert, 1999).

Для решения проблемы коллоидного помутнения пива используют различные технологические приемы: хранение пива при низких температурах, добавление протеолитических ферментов или адсорбентов, специфических к активным в отношении образования помутнения белкам (силикагель) либо полифенолам (поливинилпирролидон).

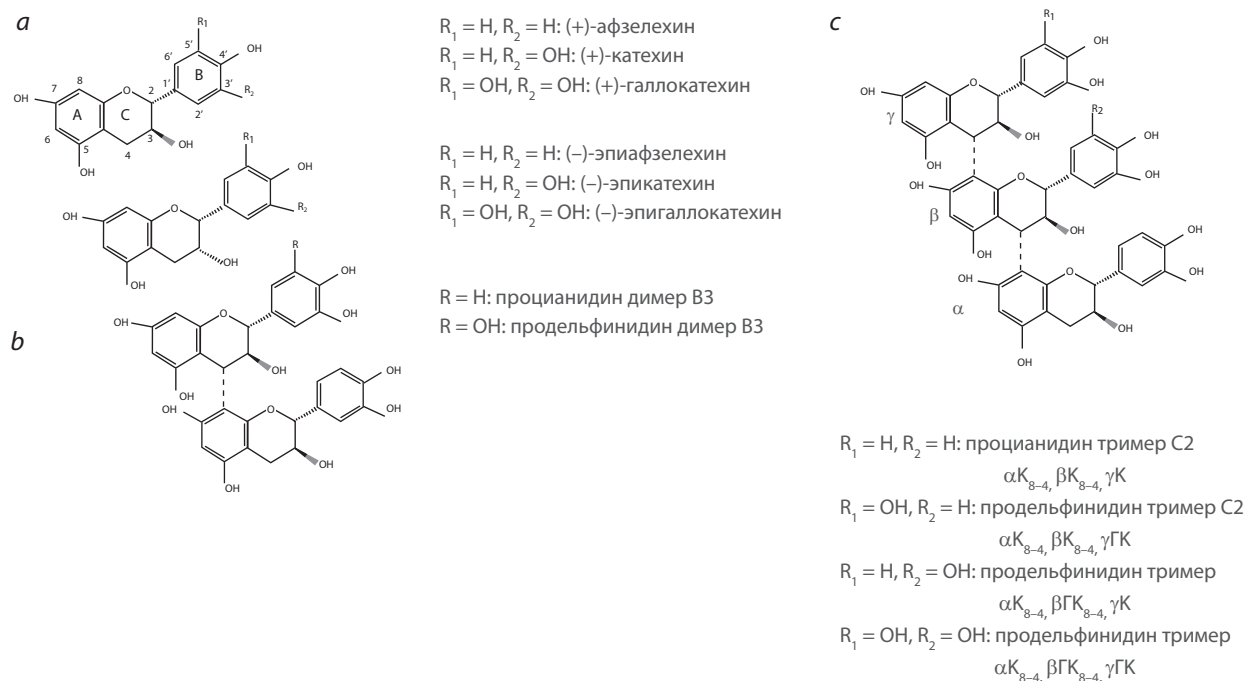


Рис. 2. Структура флаван-3-олов, являющихся мономерными единицами проантоцианидинов (a), проантоцианидиновые димеры (b) и тримеры (c) зерна ячменя (Jende-Strid, 1993)

K – катехин, GK – галлокатехин; (+) и (-) соответствуют транс- и цис-изоформам

Fig. 2. Structure of barley flavan-3-ols, that represent monomeric units of proanthocyanidins (a), dimeric (b) and trimeric (c) proanthocyanidins in barley grain (Jende-Strid, 1993)

K – catechin, GK – gallocatechin; (+) and (-) correspond to trans- and cis-isoforms

Перечисленные приемы помогают снизить концентрацию белков, полифенолов или обоих этих компонентов (Siebert, Lynn, 1998). Однако предложенные техники действуют достаточно неспецифически и помимо нежелательных компонентов удаляют из состава пива важные для его качества компоненты. В 70-х гг. прошлого века в качестве альтернативы технологической обработке готового пива для повышения его стабильности при хранении предложен и реализован нетрадиционный подход: снижение фракции проантоцианидинов в зерне пивоваренного назначения за счет введения в селекцию практики мутантных аллелей генов биосинтеза проантоцианидинов (von Wettstein, 2007). Это стало возможным благодаря полученным в Швеции индуцированным мутантам ячменя с нарушенным синтезом антоцианов и/или проантоцианидинов.

Проантоцианидины ячменя и их синтез

Проантоцианидины представляют собой олиго- и полимерные производные флаван-3-олов, относящихся к классу флавоноидов. Все флавоноиды имеют C15-углеродный скелет, состоящий из двух бензольных колец, A и B, соединенных C3-фрагментом, который с атомом кислорода образует C-кольцо (рис. 2). Степень окисления C-кольца определяет класс флавоноидного соединения (Бриттон, 1986). Флаван-3-олы являются наиболее восстановленной группой флавоноидов. У этих соединений гидроксильная группа в C3- и

фенил в C2-положениях могут быть расположены как в цис-ориентации (эпикатехины), так и транс-ориентации (катехины) относительно плоскости пирана.

Структура проантоцианидина зависит от типа мономеров (в том числе их пространственной организации), паттерна гидроксирования и этерификации их гидроксильных групп, степени полимеризации и типа связи между мономерами. Выделяют три класса проантоцианидинов: процианидины, продельфинидины и пропеларгонидины. Процианидинами называют олигомеры с гидроксильными группами в 3'- и 4'-положениях B-кольца, продельфинидины и пропеларгонидины являются смешанными олигомерами, в которых по крайней мере один из мономеров содержит гидроксильные группы в 3'-, 4'-, 5'-положениях и 4'-положении соответственно (Dixon et al., 2005). Мономерные единицы могут быть соединены тремя типами связи. Наиболее распространенной является B-связь C4 β → C8 α . Связь, при которой мономерные единицы соединены одновременно связями C2 β → O7 α и C4 β → C8 α , называется A-связью; она является более жесткой по сравнению с B-связью. Наконец, выделяют C-связь, в которой момеры соединены через C4 → C6 атомы углерода (Aron, Kennedy, 2008).

У ячменя проантоцианидины образованы (+)-катехиновыми (K) и (+)-галлокатехиновыми (GK) мономерными единицами. В зерне ячменя выявлены два димерных и четыре тримерных проантоцианидина, среди которых наиболее

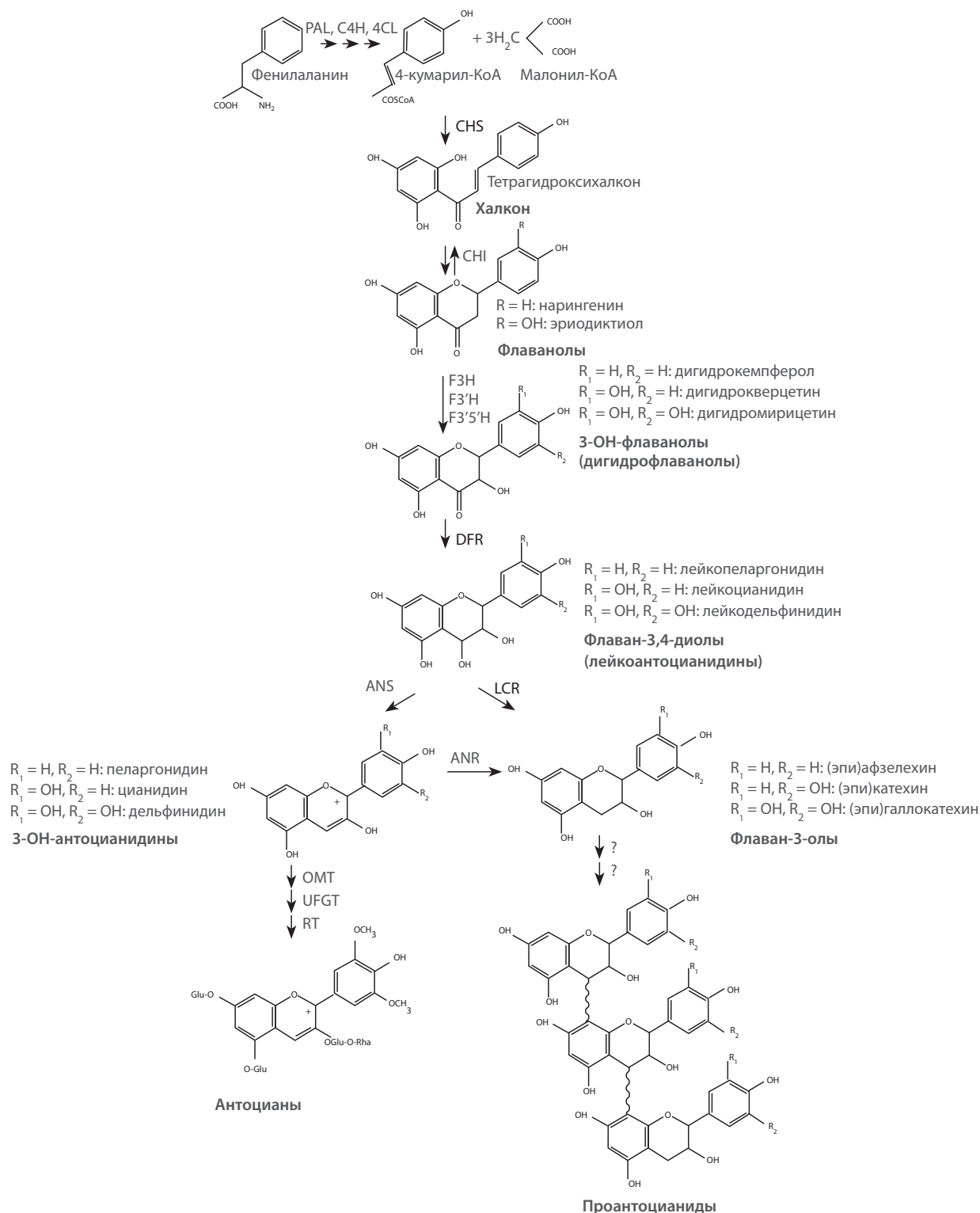


Рис. 3. Схема синтеза проантоцианидинов у растений (Jende-Strid, 1993; Winkel-Shirley, 2001)

4CL – 4-кумарат-КоА-лигаза; ANR – антоцианидинредуктаза; ANS – антоцианидинсинтаза; CHI – халконфлаванонизомераза; C4H – циннамат-4-гидроксилаза; CHS – халконсинтаза; DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза; F3H – флаванон-3-гидроксилаза; F3'H – флавоноид-3'-гидроксилаза; F3'5'H – флавоноид-3',5'-гидроксилаза; UFGT – UDP-флавоноид-3-O-гликозилтрансфераза; LCR – лейкоантоцианидинредуктаза; OMT – O-метилтрансфераза; PAL – фенилаланинаммияклаза; RT – рамнозилтрансфераза

Fig. 3. Schematic representation of the flavonoid biosynthesis pathway (Jende-Strid, 1993; Winkel-Shirley, 2001)

4CL – 4-coumarate-CoA ligase; ANR – anthocyanidin reductase; ANS – anthocyanidin synthase; CHI – chalcone-flavanone isomerase; C4H – cinnamate-4-hydroxylase; CHS – chalcone synthase; DFR – dihydroflavonol 4-reductase; F3H – flavanone 3-hydroxylase; F3'H – flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H – flavonoid 3',5'-hydroxylase; UFGT – UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase; LCR – leucoanthocyanidin reductase; PAL – phenylalanine ammonia-lyase; RT – rhamnosyltransferase

представленными являются процианидин В3, продельфинидин В3, процианидин С2 (αK_{8-4} , βK_{8-4} , γK) и продельфинидин С2 (αK_{8-4} , βK_{8-4} , γK) (Zimmermann, Galensa, 2007) (см. рис. 2).

Биосинтез всех флавоноидных соединений, включая проантоцианидины, начинается с фенилаланина (рис. 3). Фенилаланинаммиакилаза (PAL), циннамат-4-гидроксилаза (С4Н), 4-кумарат-КоА-лигаза (4CL), действуя поочередно, преобразуют фенилаланин в 4-кумарил-КоА. Последующая конденсация одной молекулы 4-кумарил-КоА и трех молекул малонил-КоА с помощью халконсинтазы (CHS) приводит к образованию тетрагидроксиалкона, который является предшественниками различных классов флавоноидных соединений. Под действием халконфлаванонизомеразы (CHI) тетрагидроксиалкон превращается в нарингенин. Последний является субстратом для ферментов, осуществляющих реакции гидроксирования С-кольца в положение С3 либо В-кольца в положение С3'. Так, нарингенин с помощью фермента флаванон-3-гидроксилазы (F3H) преобразуется в дигидрокемпферол (DHК), а с помощью флавоноид-3'-гидроксилазы (F3'H) – в эриодиктиол. Гидроксирование дигидрокемпферола с помощью F3'H или флавоноид-3',5'-гидроксилазы (F3'5'H) приводит к образованию дигидрокеверцетина (DHQ) или дигидромирицетина (DHМ) соответственно. Полученные дигидрофлавонолы восстанавливаются дигидрофлавонол-4-редуктазой (DFR) до соответствующих флаван-3,4-диолов – лейкопеларгонидина, лейкоцианидинина и лейкодельфинидина. Флаван-3,4-диолы являются субстратами для двух ферментов – антоцианидинсинтазы (ANS) и лейкоантоцианидинредуктазы (LCR). ANS преобразует флаван-3,4-диолы в соответствующие 3-ОН-антоцианидины – пеларгонидин, цианидин и дельфинидин, являясь специфическим для антоциановой ветви биосинтеза ферментом. В последующих этапах биосинтеза антоцианов участвуют ферменты, относящиеся к классам метил- (MT), гликозил- (GT) и ацилтрансфераз (AT).

LCR катализирует специфическое для синтеза проантоцианидинов NADPH-зависимое восстановление флаван-3,4-диолов до соответствующих 2,3-транс-флаван-3-олов, например (+)-катехина. У некоторых видов растений, например арабидопсиса и люцерны, проантоцианидины образуются цис-изоформами флаван-3-олов с участием антоцианидинредуктазы (ANR). Хотя активность фермента выявлена в развивающемся зерне ячменя, цис-изоформы флаван-3-олов в зерне не обнаружены (Dixon et al., 2005). Наименее исследованными на сегодняшний день остаются последние этапы сборки мономерных флаван-3-олов в проантоцианидиновые олигомеры (Dixon, Sarnala, 2020).

Коллекция безантоциановых/ беспроантоцианидиновых мутантов ячменя

Первоначальная коллекция мутантов ячменя с нарушенным синтезом антоцианов, легко выявляемых визуально, получена на селекционной станции в Свалёве (Швеция) в ходе программы радиационного мутагенеза, инициированной в 1928 г. Германом Нильсоном-Эле и Оке Густафссоном (Lundqvist, 2014). Коллекция насчитывала 52 мутанта, у 41 из которых наблюдалось снижение содержания антоцианов в

вегетативных органах по сравнению с исходными сортами, а у 11 – увеличение (Jende-Strid, 1978). С помощью качественных реакций на проантоцианидины, проводимых посредством замачивания зерна в растворах ванилина с HCl (Aastrup et al., 1984) или щелочи (Lamkin, Miller, 1980), под действием которых эти соединения приобретают коричневую окраску, выявлен первый мутант *ant13.13*, у которого отсутствие антоцианов в вегетативных органах сопровождалось отсутствием проантоцианидинов в зерне (Jende-Strid, 1978). Именно с него фактически началась программа селекции беспроантоцианидиновых сортов, инициированная пивоваренной компанией Carlsberg (Дания). Позже с введением в практику химического мутагенеза азид натрия получено еще 560 мутантов на более чем 80 сортах и селекционных линиях ячменя из Европы, Америки и Японии. В общей сложности на наличие проантоцианидинов в зерне протестировано более 8.5 млн растений M2, полученных после обработки мутагеном. Частота мутаций, обуславливающих нарушение синтеза этих соединений, оценена в 0.003% (von Wettsein, 2007). Позднее разработан метод прижизненного тестирования проантоцианидинов в зерне ячменя, заключающийся в локальном нарушении целостности оболочек зерна и обработки места среза реагентами для выявления проантоцианидинов (Kristensen, Aastrup, 1986). Благодаря разработанной методике идентифицированы дополнительные 107 мутантов, у которых был нарушен только синтез проантоцианидинов, тогда как мутации не влияли на синтез антоцианов (von Wettsein, 2007).

В настоящий момент коллекция, объединяющая мутантов с нарушенным синтезом, антоцианов и проантоцианидинов насчитывает 766 индивидуальных мутантов, которые с помощью тестов на аллелизм были сгруппированы в 30 групп комплементации, или локусов (табл. 1). Все идентифицированные локусы можно разделить на четыре группы. В первую группу входят локусы, мутации в которых приводят к одновременному отсутствию антоцианов в вегетативных органах и проантоцианидинов в зерне. К таким локусам относятся *Ant13*, *Ant17*, *Ant18*, *Ant21*, *Ant22* и *Ant30*. В следующую группу объединены локусы, мутации в которых затрагивают синтез антоцианов, но не проантоцианидинов. К ним относятся локусы *Ant1*, *Ant2*, *Ant5* и *Ant20*. Мутации в локусе *Ant20* приводят к усилению синтеза антоцианов, тогда как мутации в остальных локусах этой группы – к его подавлению. В третью группу входят локусы, мутации в которых подавляют синтез проантоцианидинов и не затрагивают синтез других групп флавоноидных соединений. В эту группу объединены локусы *Ant19*, *Ant25-29*. В последнюю, четвертую, группу отнесены локусы, мутации в которых снижают количество антоциановых пигментов в вегетативных органах. К ним относятся *Ant3*, *Ant4*, *Ant6-12*, *Ant14-16*, *Ant23* и *Ant24*. Эти локусы рассматривают как модуляторы биосинтеза антоцианов (Jende-Strid, 1993).

Исследование биохимического состава зерна ячменя и активности ферментов биосинтеза флавоноидов позволило определить функции ряда *Ant*-локусов, для некоторых из них выделены гены. Установлено, что *Ant18* кодирует DFR (Kristiansen, Rohde, 1991), *Ant30* – CHI (Druka et al., 2003), *Ant17* и *Ant22* – субъединицы F3H (Jende-Strid, 1993; Himi,

Таблица 1. Коллекция беспроантоцианидиновых/безантоциановых мутантов ячменя. Указана хромосомная локализация локуса; присутствие антоцианов в вегетативных органах и проантоцианидинов в зерне согласно данным B. Jende-Strid (1978, 1993); для каждого локуса представлен номер паспорта в Barley Genetics Stock (BGS, <https://www.nordgen.org/bgs/index.php>), содержащий его описание

Table 1. Collection of proanthocyanidin-free/anthocyanin-free barley mutants. The chromosomal localization of the locus and the presence of anthocyanins in vegetative organs and proanthocyanidins in grain according to B. Jende-Strid (1978, 1993) are indicated; a Barley Genetics Stock passport number (BGS, <https://www.nordgen.org/bgs/index.php>) for each locus containing its description is listed

№	Локус	Хромосомная локализация	Антоцианы в вегетативных органах	Проантоцианидины в зерне	BGS	Молекулярные функции	Источник литературы
Мутанты с нарушенным синтезом антоцианов и проантоцианидинов							
1	<i>Ant13</i>	6HL	–	–	598		
2	<i>Ant17</i>	3HS	–	–	599	Флаванон-3-гидроксилаза	Himi, Taketa, 2015
3	<i>Ant18</i>	3H	–	–	600	Дигидрофлаванол-4-редуктаза	Kristiansen, Rohde, 1991
4	<i>Ant21</i>	6H	–	–	603		
5	<i>Ant22</i>	2HL	–	–	604	Флаванон-3-гидроксилаза	Meldgaard, 1992
6	<i>Ant30</i>	5HL	–	–	610	Халконфлаванонизомераза	Druka et al., 2003
Мутанты с нарушенным синтезом антоцианов, но не проантоцианидинов							
7	<i>Ant1</i>	7HS	–	+	33	ТФ R2R3-MYB	Himi, Taketa, 2015b; Shoeva et al., 2015; Zakhrabekova et al., 2015
8	<i>Ant2</i>	2HL	–	+	80	ТФ bHLH	Cockram et al., 2010; Shoeva et al., 2016
9	<i>Ant5</i>	2HL или 5HL	–	+	596		
10	<i>Ant20</i>		↑	+	602		
Мутанты с нарушенным синтезом проантоцианидинов, но не антоцианов							
11	<i>Ant19</i>		+	–	601	Лейкоантоцианидин-редуктаза	Jende-Strid, 1993
12	<i>Ant25</i>		↓	–	605		
13	<i>Ant26</i>		+	–	606		
14	<i>Ant27</i>		+	–	607		
15	<i>Ant28</i>	3HL	+	–	608	ТФ R2R3-MYB	Himi et al., 2012
16	<i>Ant29</i>		+	↓	609		
Мутанты с количественными изменениями в содержании антоцианов/проантоцианидинов							
17	<i>Ant3</i>		↓	+	594		
18	<i>Ant4</i>	4H или 6H	↓	+	595		
19	<i>Ant6</i>		↓	+	597		
20	<i>Ant7</i>		↓	+			
21	<i>Ant8</i>		↓	+			
22	<i>Ant9</i>		↓	+			
23	<i>Ant10</i>		↓	+			
24	<i>Ant11</i>		↓	+			
25	<i>Ant12</i>		↓	+			
26	<i>Ant14</i>		↓	+			
27	<i>Ant15</i>		↓	+			
28	<i>Ant16</i>		↓	+			
29	<i>Ant23</i>	2HL или 5HL	↓	+	746		Druka et al., 2011
30	<i>Ant24</i>		↓	+	747		

Примечание. ↑ и ↓ – повышение и понижение содержания соединения; ТФ – транскрипционный фактор

Note. ↑ and ↓ mean increasing and decreasing of the content of compound; TF – transcription factor

Таблица 2. Коммерческие пивоваренные сорта ячменя, созданные на основе беспроантоцианидиновых мутантов
Table 2. Commercial barley varieties for brewing obtained based on proanthocyanidin-free mutants

Сорт	Родословная	Год создания	Организация	Источник литературы
Caminant	ant28.484 (Grit) × Blenheim	1994	Seet Plantbreeding (Хорсенс, Дания)	von Wettstein, 1995, 2007
Clarity		1993	CRISP Malting Group (Норфолк, Англия)	CLARITY. Proanthocyanidin-free malt, 1999
Galant	ant17.148 (Triumph)*	1985	Carlsberg Laboratory (Копенгаген, Дания)	van Harten, 1998
Gant	ant499 × Alexis*	1997	Seet Plantbreeding (Хорсенс, Дания)	Theuer, 2001
NFC 8808	ant27.488 (Zenit) × Sewa × Fergie	1994	Seet Plantbreeding (Хорсенс, Дания)	von Wettstein, 1995
Prominant	Caminant × Vintage	1999	Seet Plantbreeding (Хорсенс, Дания)	Briggs et al., 2004; Ingvordsen, 2014
Radiant	ant29.667 (Harrington) × Baronesse	2003	Washington State University Agricultural Research Center and the Idaho and Oregon AESs and USDA-ARS (США)	von Wettstein et al., 2004
Yeongbaekchal	Radiant × Saechalssal	2013	National Institute Crop Science, RDA (Ванджу, Республика Корея)	Lee et al., 2016

* по данным NordGen (<https://www.nordgen.org/bgs/index.php>)

Taketa, 2015a).

Кроме структурных генов, кодирующих ферменты биосинтеза, также идентифицированы локусы, мутации в которых произошли в регуляторных генах, кодирующих транскрипционные факторы. Среди них: *Ant2*, кодирующий bHLH-подобный регуляторный фактор, определяет синтез антоцианов в вегетативных органах, таких как ости, лемма, листовые влагалища, ушки листового влагалища (Cockram et al., 2010); *Ant1*, кодирующий MYB-подобный транскрипционный фактор, контролирует антоциановую окраску основания растения (Himi, Taketa, 2015b; Shoeva et al., 2015; Zakhrabekova et al., 2015).

Единственный выделенный к настоящему моменту регуляторный ген, специфически контролирующей накопление проантоцианидинов в зерновках ячменя, – *Ant28* – кодирует MYB-подобный транскрипционный фактор (Himi et al., 2012). Молекулярные функции для остальных двадцати пяти *Ant*-локусов до сих пор не установлены (см. табл. 1).

Использование мутантов для селекции пивоваренных сортов ячменя

В начале 1970-х гг. в лаборатории Carlsberg начата селекционная программа по созданию беспроантоцианидиновых пивоваренных сортов ячменя. С использованием классического селекционного подхода скрещивания и отбора мутантные аллели генов синтеза проантоцианидинов пере-

несены от доноров в коммерческие сорта (табл. 2). Сравнительные исследования линий с мутациями, одновременно нарушающими синтез антоцианов и проантоцианидинов, несмотря на высокие показатели коллоидной стабильности приготовленного из них пива, показали их неэффективность в качестве доноров из-за снижения урожайности полученных сортов и вкусовых качеств получаемого пива. Потери в урожайности мутантных линий по сравнению с родительскими сортами составляли до 20–25%, как, например, в случае мутантной линии *ant13.13*, полученной на основе сорта Foma. Авторы предположили, что наблюдаемое снижение урожайности обусловлено повышенной чувствительностью линии *ant13.13* к мучнистой росе (von Wettstein et al., 1977). Также низкой продуктивностью обладал сорт Galant, полученный в 1985 г. на основе мутанта *ant17.148* сорта Triumph (van Harten, 1998). Однако оценка качества солода высокопродуктивных рекомбинантных линий, полученных на основе мутантов *ant13* и *ant17*, продемонстрировала, что некоторые из них имели показатели экстрактивности, вязкости, содержания азота и число Кольбаха на уровне исходных сортов (von Wettstein et al., 1985).

Японские исследователи на основе линии *ant13.347* и пивоваренного сорта Haruna Nijo разработали селекционную линию Mokkei 92–130. Пиво, сваренное из Mokkei 92–130, показало превосходную коллоидную стабильность, однако в процессе хранения быстро теряло вкусовые характеристики, что может быть связано со снижением содержания

полифенольных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, и, как следствие, быстрым окислением ответственных за вкус компонентов пива (Fukuda et al., 1999).

Неудачные попытки использовать в селекции мутанты, у которых мутации затрагивали гены основного пути биосинтеза флавоноидов, объясняются важностью этих соединений в росте и развитии растений (Dixon et al., 2005). Чтобы минимизировать негативные последствия от таких мутаций, разработчики беспроантоцианидиновых сортов решили применять линии, в которых мутации затрагивали последние этапы синтеза проантоцианидинов, тогда как синтез других групп флавоноидных соединений, включая антоцианы, не менялся либо изменялся незначительно. На основе некоторых этих мутантов получены высокоурожайные сорта, успешно прошедшие полевые испытания и тестирования органолептических качеств и коллоидной стабильности.

Так, в 1994 г. в Дании зарегистрированы сорта NFC8808 [ant27.488 (Zenit) × Sewa × Fergie] и Caminant [ant28.484 (Grit) × Blenheim] – оба созданы на основе мутаций в локусах, специфических для синтеза проантоцианидинов. Урожайность сорта Caminant в 1991–1994 гг. превосходила стандарт на 4%. Полученный сорт не уступал распространенному в те годы в Европе пивоваренному сорту Alexis по качественным характеристикам зерна, солода и сусла, таким как индекс прорастания, экстрактивность, цвет сусла, содержание азота, диастатическая сила и содержание β-глюканов. Стойкость пива, сваренного из Caminant, была выше, чем стойкость, достигнутая с помощью технологических приемов (применение поливинилпирролидона на этапе фильтрации пива). Пиво, сваренное из NFC8808 и Caminant, не отличалось по вкусовым характеристикам и органолептическим свойствам от пива, сваренного из традиционных пивоваренных сортов ячменя, а также беспроантоцианидиновых сортов, но с добавлением индивидуальных проантоцианидинов и их различных комбинаций. Сделан важный вывод о том, что проантоцианидины не влияют на вкус пива (Delcour et al., 1984). NFC8808 и Caminant выращивали в промышленных масштабах для получения солода и производства пива на пивоварнях Carlsberg (von Wettstein, 2007).

Помимо Дании беспроантоцианидиновые сорта ячменя активно разрабатывали и тестировали в Великобритании. В сотрудничестве с лабораторией Carlsberg там создан высокопродуктивный качественный пивоваренный сорт Clarity (1999), который показал хорошую урожайность при выращивании в восточных областях страны. Испытания пилотных партий пива, приготовленных из этого сорта, показали его преимущества в сравнении с пивом, выполненным из традиционных сортов ячменя, по таким признакам, как пониженное содержание полифенолов и высокая коллоидная стабильность при хранении. Также продемонстрирована возможность использования более высоких температур (+4 °C по сравнению с –1 °C) для стабилизации готового пива. Однако распространения этот сорт не получил, поскольку имел пониженную экстрактивность¹. По коммерческим

соображениям авторы не обозначили мутантную линию, на основе которой выведен сорт Clarity, однако указанное в описании сорта наличие антоциановой пигментации на ушках и стебле² подразумевает, что этот сорт был создан на основе линии с мутацией в гене, специфичном для синтеза проантоцианидинов.

Еще один сорт на основе беспроантоцианидиновых мутантов – Radiant [ant29.667 (Harrington) × Baronesse] – создан в США в 2003 г. Помимо коллоидной стабильности, высокой урожайности, устойчивости к патогенным микроорганизмам сорт имел улучшенные пищевые характеристики: каши, приготовленные на его основе, имели светлый (не серый) цвет, что делает этот сорт привлекательным для использования не только в пивоваренной, но и пищевой промышленности (von Wettstein et al., 2004). На основе Radiant в Республике Корея выведен голозерный сорт пищевого назначения Yeongbaekchal [Radiant × Saechalssa] (Lee et al., 2016).

Создание беспроантоцианидиновых пивоваренных сортов ячменя возможно на основе мутантов с нарушенным синтезом флавоноидных соединений. Однако из-за плейотропного эффекта мутантные аллели большинства генов синтеза флавоноидов не могут быть использованы в селекции таких сортов, поскольку приводят к снижению урожайности и качественных характеристик солода и готового пива. Наиболее удачным оказался опыт использования в селекции беспроантоцианидиновых сортов мутантов, у которых мутации произошли в генах, контролирующих заключительные этапы синтеза проантоцианидинов, и которые, таким образом, оказывают наименьшее влияние на физиологические процессы, протекающие в организме растений.

Заключение

Анализ мирового опыта указывает на возможность улучшить пивоваренные сорта ячменя с помощью снижения содержания проантоцианидинов в зерне с использованием селекционно-генетических методов. Такой подход позволяет увеличить сроки хранения готового пива за счет повышения его коллоидной стабильности без применения дополнительных технологических приемов. Хотя созданные в прошлом столетии беспроантоцианидиновые сорта ячменя не получили широкого распространения среди крупных производителей, по-видимому, ввиду высокой стандартизации способа производства и ассортимента, сегодня такие сорта могут быть успешно использованы в ремесленном (крафтовом) пивоварении, характеризующемся высокой гибкостью ассортимента продукции, способностью быстро учитывать меняющиеся пожелания клиентов, а также новаторством и экспериментаторством.

Список литературы / References

- Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. Москва: Изд-во «Мир», 1986.
 [Britton G. Biochemistry of natural pigments. Moscow: Mir Publ., 1986. (in Russian)]
 Главачек Ф., Лхотский А. Пивоварение. Москва: Изд-во «Пищевая промышленность», 1977.

clarity-brewers-supply-group

² Clarity. Spring barley. 1998. Scottish Barley Variety Database. Доступно: <https://barley.agricrops.org/varieties/view/Clarity>

¹ CLARITY. Proanthocyanidin-free malt. 1999. CRISP Malting Group. Доступно: <https://www.yumpu.com/en/document/read/4110511/>

- [Glavachek F., Lkhotskiy A. Brewing. Moscow: Food Industry Publ., 1977. (in Russian)]
- Кобелев К.В., Данилян А.В., Селина И.В., Созинова М.С. Система оценки пивоваренных свойств селекционного ячменя. *Пиво и напитки*. 2015;2:40-42.
- [Kobelev K.V., Danilyan A.V., Selina I.V., Sozinova M.S. The evaluation system of brewing properties of barley breeding. *Pivo i Napitki = Beer and Beverage*. 2015;2:40-42. (in Russian)]
- Aastrup S., Outtrup H., Erdal K. Location of the proanthocyanidins in the barley grain. *Carlsberg Res. Commun.* 1984;49:105-109. DOI 10.1007/BF02913969.
- Aron P.M., Kennedy J.A. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008;52:79-104. DOI 10.1002/mnfr.200700137.
- Asano K., Ohtsu K., Shinagawa K., Hashimoto N. Affinity of proanthocyanidins and their oxidation products for haze-forming proteins of beer and the formation of chill haze. *Agric. Biol. Chem.* 1984;48(5):1139-1146. DOI 10.1080/00021369.1984.10866300.
- Asano K., Shinagawa K., Hashimoto N. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1982;40:147-154. DOI 10.1094/ASBCJ-40-0147.
- Briggs D.E., Boulton C.A., Brookes P.A., Stevens R. Brewing science and practice. England: Woodhead Publishing Limited, 2004.
- Cockram J., White J., Zuluaga D.L., Smit D., Comadran J., Macaulay M., Luo Z., Kearsey M.J., Werner P., Harrap D., Tapsell C., Liu H., Hedley P.E., Stein N., Schulte D., Steuernagel B., Marshall D.F., Thomas W.T.B., Ramsay L., Mackay I., Balding D.J., AGOUEB Consortium; Waugh R., O'Sullivan D.M. Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:21611-21616. DOI 10.1073/pnas.1010179107.
- Delcour J.A., Vandenberghe M.M., Dondeyne P., Schrevels E.L., Wijnhoven J., Moerman E. Flavour and haze stability differences in unhopped and hopped all malt Pilsner beers brewed with proanthocyanidin-free and with regular malt. *J. Inst. Brew.* 1984;90:67-72. DOI 10.1002/j.2050-0416.1984.tb04239.x.
- Dixon R.A., Sarnala S. Proanthocyanidin biosynthesis – a matter of protection. *Plant Physiology*. 2020;184:579-591. DOI 10.1104/pp.20.00973.
- Dixon R.A., Xie D.-Y., Sharma S.B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 2005;165:9-28. DOI 10.1111/j.1469-8137.2004.01217.x.
- Druka A., Franckowiak J., Lundqvist U., Bonar N., Alexander J., Houston K., Radovic S., Shahinnia F., Vendramin V., Morgante M., Stein N., Waugh R. Genetic dissection of barley morphology and development. *Plant Physiol.* 2011;155:617-627. DOI 10.1104/pp.110.166249.
- Druka A., Kudrna D., Rostoks N., Brueggeman R., von Wettstein D., Kleinhofs A. Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): physical, genetic and mutation mapping. *Gene*. 2003;302:171-178. DOI 10.1016/S0378-1119(02)01105-8.
- Fukuda K., Saito W., Arai S., Aida Y. Production of a novel proanthocyanidin-free barley line with high quality. *J. Inst. Brew.* 1999;105(3):179-183. DOI 10.1002/j.2050-0416.1999.tb00017.x.
- Himi E., Taketa S. Barley Ant17, encoding flavanone 3-hydroxylase (F3H), is a promising target locus for attaining anthocyanin/proanthocyanidin-free plants without pleiotropic reduction of grain dormancy. *Genome*. 2015a;58:43-53. DOI 10.1139/gen-2014-0189.
- Himi E., Taketa S. Isolation of candidate genes for the barley Ant1 and wheat Rc genes controlling anthocyanin pigmentation in different vegetative tissues. *Mol. Genet. Genomics*. 2015b;290:1287-1298. DOI 10.1007/s00438-015-0991-0.
- Himi E., Yamashita Y., Haruyama N., Yanagisawa T., Maekawa M., Taketa S. Ant28 gene for proanthocyanidin synthesis encoding the R2R3 MYB domain protein (Hvmyb10) highly affects grain dormancy in barley. *Euphytica*. 2012;188:141-151. DOI 10.1007/s10681-011-0552-5.
- Ingvordsen K. Climate change effects to plant ecosystems – genetic resources for future barley breeding. PhD thesis. Technical University of Denmark (DTU), Denmark. 2014.
- Jende-Strid B. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. *Hereditas*. 1993;119:187-204. DOI 10.1111/j.1601-5223.1993.00187.x.
- Jende-Strid B. Mutations affecting flavonoid synthesis in barley. *Carlsberg Res. Commun.* 1978;43:265-273. DOI 10.1007/BF02906553.
- Kristensen H., Aastrup S. A non-destructive screening method for proanthocyanidin-free barley mutants. *Carlsberg Res. Commun.* 1986;51:509-513. DOI 10.1007/BF02906893.
- Kristiansen K.N., Rohde W. Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavonol-4-reductase and molecular analysis of *ant18* mutants blocked in flavonoid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 1991;230:49-59. DOI 10.1007/BF00290650.
- Lamkin W.M., Miller B.S. Note on the use of sodium hydroxide to distinguish red wheats from white common, club, and durum cultivars. *Cereal Chem.* 1980;57:293-294.
- Lee M.-J., Kim Y.-K., Kim K.-H., Seo W.-D., Kang H.-J., Park J.-C., Hyun J.-nae, Park K.-H. Quality characteristics and development of naked waxy barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar "Yeongbaekchal" without discoloration of cooked barley. *Korean J. Breed. Sci.* 2016;48(4):529-534. DOI 10.9787/KJBS.2016.48.4.529.
- Lundqvist U. Scandinavian mutation research in barley – a historical review. *Hereditas*. 2014;151:123-131. DOI 10.1111/hrd2.00077.
- Meldgaard M. Expression of chalcone synthase, dihydroflavonol reductase, and flavanone 3-hydroxylase in mutants in barley deficient in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis. *Theor. Appl. Genet.* 1992;83:695-706. DOI 10.1007/BF00226687.
- Nordkvist E., Salomonsson A.-C., Åman P. Distribution of insoluble bound phenolic acids in barley grain. *J. Sci. Food Agri.* 1984;35:657-661. DOI 10.1002/jsfa.2740350611.
- Shoeva O.Y., Kukoeva T.V., Börner A., Khlestkina E.K. Barley *Ant1* is a homolog of maize *C1* and its product is part of the regulatory machinery governing anthocyanin synthesis in the leaf sheath. *Plant Breed.* 2015;134:400-405. DOI 10.1111/pbr.12277.
- Shoeva O.Y., Mock H.-P., Kukoeva T.V., Börner A., Khlestkina E.K. Regulation of the flavonoid biosynthesis pathway genes in purple and black grains of *Hordeum vulgare*. *PLoS ONE*. 2016;11(10):e0163e782. DOI 10.1371/journal.pone.0163782.
- Siebert K.J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1999;47(2):353-362. DOI 10.1021/jf980703o.
- Siebert K.J., Lynn P.Y. Comparison of polyphenol interactions with polyvinylpyrrolidone and haze-active protein. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1998;56(1):24-31. DOI 10.1094/ASBCJ-56-0024.
- Steiner E., Becker T., Gastl M. Turbidity and haze formation in beer – insights and overview. *J. Inst. Brew.* 2010;116(4):360-368. DOI 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00787.x.
- Steiner E., Gastl M., Becker T. Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: a review. *Eur. Food Res. Technol.* 2011;232:191-204. DOI 10.1007/s00217-010-1412-6.
- Theuer R.C. Proanthocyanidin-free barley food composition fortified with iron and methods of making and using. Patent US006274179B1. Aug. 14, 2001.
- van Harten A.M. Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- Venturelli S., Burkard M., Biendl M., Lauer U.M., Frank J., Busch C. Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition*. 2016;32(11-12):1171-1178. DOI 10.1016/j.nut.2016.03.020.
- von Wettstein D. Breeding of value added barley by mutation and protein engineering. Induced mutations and molecular techniques for crop improvement. Proceedings of a symposium. Vienna. 1995;67-76.
- von Wettstein D. From analysis of mutants to genetic engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2007;58:1-19. DOI 10.1146/annurev.arplant.58.032806.104003.
- von Wettstein D., Cochran J.S., Ullrich S.E., Kannangara C.G., Jitkov V.A., Burns J.W., Reisenauer P.E., Chen X., Jones B.L. Registration of 'Radiant' barley. *Crop Science*. 2004;44:1859-1860. DOI 10.2135/cropsci2004.1859.
- von Wettstein D., Jende-Strid B., Ahrenst-Larsen B., Sorensen J.A. Biochemical mutant in barley renders chemical stabilization of beer superfluous. *Carlsberg Res. Commun.* 1977;42:341-351. DOI 10.1007/BF02906119.
- von Wettstein D., Nilan R.A., Ahrenst-Larsen B., Erdal K., Ingversen J., Jende-Strid B., Kristiansen K.N., Larsen J., Outtrup H., Ullrich S.E. Proanthocyanidin-free barley for brewing: progress in breeding for high yield and research tool in polyphenol chemistry. Technical Quarterly of the Master Brewers' Association of America. 1985;22:41-52.

Wannenmacher J., Gastl M., Becker T. Phenolic substances in beer: structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2018;17:953-988. DOI 10.1111/1541-4337.12352.

Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 2001;126:485-493. DOI 10.1104/pp.126.2.485.

Zakhrabekova S., Dockter C., Ahmann K., Braumann I., Gough S.P., Wendt T., Lundqvist U., Mascher M., Stein N., Hansson M. Genetic

linkage facilitates cloning of *Ert-m* regulating plant architecture in barley and identified a strong candidate of *Ant1* involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 2015;88:609-626. DOI 10.1007/s11103-015-0350-x.

Zimmermann B.F., Galensa R. One for all-all for one: Proof of authenticity and tracing of foods with flavonoids – analysis of proanthocyanidins in barley and malt. *Eur. Food Res. Technol.* 2007;224(3):385-393. DOI 10.1007/s00217-006-0333-x.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.01.2021. После доработки 08.02.2021. Принята к публикации 09.02.2021.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-05

Методы

Создание библиотек баркодированных плазмид с помощью метода клонирования по Гибсону

А.В. Смирнов¹, А.М. Юнусова¹, А.А. Муравьева², Э.С. Валеев¹, В.С. Фишман^{1,2}, Н.Р. Баттулин^{1,2} ✉

Аннотация: Развитие методов секвенирования ДНК нового поколения стало одним из основных двигателей прогресса в биологических исследованиях последних лет. Эти методы позволили активно применять ДНК-баркодирование для решения широкого спектра биологических задач. Ключевым этапом работ с баркодированными молекулами ДНК является создание библиотеки баркодированных плазмид. Данная статья посвящена описанию методики с использованием клонирования по Гибсону. Клонирование методом Гибсона позволяет создавать сложные генетические конструкции, состоящие из большого числа фрагментов. Кроме того, этот метод допускает использование олигонуклеотидов с вырожденными позициями, что удобно для разработки баркодированных библиотек. Применение данной методики позволяет получать библиотеки с высоким разнообразием (более 105) баркодированных молекул. В статье описаны основные этапы создания баркодированной библиотеки, в частности рассмотрены принципы дизайна последовательностей баркодированных олигонуклеотидов и особенности сборки библиотек методом Гибсона. Приведены условия очистки реакционной смеси на магнитных частицах и оптимальные параметры электропорации созданных конструкций в клетки бактерий. Описаны протоколы наращивания культур бактериальных клонов, выделения плазмидной ДНК и очистки ее от молекул вектора, не несущих вставки, с помощью дополнительного гидролиза эндонуклеазами рестрикции и обработки препарата плазмидной ДНК экзонуклеазой Plasmid-Safe. Важным этапом работы являются характеристика полученного препарата и оценка разнообразия баркодированных молекул в библиотеке. В статье также представлено описание подготовки библиотеки для последующего секвенирования на платформе Illumina без использования амплификации. Кроме того, приведен алгоритм биоинформатического анализа данных секвенирования для оценки разнообразия баркодированных молекул. Полученная таким способом библиотека может быть использована в исследованиях для анализа индивидуальных молекул ДНК. Представленная в настоящем исследовании библиотека будет применена для изучения рекомбинации в ранних эмбрионах мыши.

Ключевые слова: ДНК-баркодирование; плазмидная библиотека; клонирование по Гибсону.

Благодарности: Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-70087.

Для цитирования: Смирнов А.В., Юнусова А.М., Муравьева А.А., Валеев Э.С., Фишман В.С., Баттулин Н.Р. Создание библиотек баркодированных плазмид с помощью метода клонирования по Гибсону. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(1):34-45. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-05

Methods

Creation of barcoded plasmids libraries using the Gibson cloning method

A.V. Smirnov¹, A.M. Yunusova¹, A.A. Muravyova², E.S. Valeev¹, V.S. Fishman^{1,2}, N.R. Battulin^{1,2} ✉

Abstract: The development of next-gen DNA sequencing methods has become one of the main drivers of progress in biological research in recent years. These methods made it possible to actively use DNA barcoding to solve a wide range of biological problems. The key step for working with barcoded DNA molecules is the creation of a library of barcoded plasmids. This protocol is devoted to the description of such a technique using the Gibson cloning approach. Gibson cloning allows the creation of complex genetic constructs from a large number of fragments. The method allows the use of oligonucleotides with degenerate positions, which is convenient for creating barcoded libraries. The application of the described technique allows one to obtain libraries with high diversity (more than 105) barcoded molecules. The article describes the main stages of the process of creating a barcoded library. In particular, the principles of the design of barcoded oligonucleotides are discussed. We also feature technical details of assembling libraries using the Gibson method. A protocol for growing bacterial clones, isolation of plasmid DNA and its purification from empty vectors using treatment of


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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 battulin@gmail.com

 © Смирнов А.В., Юнусова А.М., Муравьева А.А., Валеев Э.С., Фишман В.С., Баттулин Н.Р., 2021

the plasmid DNA preparation with plasmid-safe nuclease is described. An important stage in the work is the characterization of the obtained library and the assessment of the diversity of barcoded molecules in the library. We describe the preparation of the library for sequencing on the Illumina platform, and we present an algorithm for computational analysis of sequencing data to assess the real diversity of barcoded molecules. Library obtained by such method could be used in studying individual DNA molecules. Library from the current research will be used for studying recombination in early mouse embryos.

Key words: DNA barcoding; plasmid library; Gibson cloning.

For citation: Smirnov A.V., Yunusova A.M., Muravyova A.A., Valeev E.S., Fishman V.S., Battulin N.R. Creation of barcoded plasmids libraries using the Gibson cloning method. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(1):34-45. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-05 (in Russian)

Введение

Развитие методов секвенирования ДНК нового поколения привело к значительному прогрессу в биологических исследованиях последних лет. Рост доступности методов секвенирования не только позволил определить последовательности нуклеотидов в геномах человека, модельных и немодельных организмов, но и приступить к масштабным проектам чтения геномов, таким как The Darwin Tree of Life, нацеленным на прочтение геномов всех 60 тыс. эукариотических организмов, населяющих Великобританию и Ирландию. Однако помимо классического применения – для исследования существующих биологических молекул (геномы и транскриптомы организмов) – технологии секвенирования нового поколения можно использовать для узкоспециализированных задач. Например, с помощью антител, конъюгированных с ДНК-олигонуклеотидами, возможно количественно характеризовать антигенный профиль отдельных клеток (Arnold et al., 2018). В данном случае секвенирование олигонуклеотидов позволяет определять, какие из множества антител связались с клеткой. Такие олигонуклеотиды используют и в других экспериментах, когда необходимо детектировать отдельные молекулы. Искусственно синтезированная последовательность нуклеотидов ДНК служит уникальным идентификатором, который можно опознать после секвенирования. Эта последовательность и получила название ДНК-баркода (англ. barcode – штрихкод, маркировка).

Баркодированные молекулы позволяют решать широкий спектр биологических задач (Юнусова, Баттулин, 2016). В частности, с помощью мечения клеток ДНК-баркодированными лентивирусами показано, что клетки могут наследовать способность к репрограммированию в индуцированные плюрипотентные клетки (Yunusova et al., 2017). Благодаря баркодированным молекулам ДНК возможен многочисленный скрининг функциональных вариантов, влияющих на активность генов в массовых параллельных репортерных анализах (massively parallel reporter assays, MPRA) (Klein et al., 2020). Кроме того, недавно с помощью инъекций баркодированных молекул ДНК в пронуклеус зиготы мыши мы впервые показали чрезвычайно высокую активность гомологичной рекомбинации в ранних эмбрионах (Smirnov et al., 2020). Ключевым этапом работ с баркодированными молекулами ДНК является создание библиотеки баркодированных плазмид. Данная работа посвящена описанию такой методики с использованием клонирования по Гибсону (Gibson et al., 2009).

Клонирование по Гибсону – метод, который позволяет объединять несколько молекул ДНК, имеющих частично перекрывающиеся последовательности на концах (так называемые плечи). В настоящей работе мы применили этот способ для получения кольцевых молекул с парами баркодов, что позволило сохранить высокое разнообразие (более 10⁵) и равномерное распределение уникальных меток. Полученную библиотеку мы планируем использовать для инъекций в пронуклеус зигот, чтобы проанализировать процесс рекомбинации концов молекул при трансгенезе.

Материалы и методы

Целью исследования является получение конструкций, в которых в плазмидном векторе содержатся два баркода, разделенных спейсерным участком. Для сборки библиотеки мы разработали оптимальные для двух методов секвенирования (Nanopore и Illumina) последовательности баркодов, которые включили в одноцепочечные олигонуклеотиды с выступающими концами для перекрывания с плазмидным вектором и спейсерным участком (фрагменты, обозначенные синим и черным цветами, на рис. 1). Спейсерный участок (обозначен черным цветом) амплифицирован из человеческого генома (локус AAVS1). Для клонирования методом Гибсона мы смешали четыре фрагмента: линейризованный плазмидный вектор CAG-Cherry, два одноцепочечных олигонуклеотида с выступающими концами для перекрывания и спейсерный участок. После реакции Гибсона (NEBuilder HiFi DNA Assembly) мы провели электропорацию клеток Top10 *E.coli* разработанными конструкциями и получили около 160000 колоний (итоговое разнообразие библиотеки). После выделения плазмидной ДНК из клеток мы очистили ее от плазмид без встройки (исходного плазмидного вектора) и провели NGS-анализ библиотеки. Этапы исследования схематично представлены на рис. 1.

Этап 1: дизайн баркодированных олигонуклеотидов

Выбранные принципы конструирования баркодов зависят от целей эксперимента и планируемого разнообразия библиотеки. Плазмидная библиотека, протокол для клонирования которой представлен ниже, применяется для изучения рекомбинации молекул ДНК в эмбрионах с последующим анализом на платформах секвенирования третьего поколения (Oxford Nanopore, PacBio). К сожалению, у них есть значительный недостаток – высокая вероятность ошибочного прочтения нуклеотида. По нашему опыту, вероятность ошибки в конкретной букве составляет около 15%,

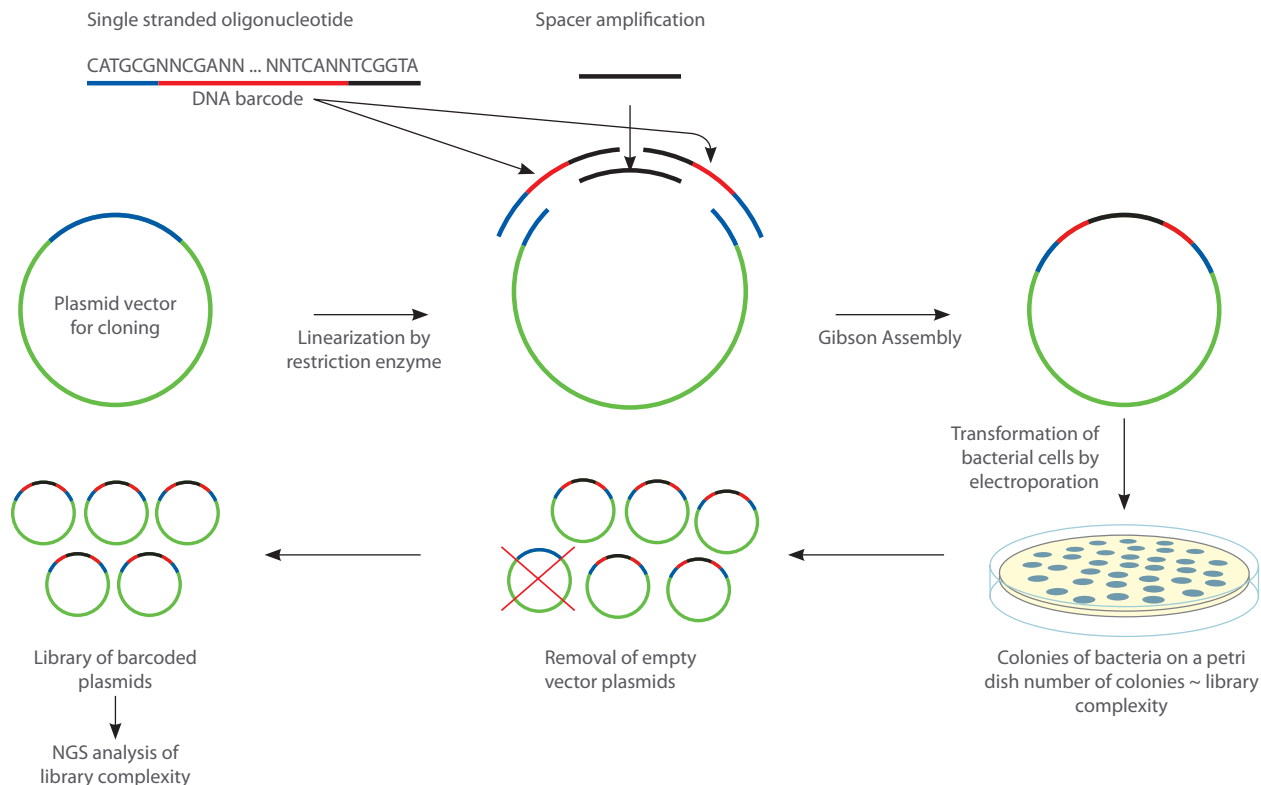


Рис. 1. Схема последовательности экспериментов по созданию библиотек баркодированных плазмид с помощью метода клонирования по Гибсону

Fig. 1. Experimental pipeline for creating barcoded plasmid libraries by using the Gibson cloning method

это означает, что ошибки будут возникать при чтении почти каждого баркода независимо от его длины. Разработанный нами дизайн баркода вида NNCGANNGCANNTGCNNAGCNNCTGNNTCANN отличается большей длиной (32 нуклеотида и из них 14 вырожденных позиций) по сравнению с обычно используемыми баркодами (Yunusova et al., 2017; Lebedev et al., 2019). При этом вероятность возникновения ошибки при чтении баркода составляет $14 * 0.15 = 2.1\%$. Однако реальное разнообразие готовой библиотеки составило около 160000 молекул – при таких параметрах вероятность из-за ошибок в прочтении перепутать его с другим баркодом из библиотеки составляет менее 0.1%. В баркодах постоянные триплеты нуклеотидов чередуются с вырожденными позициями, чтобы избежать неравновесия по GC-составу между баркодами. Несмотря на то что последовательности баркодов разработаны для секвенирования методами третьего поколения для изучения рекомбинации в эмбрионах, такой дизайн подходит и для секвенирования методом Illumina для анализа баркодированной библиотеки после сборки, который мы и описываем в настоящей работе.

Помимо баркодной части олигонуклеотиды должны содержать выступающие концы (плечи, overlaps) для сборки методом Гибсона. Один из таких концов олигонуклеотида должен перекрываться с участком линейаризованного вектора, другой – с ПЦР-продуктом, служащим спейсером

между баркодами (рис. 2). Температура отжига плеч должна быть выше 50 °C при длине 22–25 п.о. Перед началом клонирования олигонуклеотидов важно оценить разнообразие синтезированных олигонуклеотидов описанным ранее методом (Lebedev et al., 2019). Для этого необходимо включить полученные олигонуклеотиды в ПЦР-фрагмент, после чего провести его секвенирование методом Сэнгера. По полученным пикам в хроматограмме можно оценить представленность каждого нуклеотида в вырожденной позиции: в олигонуклеотидах хорошего качества в каждой из них должно быть четыре пика равной высоты. Финальная последовательность пары олигонуклеотидов представлена на рис. 2.

Этап 2: подготовка ДНК-фрагментов для сборки библиотеки

Материалы:

- программируемый ПЦР-амплификатор Bio-Rad,
- олигонуклеотиды для амплификации выбранного участка генома,
- реактивы для ПЦР с высокоточной Q5-полимеразой (NEB #M0493),
- набор для выделения ДНК из агарозного геля (Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean up, #740609.50),
- геномная ДНК человека с концентрацией ~50 нг/мкл,

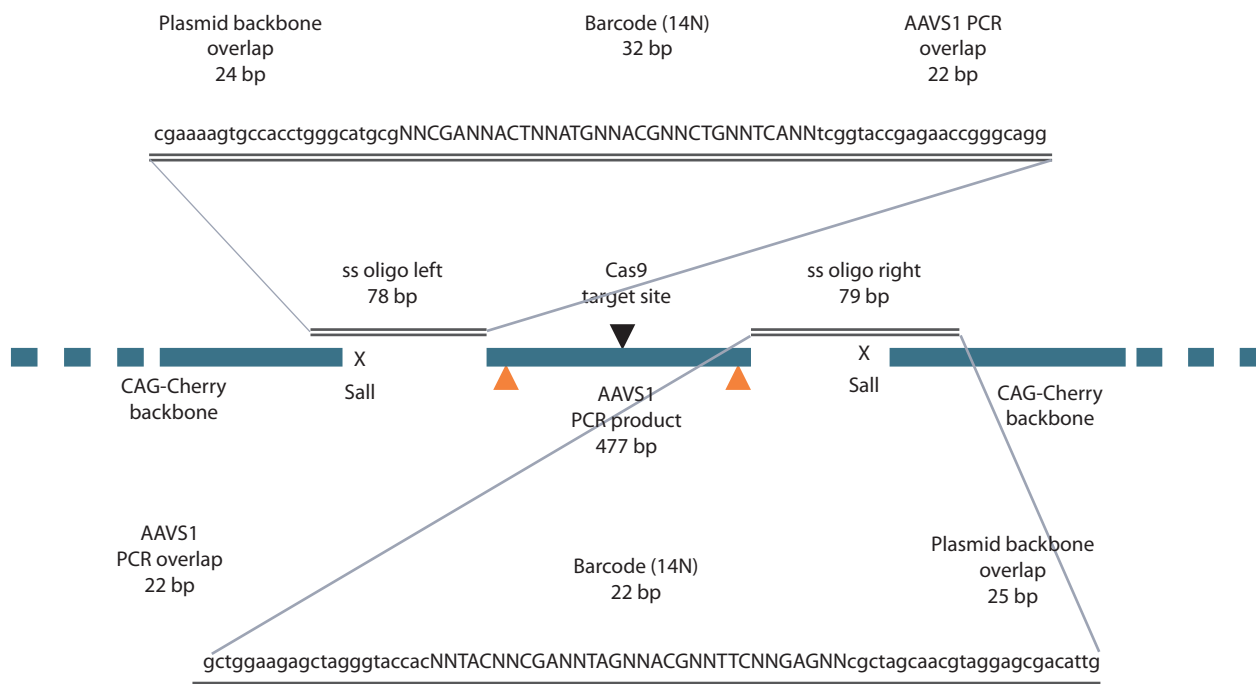


Рис. 2. Схема клонирования баркодов по методу Гибсона. В центре рисунка показаны ДНК-фрагменты, использованные для получения библиотеки. Одноцепочечные олигонуклеотиды синтезированы в разных ориентациях

Желтые треугольники – сайты KpnI, которые необходимы для инвертированной ПЦР. Cas9 target site – целевой сайт узнавания Cas9 с гРНК в AAVS1-локусе (5'-GGGCCACTAGGGACAGGAT-3' + TGG PAM); Sall – сайт узнавания одноименной эндонуклеазы рестрикции в исходном векторе; plasmid backbone overlap – плечо плазмидного вектора, barcode – баркод; AAVS1 PCR overlap – плечо ПЦР-продукта AAVS1; ss oligo left – левый одноцепочечный олигонуклеотид; ss oligo right – правый одноцепочечный олигонуклеотид; AAVS1 PCR product – ПЦР-продукт AAVS1; CAG-Cherry backbone – вектор CAG-Cherry

Fig. 2. Scheme of barcode cloning using Gibson method. DNA fragments used for cloning are depicted in the middle. Single-strand oligonucleotides were synthesized in opposite orientations

Yellow triangles are KpnI sites, which are required for inverse PCR. Cas9 target site is situated in the AAVS1 region (5'-GGGCCACTAGGGACAGGAT-3' + TGG PAM). Sall is the Sall restriction enzyme site in the initial vector

- рестриктаза Sall («СибЭнзим» #E115),
- плазида рCAGGS-Cherry (Addgene #41583) или другой вектор по выбору.

ПЦР-амплификация участка генома

Основное назначение описываемой плазмидной библиотеки – изучение рекомбинации на концах баркодированных молекул, поэтому необходимо разделить пары баркодов спейсерным участком (см. рис. 2). Спейсер используют для линеаризации плазмидной библиотеки в районе между баркодами с помощью рестриктаз или нуклеазы Cas9 и направляющих гРНК (single guide RNA). В качестве такого спейсерного участка в нашем случае выбран участок AAVS1 локуса человека (Chr19:55115511-55115987, 477 п.о.), так как он содержит несколько протестированных районов для направляющих гРНК.

Для ПЦР-амплификации участка генома человека применяют высокоточную полимеразу Q5 (NEB). Это необходимо, чтобы избежать мутаций в финальной библиотеке.

Последовательности праймеров для амплификации района AAVS1:

5'-TCGGTACCGAGAACCGGGCAGGTCACGC-3' (F), 5'-GTGGTACCTAGTCTTCCAGCCCCCTG-3' (R). Протокол проведения

ПЦР представлен в Приложении 1.

Целевой ПЦР-продукт должен иметь размер 477 п.н. и может быть выявлен методом геля-электрофореза в 2% агарозном геле с последующим выделением из геля на колонках (Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean up).

Линеаризация вектора

В качестве вектора для клонирования баркодированной библиотеки использовали плазмиду рCAGGS-Cherry (Addgene #41583). Мы внесли небольшую модификацию в районе сайта Sall, однако это не повлияло на общую схему клонирования.

Для получения линеаризованного вектора проводится инкубация с избытком фермента Sall. Протокол приведен в Приложении 2.

Реакционная смесь инкубируется при температуре 37 °C в течение 12–16 ч. Как правило, время инкубации можно сократить до нескольких часов, но с учетом того что присутствие в финальной библиотеке плазмид без баркодов («пустые» плазмиды) не желательно, этого лучше не делать. Обратного лигирования липких концов Sall в реакции Гибсона не происходит, о чем говорит низкий фон (менее 0.1%) в контрольной трансформации (см. ниже).

Линеаризованная плазида должна иметь размер 5475 п.о. при детекции методом геля-электрофореза в 1% агарозном геле. После выделения ДНК из геля желательнее сконцентрировать ее до 50–200 нг/мкл для удобного проведения реакции Гибсона.

Этап 3: сборка библиотеки методом Гибсона

Материалы:

- программируемый ПЦР-амплификатор,
- NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB #E2621),
- магнитные частицы AMPure XP (Beckman Coulter #A63880),
- магнитный штатив для 0.2 мкл пробирок,
- этанол 96%.

Клонирование методом Гибсона позволяет создавать сложные генетические конструкции из большого числа фрагментов (Gibson et al., 2009). Реакционная смесь содержит три фермента. Один из них – экзонуклеаза, которая отщепляет нуклеотиды с двуцепочечных концов ДНК в направлении 5'-3', оставляя выступающие 3'-концы длиной до нескольких сотен нуклеотидов. Одноцепочечные концы отжигаются между собой за счет перекрывающихся участков (overlaps), внесенных с праймерами, и высокоточная полимераз застраивает бреши в районах отжига 3'-концов. Наконец, T4-лигаза лигирует одноцепочечные разрывы между молекулами.

Для клонирования библиотеки методом Гибсона необходимо смешать ДНК-фрагменты и добавить к ним реакционную смесь ферментов. Приведенные ниже концентрации ДНК-фрагментов рассчитаны исходя из соотношения 1 : 6 : 10 : 10 (вектор : ПЦР-фрагмент : олигонуклеотид 1 : олигонуклеотид 2). Эти условия хорошо зарекомендовали себя для клонирования данной плазмидной библиотеки. В случае замены клонируемых ДНК-фрагментов следует оптимизировать их соотношение, подсчитав количество колоний после контрольных трансформаций.

Смешайте в пробирке на льду в указанном порядке:

1. 2.5 мкл ddH₂O,
2. 0.5 мкл (11.82 фмоль линеаризованного вектора pCAGGS-Cherry (5475 п.о., 40 нг),
3. 1 мкл (67.84 фмоль) ПЦР-продукта AAVS1 (477 п.о., 20 нг),
4. 0.5 мкл (124.4 фмоль) одноцепочечного олигонуклеотида 1 (78 п.о., 3 нг),
5. 0.5 мкл (122.8 фмоль) одноцепочечного олигонуклеотида 2 (79 п.о., 3 нг),
6. 5 мкл смеси NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix.

Общий объем реакции составляет 10 мкл. Реакционную смесь инкубируют при 50 °С в течение часа и затем хранят при температуре –20 °С.

Для контроля также следует поставить реакцию без одноцепочечных олигонуклеотидов, заменив их водой. Это позволит оценить число исходной «пустой» плазмиды в контрольной трансформации.

Дополнительная опция: очистка смеси на магнитных частицах. Несмотря на то что в протоколе производителя набора NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix не рекомендуется дополнительно очищать реакционную смесь перед электропорацией, это,

как правило, значительно улучшает эффективность трансформации. Для очистки можно использовать преципитацию этанолом или спин-колонки, однако оптимальным является метод связывания ДНК на магнитных частицах. С протоколом такой очистки можно ознакомиться в Приложении 3.

Этап 4: приготовление плазмидной баркодированной библиотеки

Материалы:

- бактериальный термошейкер,
- электропоратор для бактериальных клеток (MicroPulser Electroporator, Bio-Rad),
- кюветы для электропорации 1 мм (Bio-Rad #1652089),
- ультрацентрифуга с адаптерами под 50 мл пробирки,
- глицерин,
- набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Midiprep 2.0 («Евроген» #BC124) или аналог,
- набор diaGene для выделения плазмидной ДНК из бактерий («Диаэм» #3316.0250),
- ДНКаза Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase (Lucigen #E3101),
- рестриктаза Sall, («СибЭнзим» #E115),
- карбенициллин,
- жидкая среда LB (на 100 мл содержит: бактотриптон 1 г, бактериально-дрожжевой экстракт 0.5 г, NaCl 0.5 г),
- агаризованная среда LB (на 100 мл содержит: бактотриптон 1 г, бактериально-дрожжевой экстракт 0.5 г, NaCl 0.5 г, агар 1.5 г),
- среда SOC (на 100 мл содержит: бактотриптон 2 г, бактериально-дрожжевой экстракт 0.5 г, 10 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, 20 мМ глюкозы),
- электрокомпетентные клетки Top10 (с компетентностью не ниже 10⁹),
- рестриктазы SphI-HF (NEB #R3182), NheI-HF (NEB #R3131), KpnI-HF (NEB #R3142),
- буфер TE (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA).

Контрольная трансформация

Для оценки эффективности клонирования библиотеки следует поставить контрольную электропорацию с небольшим объемом реакции Гибсона. Все манипуляции проводят на льду. Один микролитр реакции (1/3 исходной реакции Гибсона, очищенной магнитными частицами) добавляют к электрокомпетентным клеткам Top10 (50 мкл). Электропорацию проводят в 1 мм кюветах при стандартных настройках (предварительные настройки, Ec1, 1.8 кВ) в приборе MicroPulser (Bio-Rad). После электропорации клетки быстро вымывают из кюветы в 1 мл среды SOC и инкубируют в бактериальном термошейкере (220 об/мин) при температуре 37 °С в течение 30 мин. Затем 1/10 объема клеток равномерно распределяют до выпитывания на чашке Петри с агаризованной средой LB и карбенициллином (100 мкг/мл). Чашку Петри с бактериями помещают в термостат и инкубируют при 37 °С в течение 14–18 ч.

Цель контрольной трансформации – оценить потенциальное число колоний (разнообразие библиотеки баркодов) с учетом всех факторов. Например, в представленном протоколе для контрольной трансформации использовано

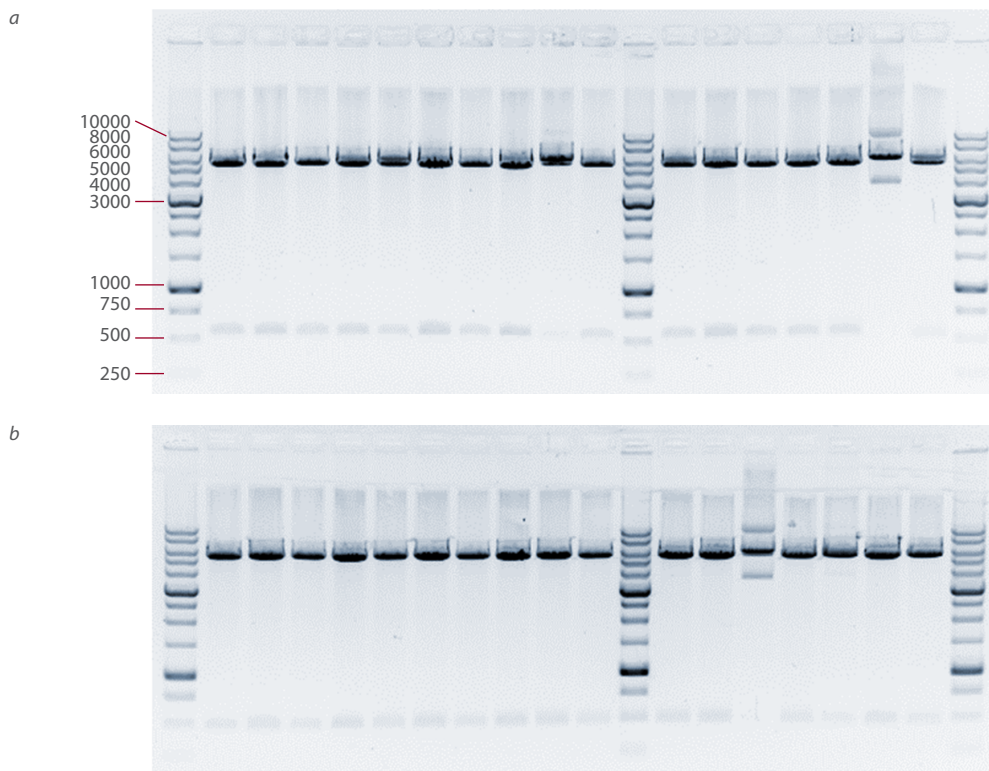


Рис. 3. Рестрикционный анализ субклонов плазмидной библиотеки. Для оценки выделяли плазмиды из случайных колоний, выросших на чашках после электропорации смеси реакции Гибсона. *a* – рестрикция по сайтам SphI и NheI. Сайты расположены на дальних (относительно ПЦР-фрагмента) 5'-концах баркодированных олигонуклеотидов (см. схему). Ожидаемый размер фрагментов – 5467 + 561 п.о. *b* – рестрикция по сайтам KpnI. Сайты расположены на внутренних (относительно ПЦР-фрагмента) 3'-концах баркодированных олигонуклеотидов. Ожидаемый размер фрагментов – 5545 + 483 п.о.

Fig. 3. Restriction analysis of the subclones from the barcoded plasmid library. Plasmids were purified from overnight incubations of random bacterial colonies, which were obtained after electroporation with Gibson reaction mix. *(a)* Restriction digestion at SphI and NheI sites. Sites are located at the distant (relative to the PCR fragment) 5'-ends of barcoded oligonucleotides (scheme). Predicted size of fragments 5467 + 561 b.p. *(b)* Restriction digestion at KpnI sites. Sites are located at the inner (relative to the PCR fragment) 3'-ends of barcoded oligonucleotides (scheme). Predicted size of fragments 5545 + 483 b.p.

1/3 стандартной реакции Гибсона и 1/8 от 50 мкл (разбавление 10% глицерином) с компетентностью 2×10^9 (Morrison, 2001). На чашку высажено 1/10 клеток из 1 мл SOC. Всего на чашке выросло 2 тыс. колоний. Это означает, что ожидаемое разнообразие библиотеки составляет $3 \times 8 \times 10 \times 2000 = 480000$ на 40 нг вектора (стандартная реакция Гибсона) при электропорации в 50 мкл неразбавленных клеток. Такая эффективность клонирования библиотеки является хорошим результатом, сравнимым с клонированием одиночных фрагментов методом Гибсона или рестрикции и лигирования (Lebedev et al., 2019).

Для предварительной характеристики библиотеки следует также провести рестрикционный анализ плазмидных субклонов. Случайным образом выбрать 15–20 колоний, нарастить ночные культуры в небольшом объеме LB и выделить плазмидную ДНК на колонках (miniprep) (набор diaGene для выделения плазмидной ДНК из бактерий). Для характеристики библиотеки следует выполнять рестрикционный анализ клонов с парой рестриктаз NheI-HF и SphI-HF, а также KpnI-HF, сайты для которых присутствуют в баркоди-

рованных олигонуклеотидах. С протоколом рестрикционного анализа можно ознакомиться в Приложении 4. Затем проводится детекция методом геля-электрофореза в 1% агарозном геле.

Предварительный рестрикционный анализ библиотеки показывает, правильно ли происходит встройка баркодов методом Гибсона (рис. 3). Следует обратить внимание на ожидаемый размер встройки, наличие «пустых» плазмид, а также на встречающиеся иногда некорректные варианты плазмид (см. рис. 3, два случая), которые связаны с мутациями в сайтах рестрикции ферментов KpnI, SphI или NheI. Детектируемые в районе олигонуклеотидов мутации (5–10% олигонуклеотидов) представляют собой нуклеотидные замены и небольшие делеции и связаны как с ошибками синтеза олигонуклеотидов, так и рекомбинацией при встройке олигонуклеотидов методом Гибсона. Если число мутантных олигонуклеотидов больше, необходимо заказать их у нового поставщика. Присутствие небольшого фона мутаций неизбежно и не влияет на общее качество библиотеки, так как при дизайне эксперимента сайты для рестриктаз или прай-

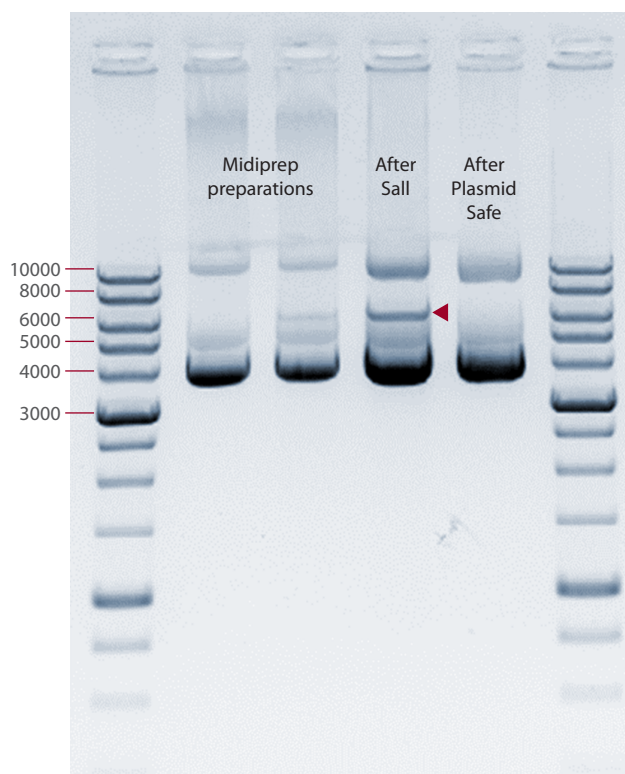


Рис. 4. Удаление «пустых» векторов из баркодированной библиотеки. На фореже представлены образцы баркодированной библиотеки в равных количествах. Выделенная ДНК-библиотека последовательно обработана рестриктазой Sall и экзонуклеазой Plasmid-Safe. После обработки линейные молекулы размером 6028 п.о. исчезают (соответствующий фрагмент обозначен черным треугольником). Число линейных молекул искусственно завышено, так как Sall дополнительно гидролизует молекулы по сайтам в небольшом проценте баркодов (3%), однако это создает заметный фрагмент на электрофореграмме, наглядно иллюстрирующий активность ДНКазы

Midiprep preparations – выделение midiprep; after Sall – после гидролиза ферментом Sall; after Plasmid-Safe – после обработки Plasmid-Safe

Fig. 4. Elimination of empty vectors from the barcoded plasmid library. Equal amounts of barcoded plasmid library samples were successively treated with Sall and Plasmid-Safe exonuclease. As can be seen, linear molecules of 6028 b.p. length disappear (fragment is indicated with black triangle). The amount of linear copies was increased artificially because Sall sites can be found in 3% of barcodes

меров можно выбрать на расстоянии от олигонуклеотидов. В некотором смысле мутации даже создают дополнительное разнообразие в библиотеке, но это нужно учитывать при биоинформатическом анализе данных NGS (см. ниже).

Финальная электропорация

После оценки примерного разнообразия библиотеки нужный объем реакции Гибсона добавляют к электрокомпетентным клеткам, чтобы получить планируемое число колоний. В нашем случае взяты 1 мкл очищенной реакции Гибсона (1/3 исходной реакции) и одна фасовка 50 мкл клеток с компетентностью 2×10^9 . Электропорацию проводят по описанному ранее протоколу. При работе с большим числом коло-

ний (>100000) оптимально использовать 6–8 крупных чашек Петри размером 23×23 см. Для получения качественной библиотеки клетки должны быть распределены по чашкам равномерно. Необходимо также аккуратно заливать чашки с агаром, так как неравномерная глубина агара приведет к различию в размере колоний. Затем чашки с бактериями помещают в термостат и инкубируют при 37°C в течение 14–18 ч. Подсчет колоний можно провести разделив чашку на равные секторы 4×4 см и оценив среднее число колоний в 5–6 секторах. При значительном разнообразии библиотеки такой метод позволяет достаточно точно оценить количество баркодов. В нашем случае число колоний составило около 150 тыс.

Для выделения плазмидной библиотеки из колоний их смывают с культуральных чашек средой LB (200–400 мл) и осаждают центрифугированием ($5000g$ 10 мин). Затем осадок клеток обрабатывают в зависимости от выбранного набора для выделения плазмидной ДНК. Смывого количества клеток хватает для получения ДНК-библиотеки около 400 мкг. Для увеличения выхода следует разбавить смывые клетки дополнительным объемом LB до низких значений оптической плотности (OD) (около 0.5) и инкубировать библиотеку несколько часов при 37°C для достижения оптимального OD (>2). Стоит отметить, что продолжительные инкубации >1 ч нежелательны, так как несинхронные деления клеток приводят к сдвигу представленности баркодов.

Дополнительная опция: заморозка клеток с глицерином для длительного хранения.

Необходимо ресуспендировать часть клеток с чашек в среде LB, смешанной с глицерином (финальная концентрация глицерина – 33%). Затем ресуспендированные клетки можно разделить на аликвоты по 1 мл, заморозить в азоте и поместить для длительного хранения при -80°C . После характеристики библиотеки глицериновые стоки можно использовать для наработки новой библиотеки с известными баркодами.

Удаление «пустых» векторов ДНКазой Plasmid-Safe

Полученную плазмидную библиотеку можно сразу использовать для экспериментов. Однако для некоторых задач, например для изучения рекомбинации между баркодированными молекулами, присутствие даже небольшого (менее 0.1%) числа исходных «пустых» векторов, без встройки, является нежелательным. Сначала исходные «пустые» векторы конвертируют в линейные молекулы за счет обработки плазмидной библиотеки рестриктазой Sall (сайты узнавания Sall должны разрушаться при встройке баркодированных фрагментов). ДНКазы Plasmid-Safe представляет собой экзонуклеазу, которая деградирует двухцепочечные линейные молекулы ДНК. В дополнение к удалению «пустых» векторов ДНКазная обработка Plasmid-Safe помогает удалить фрагменты бактериальной геномной ДНК и случайно линейризованные молекулы баркодированных плазмид, которые всегда присутствуют в плазмидных выделениях (см. например одну из двух дорожек геля плазмидной библиотеки midiprep на рис. 4). Полный протокол очистки экзонуклеазой Plasmid-Safe представлен в Приложении 5.

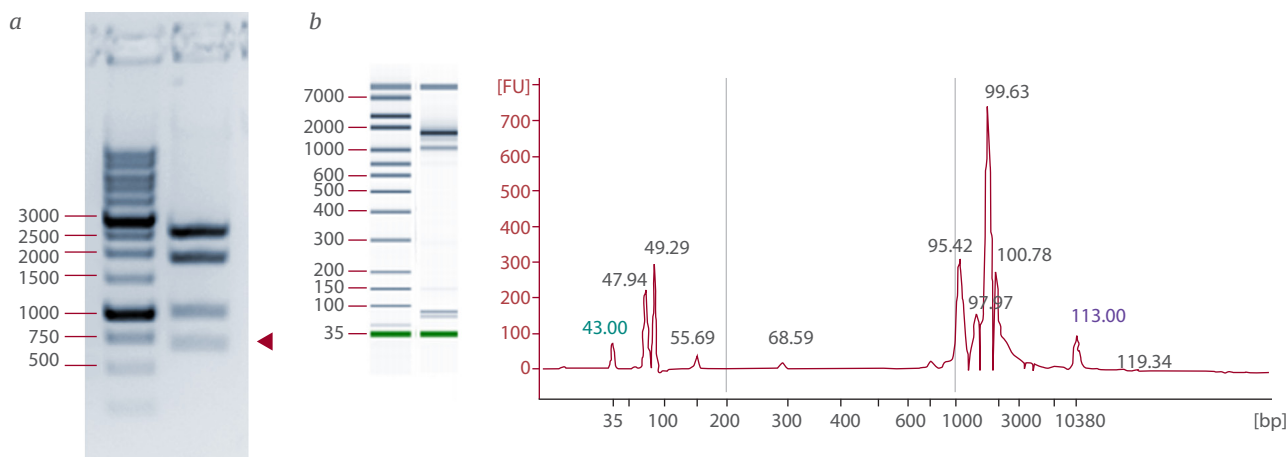


Рис. 5. Подготовка фрагмента с парой баркодов из плазмидной библиотеки для NGS. *a* – рестрикция плазмидной библиотеки по сайтам *SpeI* и *BspHI*. ДНК-фрагмент, отмеченный стрелкой (681 п.о.), содержит пары баркодов, разделенные сайтом AAVS1. *b* – анализ ДНК-библиотеки после лигирования адаптеров на приборе Bioanalyzer 2100

Исходя из этих данных, основная часть ДНК-фрагментов имеет размер в диапазоне 1000–2000 п.о., однако это является артефактом детекции из-за наличия на концах молекул одноцепочечных адаптеров, которые меняют подвижность молекул в геле. Как показывает дальнейший NGS-анализ, реальный размер библиотеки соответствует ожидаемому

Fig. 5. Preparation of fragments with barcode pairs for NGS. (*a*) Restriction digestion of initial library at *SpeI* and *BspHI* sites. Indicated DNA fragment (681 b.p.) contains barcode pairs separated by the AAVS1 site. (*b*) DNA library analysis on the Bioanalyzer 2100

These data imply that the main fraction of the fragments is in a 1000–2000 b.p. range. This is a mere artefact of detection, because attaching single-stranded adapters to the ends of the DNA molecules change mobility of the molecules in gel. The following NGS analysis revealed that the real size of the library matches well the predicted outcomes

Этап 5: подготовка библиотеки для NGS-секвенирования на приборе Illumina HiSeq X Ten в режиме парных чтений 2 × 150 п.о.

Материалы:

- КАРА HyperPrep Kit (Roche #07962312001) с адаптерами КАРА Unique Dual-Indexed Adapters (Roche #08278555702),
- магнитные частицы AMPure XP (Beckman Coulter #A63880),
- магнитный штатив для 0.2 мл пробирок,
- прибор Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific) с расходниками,
- прибор Bioanalyzer 2100 (Agilent) с расходниками,
- рестриктазы *SpeI*-HF (NEB #R3133) и *BspHI* (NEB #R0517),
- набор для выделения ДНК из агарозного геля (Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean up, #740609.50).

Рестрикция плазмидной библиотеки

Чтобы избежать рекомбинации или мутаций в парах баркодов, подготовку библиотеки для NGS рекомендуется проводить без стадии ПЦР-амплификации. Поэтому фрагмент с парой баркодов, разделенных сайтом AAVS1, вырезают из плазмиды при помощи рестриктаз. Важно отметить, что сайты рестрикции не должны располагаться дальше, чем 100 п.о. от баркодов (предел прочтения большинства приборов для массового параллельного секвенирования составляет 150 п.о.). Для плазмидной библиотеки на основе pCAGGS-Cherry, описанной в данном протоколе, следует использовать рестриктазы *SpeI*-HF и *BspHI*, сайты рестрикции которых расположены на расстоянии 7 и 62 п.о. от баркоди-

рованных олигонуклеотидов соответственно. С учетом того что целевой рестрикционный фрагмент составляет около 10% размера плазмиды, в реакцию рестрикции необходимо взять большое количество библиотеки. Полный протокол рестрикции представлен в Приложении 6.

Фрагмент ожидаемой длины (681 п.о.) (рис. 5, *a*) выделяют из геля с помощью соответствующего набора и используют для последующего лигирования адаптеров для NGS.

Лигирование фрагмента библиотеки с адаптерами для NGS

Для лигирования адаптеров на приборе Illumina HiSeq X Ten в режиме парных чтений 2 × 150 п.о. используют набор КАРА HyperPrep. Подготовка образцов проводят без стадии амплификации (Library Amplification). Подробный протокол представлен в Приложении 7 или на сайте производителя: <https://sequencing.roche.com/en/products-solutions/products/sample-preparation/dna-reagents/library-preparation/kapa-hyperprep.html>

Анализ ДНК-библиотеки и расчеты необходимого количества ДНК

Итоговый анализ концентрации ДНК-библиотеки проводят на приборах Qubit 4.0 и Bioanalyzer 2100. Определяемый размер итоговой библиотеки отличается от ожидаемого: 1000–2000 вместо ~800 п.о. (см. рис. 5, *b*). Это артефакт, который характерен для библиотек, приготовленных без стадии амплификации, и связан с наличием на концах целевых молекул одноцепочечных участков Y-адаптеров, которые замедляют движение молекул в геле.

Перед отправкой образцов на NGS необходимо оценить оптимальное число прочтений, с которым нужно секвенировать библиотеку. Для описанной в данном протоколе библиотеки с ожидаемым разнообразием ~150000 вариантов (см. оценку числа колоний ранее) оптимальное число прочтений можно оценить как «разнообразие» × 1000 ридов, т. е. ~150 млн ридов. Это соответствует ~100 пг ДНК-библиотеки в финальном образце для NGS.

Этап 6: анализ баркодов в данных NGS

Анализ проведен с использованием операционной системы Linux. При обработке данных использованы следующие вспомогательные программы:

1. Cutadapt v2.8 – распознавание и удаление технических последовательностей;
2. Python v3.7:
 - biopython: работа с данными секвенирования,
 - networkx: построение графов,
 - pandas/pandarallel: работа с таблицами,
 - scipy.stats: пакет для статистической обработки данных,
 - Levenstein: вычисление расстояния Левенштейна,
 - matplotlib: построение графиков.

Определение последовательности баркода в составе прочтения

Анализ данных секвенирования необходимо начинать с определения последовательности ДНК-баркода в составе рида. Для этого можно использовать два альтернативных подхода: определение баркода с помощью утилиты cutadapt (Martin, 2011) либо выравнивание рида на ожидаемую последовательность баркода с помощью алгоритма bwa (Li, Durbin, 2009). По нашему опыту, решить эту задачу можно с помощью обоих подходов, однако cutadapt позволяет сделать это быстрее и проще. Cutadapt запускали со следующими параметрами:

```
"cutadapt -j $threads -e $error_rate -g $seq_1R -g $seq_1F -G $seq_1R -G $seq_1F -O $search_length -o test_R1.fq -p test_R2.fq input_R1.fq input_R2.fq"
```

где:

- error_rate = 0.1 – допустимая доля ошибок в искомой последовательности;
- seq_1F, seq_1R – 15-буквенные фрагменты плазмиды, примыкающие к баркодам;
- search_length = 15 – минимальная длина перекрытия, равная длине искомого фрагмента (т. е. поиск фрагмента только внутри рида).

Определение правого и левого баркодов

Правый и левый баркоды в ридах определяли по уникальным последовательностям в окружении баркода. Если позиция обрезки совпала с предполагаемой (± 2 буквы) – рид считали подходящим: ему присваивали соответствующую букву (F или R) и с краю вырезали 34 буквы (длина баркода + 2).

Объединение баркодов в пары

Для определения пар баркодов использовали метод построения графа с помощью библиотеки NetworkX (Hagberg et al., 2008). Вершинами графа были последовательности баркодов, весами ребер – количество попаданий баркодов в пару. После отсека пар баркодов, подтвержденных не-

достаточным количеством ридов (cutoff level), составляли список баркодов и их пар, отсортированных по числу связей. Анализ этого списка позволяет получить оценку разнообразия библиотеки баркодированных молекул.

Заключение

Наша недавняя работа показала, что ДНК-баркоды не блокируют рекомбинацию на концах молекул трансгенов и даже помогают детектировать специфические паттерны рекомбинации (Smirnov et al., 2020). ДНК-баркоды нечасто применяют для изучения процессов рекомбинации. Как правило, в работах ведут анализ полиморфизмов в ДНК-последовательностях (SNP, сайты рестрикции), перенос которых между молекулами указывает на копирование генетического материала (genetic conversion) (Kan et al., 2014; 2017). Баркоды создают пул из тысяч индивидуально меченых молекул, каждая из которых может давать информацию о рекомбинации. Стоит отметить, что использование метода Гибсона позволяет осуществлять сборку большого числа фрагментов. К примеру, в описанном нами протоколе два фрагмента ДНК объединяются с двумя олигонуклеотидами. После подбора условий можно провести клонирование трех фрагментов ДНК и трех олигонуклеотидов, получив библиотеку плазмид с тремя сайтами баркодирования. Объединив две такие независимые библиотеки, можно получить мультибаркодированные плазмиды, содержащие пять – шесть баркодов по всей длине. Такой дизайн поможет в исследовании рекомбинации, которая происходит вдали от двухцепочечных концов молекул, что является приоритетной задачей для объяснения патологических путей рекомбинации (Verma, Greenberg, 2016; Piazza, Heyer, 2019). Прочтение мультибаркодированных библиотек можно осуществлять методами секвенирования третьего поколения (Nanopore, PacBio) для упрощения анализа баркодов.

Список литературы / References

- Юнусова А.М., Баттулин Н.Р. Методы маркирования клеток для изучения судьбы клеточных поколений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(6):909-917. DOI 10.18699/VJ16.211.
- [Yunusova A.M., Battulin N.R. Cell-marking techniques for cell lineage tracing. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(6):909-917. DOI 10.18699/VJ16.211. (in Russian)]
- Arnold A.E., Malek-Adamian E., Le P.U., Meng A., Martínez-Montero S., Petrecca K., Damha M.J., Shoichet M.S. 2018. Antibody-Antisense Oligonucleotide Conjugate Downregulates a Key Gene in Glioblastoma Stem Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;11:518-527. DOI 10.1016/j.omtn.2018.04.004.
- Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C.A., Smith H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods*. 2009;6(5):343-345. DOI 10.1038/nmeth.1318.
- Hagberg A., Swart P., Chult D. Exploring Network Structure, Dynamics, and Function Using NetworkX. *Proceedings of the 7th Python in Science Conference*. 2008;11-16.
- Kan Y., Ruis B., Lin S., Hendrickson E.A. The mechanism of gene targeting in human somatic cells. *PLoS Genet*. 2014;10(4):e1004251. DOI 10.1371/journal.pgen.1004251.
- Kan Y., Ruis B., Takasugi T., Hendrickson E.A. Mechanisms of precise genome editing using oligonucleotide donors. *Genome Res*. 2017;27(7):1099-1111. DOI 10.1101/gr.214775.116.
- Klein J.C., Agarwal V., Inoue F., Keith A., Martin B., Kircher M., Ahituv N., Shendure J. A systematic evaluation of the design and context dependencies of massively parallel reporter assays. *Nat. Methods*.

- 2020;17:1083-1091. DOI 10.1038/s41592-020-0965-y.
- Lebedev M.O., Yarinich L.A., Ivankin A.V., Pindyurin A.V. Generation of barcoded plasmid libraries for massively parallel analysis of chromatin position effects. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(2):203-211. DOI 10.18699/VJ19.483.
- Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25:1754-1760. DOI 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011;17:10. DOI 10.14806/ej.17.1.200.
- Morrison S.L. Transformation of *E. coli* by Electroporation. In: Current Protocols in Immunology. USA, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- Piazza A., Heyer W.-D. Homologous recombination and the formation of complex genomic rearrangements. *Trends Cell Biol*. 2019;29(2):135-149. DOI 10.1016/j.tcb.2018.10.006.
- Smirnov A., Fishman V., Yunusova A., Korablev A., Serova I., Skryabin B.V., Rozhdestvensky T.S., Battulin N. DNA barcoding reveals that injected transgenes are predominantly processed by homologous recombination in mouse zygote. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(2):719-735. DOI 10.1093/nar/gkz1085.
- Verma P., Greenberg R.A. Noncanonical views of homology-directed DNA repair. *Genes Dev*. 2016;30(10):1138-54. DOI 10.1101/gad.280545.116.
- Yunusova A.M., Fishman V.S., Vasiliev G.V., Battulin N.R. Deterministic versus stochastic model of reprogramming: new evidence from cellular barcoding technique. *Open Biol*. 2017;7:160311. DOI 10.1098/rsob.160311.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.12.2020. После доработки 08.02.2021. Принята к публикации 24.02.2021.

Приложение 1

Условия реакции с Q5-полимеразой:

1. 32.5 мкл ddH₂O,
2. 10 мкл буфера Q5 5x,
3. 1 мкл дНТФ 10 мМ (финальная концентрация 200 мкМ),
4. 2.5 мкл праймера F 10 мкМ (финальная концентрация 0.5 мкМ),
5. 2.5 мкл праймера R 10 мкМ (финальная концентрация 0.5 мкМ),
6. 0.5 мкл Q5-полимеразы (финальная концентрация 0.02 ед/мкл),
7. 1 мкл (50 нг) геномной ДНК.

Итоговый объем 60 мкл.

Условия ПЦР: начальная денатурация ДНК – 98 °С в течение 30 с с последующей амплификацией (35 циклов), включая денатурацию при 98 °С – 15 с, отжиг праймеров при 60 °С – 30 с и элонгацию при 72 °С – 1 мин. Финальная элонгация: 72 °С – 3 мин.

Приложение 2. Протокол проведения реакции рестрикции с ферментом Sall

Смешать в пробирке на льду в указанном порядке:

1. 50-Х мкл ddH₂O, где Х – объем остальных компонентов;
2. 5 мкл буфера O («СибЭнзим») 10x;
3. 2 мкл (20U) Sall;
4. 0.5–5 мкл (3 мкг) плазмиды pCAGGS-Cherry.

Приложение 3

Для очистки 10 мкл реакции Гибсона на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter) необходимо:

1. Предварительно нагреть раствор магнитных частиц до комнатной температуры (30 мин).
2. Перемешать раствор на вортекс-миксере. Добавить раствор частиц к реакционной смеси Гибсона в соотношении 1 : 1 (в нашем случае 10 мкл). Ресуспендировать.
3. Инкубировать 10–15 мин при комнатной температуре, чтобы ДНК связалась с частицами.
4. Поставить смесь в магнитный штатив и дождаться осаждения частиц на стенке пробирки. Это занимает 5–10 мин.
5. Не вынимая пробирки из штатива дважды промыть частицы большим объемом свежеприготовленного 80% этанола. Убрать этанол.
6. Дождаться испарения излишков этанола при комнатной температуре в течение 3–5 мин. Важно не допустить пересыхания осадка, поэтому нужно контролировать процесс высыхания визуально. Осадок магнитных частиц должен иметь матовый блеск без трещин. Пересушивание частиц приводит к снижению выхода ДНК после элюции.
7. Ресуспендировать подсушенные частицы в подходящем объеме ddH₂O (3–10 мкл) для элюции ДНК. Инкубировать раствор 5–10 мин при комнатной температуре. Вернуть пробирки в магнитный штатив и дождаться осаждения частиц на стенке пробирки. Отобрать чистый раствор ДНК – его можно сразу использовать для электропорации клеток или хранить при –20 °С.

Приложение 4. Протокол рестрикционного анализа библиотеки

Смешайте в пробирке на льду в указанном порядке:

1. 30-Х мкл ddH₂O, где Х – объем остальных компонентов;
2. 3 мкл буфера CutSmart 10x;
3. 0.1 мкл SphI-HF (2U) + 0.1 мкл NheI-HF (2U) или 0.1 мкл KpnI-HF (2U);
4. 0,5–5 мкл плазмидного клона (1 мкг).

Реакция инкубируется при 37 °С в течение 2 ч.

Приложение 5. Протокол очистки библиотеки от линейных молекул экзонуклеазой Plasmid-Safe

Для удаления линейных плазмидных молекул из раствора плазмидной библиотеки сначала смешайте плазмидную библиотеку с рестриктазой Sall в пробирке на льду в указанном порядке:

1. 200-Х мкл ddH₂O, где Х – объем остальных компонентов;
2. 20 мкл буфера O («СибЭнзим») 10x;
3. 5 мкл (50U) Sall;
4. 10–100 мкл (50 мкг) плазмидной библиотеки.

Инкубировать при 37 °С в течение 2 ч и очистить ДНК переосаждением этанолом на спин-колонках или магнитных частицах, элюировав в 50 мкл буфера TE. Затем смешать следующую реакцию на льду:

1. 250-Х мкл ddH₂O, где Х – объем остальных компонентов;

2. 25 мкл буфера Plasmid-Safe 10x;
3. 10 мкл АТФ 25 мМ (финальная концентрация 1 мМ);
4. 15 мкл (150U) ДНКазы Plasmid-Safe;
5. 10–100 мкл (~50 мкг) Sall-обработанной плазмидной библиотеки.

Общий объем реакции составляет 250 мкл. Реакция инкубируется при 37 °С в течение 2 ч, затем проводят инактивацию фермента при 70 °С в течение 30 мин. Далее реакцию необходимо переосадить спиртом, очистить на спин-колонке или магнитных частицах. Финальный раствор плазмидной библиотеки в буфере TE можно использовать для дальнейших экспериментальных задач, включая NGS-секвенирование библиотеки.

Приложение 6. Протокол линеаризации библиотеки перед секвенированием

Смешайте в пробирке на льду в указанном порядке:

1. 50-X мкл ddH₂O, где X – объем остальных компонентов;
2. 5 мкл буфера CutSmart 10x;
3. 1 мкл (20U) SpeI-HF;
4. 2 мкл (20U) BspHI;
5. 4–40 мкл (20 мкг) плазмидной библиотеки.

Приложение 7. Протокол подготовки библиотеки к секвенированию

Шаг 1. Достройка концов и аденирование (End Repair and A-Tailing)

Смешайте в пробирке на льду в указанном порядке:

1. 50 мкл ДНК (300 нг), разбавленной в ddH₂O;
2. 7 мкл буфера End Repair & A-Tailing;
3. 3 мкл End Repair & A-Tailing Enzyme Mix.

Общий объем реакции составляет 60 мкл. Смесь инкубируется при 20 °С в течение 30 мин, затем при 65 °С в течение 30 мин.

Шаг 2. Лигирование адаптеров (Adapter Ligation)

Смешайте в пробирке на льду в указанном порядке:

1. 60 мкл предыдущей реакции (шаг 1),
2. 5 мкл выбранного адаптера (15 мкМ сток) (Kapa Adapters),
3. 5 мкл ddH₂O,
4. 30 мкл лигазного буфера,
5. 10 мкл ДНК-лигазы.

Общий объем реакции составляет 110 мкл. Смесь инкубируется при 20 °С в течение 30 мин.

Шаг 3. Очистка на магнитных частицах, как описано ранее, с соотношением магнитных частиц к объему реакции 0,8 : 1 (0,8×)

Шаг 4 (опционально). Дополнительная очистка на магнитных частицах для удаления димеров адаптеров (короткие фрагменты длиной менее 100 п.о., см. рис. 5, *b*) в соотношении 1 : 1 (1×)

Элюировать ДНК в 30 мкл ddH₂O. Далее раствор можно использовать для NGS, предварительно оценив концентрацию ДНК.

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-06

Памяти профессора Айгуль Изтелеуовны Аbugалиевой (1959–2020)

 Н.П. Гончаров¹, А.И. Моргунов², В.П. Шаманин³, В.И. Цыганков⁴, М.А. Есимбекова⁵, И.Г. Лоскутов⁶, К. Гузман⁷, П.Р. Шеври⁸, М. Эль-Солх⁹

Для цитирования: Гончаров Н.П., Моргунов А.И., Шаманин В.П., Цыганков В.И., Есимбекова М.А., Лоскутов И.Г., Гузман К., Шеври П.Р., Эль-Солх М. Памяти профессора Айгуль Изтелеуовны Аbugалиевой (1959–2020). *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(1):46-65. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-06

In memory of professor Aigul I. Abugalieva (1959–2020)

 N.P. Goncharov¹, A.I. Morgunov², V.P. Shamanin³, V.I. Tsygankov⁴, M.A. Yessimbekova⁵, I.G. Loskutov⁶, C. Guzman⁷, P.R. Shewry⁸, M. El Solh⁹

For citation: Goncharov N.P., Morgunov A.I., Shamanin V.P., Tsygankov V.I., Yessimbekova M.A., Loskutov I.G., Guzman C., Shewry P.R., El Solh M. In memory of professor Aigul I. Abugalieva (1959–2020). *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(1):46-65. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-06 (in Russian)

11 октября 2020 г. скоропостижно скончалась известный биохимик и селекционер растений, международный эксперт по качеству зерна доктор биологических наук, профессор агрономии Айгуль Изтелеуовна Аbugалиева.

Айгуль Изтелеуовна родилась 20 августа 1959 г. в городе Алма-Ата Казахской ССР в семье известного ученого в области земледелия, растениеводства и селекции Изтелеу Аbugалиевича Аbugалиева¹. В 1981 г. с отличием

окончила Казахский государственный университет имени С.М. Кирова (ныне Казахский национальный университет имени аль-Фараби) по специальности «биолог, преподаватель химии и биологии», в 1985 г. – аспирантуру в Казахском НИИ земледелия им. В.Р. Вильямса (ныне ИЦ ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства», КазНИИЗиР) по специальности «биохимия».

С 1981 г. и до конца жизни работала в Казахском НИИ земледелия и растениеводства младшим научным сотрудником, старшим научным сотрудником, заведующей отделом программирования ВЦ, заведующей лабораторией технологической оценки качества зерна, генеральным директором, заместителем директора по науке. С 1998 г. совмещала работу с преподавательской деятельно-

¹ А.И. очень гордилась семьей. Отец – Изтелеу Аbugалиевич Аbugалиев (1930–2004) – окончил Казахский государственный университет им. С.М. Кирова (1953). Доктор с.-х. наук (1976), профессор (1988), действительный член Казахской академии с.-х. наук (1994), Национальной академии наук Казахстана (1996), чл.-кор. ВАСХНИЛ (1978). Дедушка – Елюбай Умурзаков (1899–1974) – народный артист Казахской ССР (1931), лауреат Сталинской премии и Государственной премии КазССР.

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

² Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций, Эр-Рияд, Саудовская Аравия

³ Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия

⁴ Актюбинская сельскохозяйственная опытная станция, Актюбе, Республика Казахстан

⁵ Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, п. Алмалыбак, Алматинская обл., Республика Казахстан

⁶ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

⁷ Университет Кордовы, Кордова, Испания

⁸ Ротамстедский исследовательский центр, Харпенден, Хартфордшир, Великобритания

⁹ Международный центр сельскохозяйственных исследований в засушливых регионах (ИКАРДА), Бейрут, Ливан

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

² Food and Agriculture Organization of the United Nations, Riyadh, Saudi Arabia

³ Stolypin Omsk State Agrarian University, Omsk, Russia

⁴ Aktobe Agricultural Experimental Station, Aktobe, Republic of Kazakhstan

⁵ Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing, Almalybak, Almaty Region, Republic of Kazakhstan

⁶ Federal Research Center N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

⁷ University of Cordoba, Cordoba, Spain

⁸ Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire, United Kingdom

⁹ International Center for Agricultural Research in the Dry Area (ICARDA), Beirut, Lebanon

 gonch@bionet.nsc.ru

 © Гончаров Н.П., Моргунов А.И., Шаманин В.П., Цыганков В.И., Есимбекова М.А., Лоскутов И.Г., Гузман К., Шеври П.Р., Эль-Солх М., 2021

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0



А.И. Аbugалиева (20 августа 1959 г. – 11 октября 2020 г.)

стью: была профессором кафедры селекции, семеноводства и биотехнологии Казахского национального аграрного исследовательского университета (Алма-Ата). В 2004–2006 гг. – директор центральной лаборатории по качественной оценке и идентификации сельскохозяйственных культур ГСИ Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан.

В 1985 г. А.И. Аbugалиева в Институте молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина защитила кандидатскую диссертацию на тему «Глиадин – показатель для выделения и изучения глиадиновых биотипов пшеницы» по специальности «биохимия», в 1994 г. в Казахском НИИ земледелия им. В.Р. Вильямса – докторскую по специальностям «селекция и семеноводство» и «биохимия». В 2000 г. Айгуль Изтелеуовне присвоено ученое звание профессора агрономии. В 2001 г. прошла стажировку по теме «Улучшение индустриального качества пшеницы: теория и методология» в Международном центре улучшения кукурузы и пшеницы (СІММУТ, Мексика), в 2006 г. – стажировку по управлению научными сельскохозяйственными исследованиями в центре Консультативной группы по международным сельскохозяйственным исследованиям (CGIAR, Вашингтон, США). В 2006 г. окончила курсы CGIAR по менеджменту и организации исследований (Ренауд Фостер, Торонто, Канада).

А.И. Аbugалиева отличала активная жизненная позиция.

Она была членом Международной научно-информационной сети, экспертом по качеству зерна (СИММИТ-ЦАЗ, с 1995 г.), членом ученого совета ИНТАС (ЕС, Бельгия, 2002–2006 гг.), попечительского совета Международного центра сельскохозяйственных исследований в засушливых регионах (ICARDA; Алеппо, Сирия, 2006–2009 гг.), международного экспертного совета при Высшей научно-технической комиссии РК (2007–2009 гг.), экспертного совета Комитета по контролю в сфере образования и науки РК (биологические науки) (2008–2010 гг.), экспертом АО «Национальный центр государственной научно-технической экспертизы» (2012–2013 гг.).

Айгуль Изтелеуовна была руководителем проектов МСХ РК и грантов МОН РК, EU INTAS, проектов Всемирного банка и МСХ РК «Повышение конкурентоспособности сельскохозяйственной продукции», СИММИТ-ГТЦ-Казахстан, казахстанско-австралийского проекта, ИКАРДА-ФАО и многих других.

Принимала участие в разработке регламента использования различных типов молекулярно-генетических маркеров в селекции сельскохозяйственных культур РК. Обосновала целесообразность и важность селекции на качество в соответствии с конечным типом использования зерна: пищевое, кормовое, биотехнологическое (глубокая переработка). Под руководством А.И. Аbugалиевой проведены ис-

следования по DUS-тестированию сортов на отличимость, однородность и стабильность согласно унифицированной методике Международного союза по охране новых сортов растений (UPOV). Айгуль Изтелеуовна способствовала достижению целей, описанных в Конвенции UPOV, которые состоят в обеспечении признания членами Союза достижений селекционеров, занимающихся выведением новых сортов растений, путем предоставления им права интеллектуальной собственности на основании четко оговоренных принципов. Особое место в исследованиях Айгуль Изтелеуовны, посвященных качеству зерна пшениц Казахстана, отведено определению его конкурентоспособности на мировых рынках согласно требованиям стран-экспортеров.

А.И. Аbugалиева с сотрудниками активно изучала генофонд диких и культурных растений по биохимическим, технологическим и питательным свойствам зерна, устойчивости к био- и абиотическим факторам среды, фотосинтетическому потенциалу продуктивности. Выполнила цикл работ по определению общей комбинационной способности генотипов и генотип-средовых взаимодействий, ранжировала коммерческие сорта зерновых культур Казахстана по устойчивости формирования классов качества с учетом их продуктивности. Провела технологические исследования и обосновала использование смесей зерна пшеницы с зерном других зерновых и зернобобовых культур как сырья для функционального питания. Активно изучала генофонд диких и культурных растений из коллекции ВИР. С начала 1980-х гг. занималась идентификацией пшеницы по запасным белкам с использованием мировой коллекции. В последующем неоднократно посещала ВИР и принимала участие в различных семинарах, конференциях и совместных научных проектах. Способствовала обмену растительными ресурсами между РК и РФ. Благодаря усилиям А.И. Аbugалиевой коллекция ВИР постоянно пополнялась новым селекционным материалом казахстанского происхождения.

Айгуль Изтелеуовна играла ключевую роль в организации успешного функционирования Казахстанско-Сибирской сети улучшения яровой пшеницы (КАСИБ), созданной в 2000 г. и в настоящее время объединяющей 22 селекционные программы России и Казахстана. КАСИБ успешно работает до сих пор в значительной степени благодаря А.И. Аbugалиевой, которая сплотила казахстанских селекционеров и способствовала их активному взаимодействию с учеными России. В последние годы она уделяла значительное внимание расширению генетического разнообразия (гермоплазмы) пшеницы за счет отдаленной гибридизации мягкой пшеницы с другими видами рода *Triticum* L. и ее сородичами. В результате этих исследований получены перспективные высокоурожайные, устойчивые к основным для Республики Казахстан болезням и обладающие высоким качеством зерна линии. Лучшие из них зарегистрированы в Национальной системе гермоплазмы растений Министерства сельского хозяйства США.

А.И. Аbugалиева внесла весомый вклад в пропаганду достижений казахстанской науки в мире, участвуя в международных проектах и исследованиях, крупных форумах и конгрессах по пшенице. С 1992 г. Айгуль Изтелеуовна – член Международного общества по науке и технологии зерна

(ICC, Вена, Австрия). В 2016 г. присоединилась к Экспертной рабочей группе по улучшению качества пшеницы для переработки и здоровья в рамках объединения «Пшеничная инициатива» (Expert Working Group on Improving Wheat Quality for Processing and Health of the Wheat Initiative). В настоящее время экспертная группа включает 80 ученых из 30 стран мира, имеющих опыт в исследовании качества зерна пшеницы. А.И. Аbugалиева активно участвовала во всех мероприятиях организации, в том числе трех международных встречах, которые прошли в Вене (Австрия), Тескоке (Мексика) и Саскатуне (Канада); работала над международными проектами и расширением сотрудничества. Она интересовалась изучением качества как мягкой, так и твердой пшеницы. В частности, анализировала влияние различных сред и состава глютеинов на качество переработки и конечное использование зерна.

Айгуль Изтелеуовна приложила значительные усилия для всестороннего изучения различных видов синтетической (искусственно созданной) пшеницы по хозяйственно важным показателям и признакам качества зерна для использования в продовольственных целях. Новые сорта синтетиков пшеницы продемонстрировали представляющие научный интерес характеристики, а также были исследованы как источник увеличения генетической изменчивости (полиморфизма) для улучшения питательных свойств зерна пшеницы с повышенным содержанием цинка и железа.

В 2017–2019 гг. А.И. Аbugалиева руководила проектом Европейской платформы фенотипирования растений (European Plant Phenotyping Platform) по изучению иономики зерна яровой пшеницы. В рамках данного проекта обширный материал из производственных посевов, а также из пяти точек КАСИБ (более 2500 образцов) проанализирован в Центре иономики Университета Ноттингема (Великобритания). При этом определены концентрации 20 элементов, включая макро- и микроэлементы, тяжелые металлы. В 2021 г. в журнале *Communications in Soil Science and Plant Analysis* были опубликованы результаты исследования, в котором показана высокая пищевая безопасность зерна яровой пшеницы, выращенного в западных, северных и восточных районах Казахстана и в Омской области. Концентрация вредных элементов оказалась ниже порога определяемости, свидетельствуя о безопасности зерна из Северного Казахстана и Западной Сибири.

В 2006–2009 гг. А.И. Аbugалиева – член попечительского совета ICARDA. Внесла существенный вклад в развитие исследовательской программы этой международной организации в Центральной Азии и на Кавказе (ЦАК), определение приоритетов исследований и обеспечение устойчивого роста сельского хозяйства в регионе. Способствовала всестороннему сотрудничеству и поддержке партнерства участников ICARDA с учеными-аграриями различных научно-исследовательских институтов ЦАК и России.

Профессором А.И. Аbugалиевой подготовлены восемь кандидатов наук, два PhD и один доктор наук. А.И. Аbugалиева – член диссертационных советов Казахского НИИ земледелия и растениеводства и Института физиологии, генетики и биоинженерии, экспертного совета ВАК РК; редакционных коллегий журналов «Вестник сельскохозяйственной науки



В лаборатории техноценти Казахского НИИ земледелия им. В.Р. Вильямса, п. Алмалыбак, 2000 г.
Из домашнего архива Т.В. Савина



Отбор и оценка экспериментального материала. Поля КазНИИЗиР, п. Алмалыбак, 11 мая 2020 г.
Из домашнего архива Т.В. Савина



На делянках ячменя. КазНИИЗиР, п. Алмалыбак, 26 июня 2013 г. А.И. Аbugалиева, К.К. Кожахметов (справа налево).
Фото Н.П. Гончарова



Осмотр экспериментальных посевов ОмГАУ. Совещание КАСИБ, Омск, 2018 г.
А.И. Аbugалиева, М. Кишии (СИММИТ, Мексика), А.И. Моргунов (СИММИТ, Турция), М.А. Левшунов
(КФХ «Тритикум», Омск) и В.П. Шаманин (ОмГАУ) (слева направо). Фото пресс-службы ОмГАУ



Красивейшее место Казахстана – экспериментальные поля КазНИИЗиР. п. Алмалыбак, 27 июня 2013 г. Фото Н.П. Гончарова



С участниками 14-й Международной конференции EWAC. Стамбул, 6–10 мая 2007 г.
Источник: http://www.ewac.eu/docs/ewac_nl2007.pdf



На международном симпозиуме по генетике и селекции твердой пшеницы, посвященном памяти профессора Джана Томмазо Скарассия Мугноцца. Рим, 28 мая 2013 г. Фото Н.П. Гончарова



А.И. Абугалиева с лауреатом Нобелевской премии мира 1970 года Норманом Борлоугом (СИММУТ). Казахский НИИ земледелия им. В.Р. Вильямса, 1998 г. Из домашнего архива Т.В. Савина



В перерыве международной конференции. 25 апреля 2017 г. Из домашнего архива Т.В. Савина



На развалинах Древнего Рима. 29 мая 2013 г. Фото Н.П. Гончарова



Доклад на совещании КАСИБ. Павлодар, 2008 г. Фото В.И. Цыганкова



В кругу семьи. 1-й ряд слева направо: А.И. Аbugалиева, И.А. Аbugалиев, Г.Е. Умурзакова, 2-й ряд слева направо: Э.В. Савин, Т.В. Савин, С.И. Аbugалиева. п. Алмалыбак, 2002 г. Из домашнего архива Т.В. Савина



Дедушка А.И. Аbugалиевой народный артист Казахской ССР Елюбай Умурзаков (1-й ряд, 2-й справа) на читке пьесы в Казахском академическом театре драмы им. М.О. Ауэзова. Алма-Ата, 1954 г. Из домашнего архива Т.В. Савина



С отцом – И.А. Абугалиевым. Алма-Ата, 1999 г. Из домашнего архива Т.В. Савина



С младшей сестрой д-ром биол. наук С.И. Аbugалиевой на 8-м Международном симпозиуме по пшеницевым (ITS-2017). Вернигероде (Германия), 13 июня 2017 г. Фото Н.П. Гончарова

Казахстана», «Письма в Вавилонский журнал генетики и селекции» и др.

А.И. Аbugалиева – автор более 800 научных работ, в том числе 9 монографий, 15 патентов на селекционные достижения, 4 патентов на изобретения и 35 зарегистрированных и допущенных к использованию в РК сортов сельскохозяйственных культур (пшеница, ячмень, рис, кукуруза, сорго, соя и тритикале). Написала главу для 3-го тома известного издания «Всемирная книга пшеницы» (World Wheat Book) по истории возделывания и селекции пшеницы в Южном Казахстане, напечатанного в 2016 г. в Париже.

Лауреат премии ЦК ЛКСМ Казахстана (1986), Союза молодежи и конгресса предпринимателей РК (1995). Обладатель стипендии Президента РК за выдающийся вклад в развитие науки и техники (2000–2002) и премии «Парасат» АО «Национальный центр научно-технической информации» в номинации «Казахстанские авторы с наибольшей публикационной активностью в зарубежной базе Web of Science, Thomson Reuters». За особые заслуги в сохранении Коллекции генетических ресурсов растений ВИР награждена медалью академика Н.И. Вавилова (2012, РФ), медалью Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан «60-летие освоения Целины» (2014), нагрудным знаком Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан «Ауыл шаруашылығы саласынын уздігі» (2014).

А.И. Аbugалиева была необыкновенно добрым, искренним, дружелюбным и открытым человеком. Все, кто знал Айгуль Изтелеуовну Аbugалиеву, опечалены известием о ее безвременной кончине.

Хронологический указатель основных научных трудов А.И. Аbugалиевой

1983

Соотношение субфракций глиадины у биотипов озимой пшеницы // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1983. № 3. С. 38–40.

1984

Качество зерна биотипов пшеницы // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1984. № 5. С. 29–32.

1985

Глиадин-глютениновые биотипы пшеницы // Доклады ВАСХНИЛ. 1986. № 6. С. 4–5. (соавт. Перуанский Ю.В., Булатова К.М., Нехорошева Л.М.)

Изменчивость биотипного состава озимой пшеницы и качество зерна // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1985. № 1. С. 33–36. (соавт. Сейфуллина М.П.)

Изопероксидазы проростков глиадиновых биотипов пшеницы Богарная 56 // Вестник АН КазССР. 1985. № 4. С. 72–75. (соавт. Перуанский Ю.В., Тажимаева Т.Л.)

Методические указания по идентификации сортов пшеницы и ячменя на основе составляющих их проламиновых биотипов / сост. Перуанский Ю.В., Аbugалиева А.И., Надиров Б.Т., Духнов С.Н., Савин В.Н. ВО ВАСХНИЛ: Алма-Ата, 1985. 14 с.

Множественность глиадиновых биотипов у сорта пшеницы // Селекция и семеноводство. 1985. № 3. С. 23–24. (соавт. Перуанский Ю.В.)

Разнокачественность глиадиновых биотипов пшеницы // Селекция и семеноводство. 1986. № 2. С. 30–31. (соавт. Перуанский Ю.В.)

Соотношение компонентов глиадины у биотипов пшеницы // Известия АН КазССР. Серия биол. 1985. № 2. С. 35–37. (соавт. Перуанский Ю.В.)

Сходство глиадиновых биотипов внутри сорта пшеницы // Доклады

ВАСХНИЛ. 1985. № 9. С. 7–9. (соавт. Перуанский Ю.В.)

Сходство и различие в соотношении компонентов глиадины у биотипов пшениц // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1985. № 3. С. 38–40. (соавт. Перуанский Ю.В.)

1987

Сходство и различие биотипов пшеницы по содержанию дисульфидных связей в глиадине // Известия АН КазССР. Серия биол. 1987. № 3. С. 35–37. (соавт. Перуанский Ю.В., Надиров Б.Т.)

1991

Генетический паспорт сортов пшеницы // Новости науки Казахстана. 1991. № 2. С. 52–53. (соавт. Аbugалиева С.И.)

Моделирование качества зерна озимой пшеницы сухостепного агроэкоотипа на основе генетических маркеров // Вестник с.-х. наук Казахстана. 1991. № 11. С. 17–21. (соавт. Булатова К.М.)

Полиморфизм запасных и каталитических белков – основа базы данных для идентификации генотипов пшеницы в селекции и биотехнологии // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1991. № 3. С. 20–24.

1992

Кластерный анализ в оценке генотип-средовых взаимодействий урожайности коллекционного и селекционного материала ячменя // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1992. № 3. С. 19–23. (соавт. Омарова Р., Сариев Б.С.)

Метод инфракрасной спектроскопии в определении содержания белка, крахмала, клейковины в зерне пшеницы // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1992. № 4. С. 8–10. (соавт. Баймаганова Г.Ш.)

1993

Зависимость между компонентами глиадины, субъединиц глютенина и качеством зерна пшеницы // Доклады РАСХН. 1993. № 4. С. 9–14. (соавт. Перуанский Ю.В., Булатова К.М., Новохатин В.В.)

Информационно-техническая база НИУ // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1993. № 11/12. С. 28–32. (соавт. Аткашев Ж.С., Изотова Х.З.)

Полиморфизм и качество зерна пшеницы сорта Зерно кормовая 50 // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1993. № 9–10. С. 31–34. (соавт. Перуанский Ю.В.)

Инфракрасный спектроскопический метод определения содержания белка // Жаршы. 1993. № 5/6. С. 11–12.

1994

Компоненты глиадины и субъединицы в селекции пшеницы на качество зерна: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. пос. Алматы, 1994. 52 с.

1995

Методические указания по компьютеризации исследовательских работ НИУ биологического профиля (программное обеспечение в селекции). Алматы, 1995. 36 с. (соавт. Савин В.Н.)

1996

Генетические маркеры в изучении сортового разнообразия ячменя // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1996. № 2. С. 41–49. (соавт. Туруспекоев Е.К., Аbugалиева С.И.)

Генетические маркеры пшеницы и ячменя и их использование в селекции // Новости науки Казахстана. 1996. № 1. С. 33–37. (соавт. Туруспекоев Е.К., Аbugалиева С.И.)

Методы биохимической оценки коллекционного и селекционного материала / сост. Аbugалиева А.И., Савин В.Н.; под ред. Перуанского Ю.В. Алматы, 1996. 123 с.

Показатель твердозерности – критерий качества зерна хлебопекарных пшениц // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1996. № 6. С. 30–37.

Системный подход и генетические маркеры в селекции и семеноводстве на примере хлебопекарной пшеницы. I. Эмпирическая кластеризация вида *Triticum aestivum* L. // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1996. № 10. С. 19–27. (соавт. Кожемякин Е.В., Савин В.Н.)

Сортовой генофонд ячменя Казахстана *Hordeum vulgare* L. (методы исследований, идентификация и каталог сортов). Алматы, 1996.

134 с. (соавт. Туруспеков Е.К., Скокбаев С.А., Морунова Г.М., Драчева Л.М., Аbugалиева С.И., Савин В.Н.)

1997

Биохимическая характеристика дигаллоидов ячменя // Биотехнология. 1997. № 3. С. 87. (соавт. Алимгазинова Б.Ш.)

Оптимизация селекции пшеницы: белковые маркеры, базы данных и программное обеспечение // Доклады РАСХН. 1997. № 4. С. 5–7. (соавт. Аbugалиев И.А.)

Система оценки и интерпретации качества зерна пшеницы в селекции // Доклады РАСХН. 1997. № 1. С. 22–25. (соавт. Аbugалиев И.А.)

Сортовой генофонд ячменя в Казахстане. Сообщ.1. Базы данных // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1997. № 7. С. 25–31. (соавт. Савин В.Н.)

Сортовой генофонд ячменя в Казахстане. Сообщ. 2. Белковые маркеры качества зерна, классификация сортов // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1997. № 9. С. 30–40. (соавт. Скокбаев С.О., Драчева Л.М., Савин В.Н.)

1998

Аналитические исследования в растениеводстве: мониторинг качества и экспресс-методы // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1998. № 8. С. 11–17. (соавт. Савин В.Н., Драчева Л.М.)

Аналитические исследования в растениеводстве: программное обеспечение и базы данных // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1998. № 7. С. 13–20. (соавт. Савин В.Н.)

Идентификация сортов ячменя на отличимость, однородность и стабильность по морфологическим признакам // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1998. № 6. С. 15–23. (соавт. Скокбаев С.О., Драчева Л.Д.)

Оптимизация аналитических исследований в растениеводстве // Доклады РАСХН. 1998. № 2. С. 13–15. (соавт. Савин В.Н., Аbugалиев И.А.)

Опыт и перспективы применения ПС в системном анализе // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1998. № 5. С. 13–19. (соавт. Савин В.Н., Бижанов А.Б.)

1999

Выделение биотипов риса по данным э/ф запасных белков // Доклады РАСХН. 1999. № 1. С. 10–12. (соавт. Перуанский Ю.В., Волковинская Н.Б.)

Дигаллоиды ячменя: генетические маркеры, качество зерна и урожайность // Известия АН РК. Серия биологическая. 1999. № 5–6. С. 95–98. (соавт. Туруспеков Е.К., Алимгазинова Б.Ш., Аbugалиева С.И.)

Каталог мировой коллекции генофонда зерновых культур КазНИИЗ / сост. Есимбекова М.А., Сарбаев А.Т., Аширбаева С.А., Сариев Б.С., Омарова Р.Н., Кудайбергенов М.С., Омарова А.Ш., Алмаханов Б.А., Макаров В.М., Жанысбаев Б.М. п. Алмалыбак, 1999. 72 с.

Селекция пивоваренного ячменя: биохимическое, генетическое, технологическое обеспечение // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1999. № 8. С. 18–32. (соавт. Сариев Б.С., Савин В.Н., Туруспеков Е.К., Аbugалиева С.И., Волковинская Н.Б., Нурғалиев Д.К.)

Особенности белковых формул районированных сортов ячменя в Казахстане // Вестник с.-х. науки Казахстана. 1999. № 10. С. 16–21. (соавт. Перуанский Ю.В., Волковинская Н.Б.)

2000

Гордеин ячменя сорта, селекционные образцы, дигаллоидные линии, коллекционный материал, дикие сородичи – сравнительный аспект // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2000. № 10. С. 22–27. (соавт. Волковинская Н.Б.)

Гордеины, изоферменты и ДНК-маркеры, основанные на полимеразной цепной реакции, и сортовой генофонд ячменя из Казахстана и Европы // Вестник КазГУ. 2000. № 3 (11). С. 113–114. (соавт. Туруспеков Е.К., Аbugалиева С.И., Тубероза Р., Ноли Э., Сарсенбаев С.Б., Жардемалиева А.Б.)

Коллекция тритикале: идентификация, регистрация, качество зерна и продуктивность // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2000. № 2. С. 17–21. (соавт. Уразалиев Р.А., Есимбекова М.А., Волковинская Н.Б., Орманбекова Г.Ш., Аbugалиева С.И., Фурсов В.О.)

Сорт озимого тритикале Таза // Новости науки Казахстана. 2000.

№ 3. С. 59–62. (соавт. Уразалиев Р.А., Орманбекова Г.Ш.)

QTL analysis agronomic and grain quality traits in common wheat // Bulletin of Kazakh National University. 2000. No 3 (11). P. 16–17. (соавт. Аbugалиева С., Sanguinetti M.C., Yessimbekova M., Quarrie S., Turuspekoy Y., Tuberosa R.)

2001

Гордеины ячменя *H.vulgare* L. и *H.spontaneum* Kochi – сравнительный аспект // Биотехнология. Теория и практика. 2001. № 1/2. С. 75–84. (соавт. Туруспеков Е.К., Аbugалиева С.И., Есимбекова М.А., Тубероза Р.)

Качество зерна хлебопекарной пшеницы в Казахстане: генетический потенциал, конкурентоспособность и картирование // Вестник науки Акмолинского аграрного университета им. С. Сейфуллина. 2001. Т. 1. № 2. С. 36–42.

Сортовой генофонд ячменя Казахстана: качество зерна как пивоваренного сырья // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2001. № 10. С. 24–28. (соавт. Скокбаев С.О., Драчева Л.М.)

Сортовой генофонд ячменя Казахстана: качество зерна как сырья для переработки в крупу // Вестник с.-х. науки. 2001. № 11. С. 16–20. (соавт. Драчева Л.М., Скокбаев С.О.)

Характеристика пшеницы, возделываемой в Казахстане по твердозерности // Доклады РАН. 2001. № 4. С. 10–13. (соавт. Драчева Л.М.)

DUS-тест белковые маркеры и селекционная ценность дигаллоидных линий ячменя // Вестник науки Акмолинского аграрного университета им. С. Сейфуллина. 2001. Т. 1. № 2. С. 68–73. (соавт. Алимгазинова Б.Ш.)

2002

Конкурентоспособность районированных сортов мягкой пшеницы // Аграрная наука. М., 2002. № 2. С. 6–7. (соавт. Савин В.Н., Драчева Л.М.)

Определение общей адаптационной способности дикого и культурного ячменя // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2002. № 10. С. 9–13. (соавт. Туруспеков Е.К., Есимбекова М.А., Аbugалиева С.И., Тажибаева Т.Л.)

Углеводно-азотное соотношение в определении качества табака // Вестник науки Казахского аграрного университета им. С. Сейфуллина. 2002. Т. 3. № 7. С. 326–330. (соавт. Алушев А.К.)

Характеристика озимой мягкой пшеницы в Кыргызской республике по ВМС и НМС глютеина и качеству зерна. Сообщ. 1. Качество зерна озимой мягкой пшеницы в Кыргызстане: генетический потенциал и фенотипическая реализация // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2002. № 8. С. 14–19. (соавт. Пенья Х.Р., Жунусова М.К., Моргунов А.И.)

2003

Изменение технологических качеств зерна озимой пшеницы при выделении высокопродуктивных форм // Вестник региональной сети по внедрению сортов пшеницы и семеноводству. 2003. № 2(5). С. 68–70. (соавт. Сулейменова М., Есимбекова М., Альжапарова Ж., Мукин К.)

Изучение потенциала сортов озимой мягкой пшеницы по качеству зерна и урожайности // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2003. № 1. С. 28–32. (соавт. Моргунов А.И.)

Качество зерна озимой мягкой пшеницы в Казахстане: твердозерность, клейковинные белки и конечный тип использования // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2003. № 7. С. 17–22.

Качество зерна риса: биохимический состав и твердозерность // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2003. № 6. С. 26–29. (соавт. Драчева Л.М.)

Формирование белкового комплекса в зерне яровой мягкой пшеницы Казахстана // Вестник региональной сети по внедрению сортов пшеницы и семеноводству. Алматы, 2003. № 1 (4). С. 20–24.

2004

Идентификация генотипов риса по электрофоретическим спектрам оризина и оризенина // Биотехнология. Теория и практика. 2004. № 4. С. 78–84.

Качество зерна яровой мягкой пшеницы в Казахстане // Вестник региональной сети по внедрению сортов пшеницы и

семеноводству. 2004. № 1–2 (7–8). С. 37–41.

Некоторые итоги исследований по вопросам изучения исходного материала яровой пшеницы на качество зерна // Вестник науки Казахского аграрного университета им. С. Сейфуллина. 2004. Т. 4. № 5. С. 28–34. (соавт. Кипшакбаева Г.А.)

Озимая мягкая пшеница в Центральной Азии и характеристика качества ее зерна // Вестник региональной сети по внедрению сортов пшеницы и семеноводству. 2004. № 3 (9). С. 9–19. (соавт. Моргунов А.И.)

Селекция пшеницы в Кыргызстане на урожайность и качество // Вестник региональной сети по внедрению сортов пшеницы и семеноводству. 2004. № 3 (9). С. 35–37. (соавт. Джунусова М.К., Моргунов А.И.)

Фитосанитарная оценка яровой пшеницы питомников КАСИБ в условиях Северного Казахстана // Вестник региональной сети по внедрению сортов пшеницы и семеноводству. 2004. № 3 (9). С. 58–63. (соавт. Кипшакбаева Г.А., Меновщикова Н.Я., Рукавицина И.В., Зеленский Ю.И.)

2005

Биохимическое тестирование качества зерна как основа классификации генетических ресурсов ячменя // Биотехнология. Теория и практика. 2005. № 1. С. 14–25.

Качество зерна яровой мягкой пшеницы блока КАСИП-4. Генетический потенциал сортов и его реализация в различных условиях // Биотехнология. 2005. № 4. С. 118–129. (соавт. Моргунов А.И.)

Качество зерна яровой мягкой пшеницы Казахстана и Сибири: генетический потенциал сортов и его реализация в различных условиях // Агромеридиан. 2005. № 1. С. 44–52. (соавт. Моргунов А.И.)

Морфологические и белковые маркеры в идентификации образцов яровой твердой пшеницы КАСИП // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2005. № 11. С. 5–10. (соавт. Кипшакбаева Г.А.)

Новый сорт яровой мягкой пшеницы Байтерек, полученный с помощью дигаллоидной технологии // Биотехнология. 2005. № 2. С. 76–81. (соавт. Зеленский Ю.И., Созинова Л.Ф., Любовец В.В., Кипшакбаева Г.А., Шек Г.О.)

Определение патентоспособности яровой пшеницы в условиях Северного Казахстана // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2005. № 1. С. 6–8. (соавт. Кипшакбаева Г.А.)

Отличимость, однородность и стабильность сортов ячменя по морфологическим и молекулярным маркерам согласно UPOV // Биотехнология. Теория и практика. 2005. № 1. С. 26–39. (соавт. Скокбаев С.О., Драчева Л.М., Аbugалиева С.И., Турусбеков Е.К., Есимбекова М.А.)

Охраноспособность сортов в Казахстане: возможности и перспективы // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2005. № 10. С. 5–10.

Селективная значимость ДГ-линий картирующей популяции яровой мягкой пшеницы Chinese spring – SQ1 // Биотехнология. 2005. № 2. С. 47–56. (соавт. Аbugалиева С.И., Кворри С.А.)

Қуздік тритикаленін дән сапасының агротехникалық тәсілдерге байланысты өзгеруі // Жаршы. 2005. № 3. Б. 33–35. (соавт. Сулейменова М.Ш., Шегебаев Г.О.)

DUS-тестирование сортов в их охране по UPOV. Пшеница // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2005. № 2. С. 6–9. (соавт. Скокбаев С.О., Драчева Л.М.)

2006

Взаимодействие «генотип × среда»: кукуруза в Казахстане // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2006. № 10. С. 11–13. (соавт. Гомес-Бесерра У.Ф.)

Каталог коллекции генофонда ячменя / сост. Аbugалиева А.И., Сариев Б.С., Жундибаев К., Тохетова Л., Рсалиев Ш. Алматы, 2006. 40 с.

Качество зерна, муки и хлеба дигаллоидных линий мягкой пшеницы // Биотехнология. 2006. № 3. С. 47–58. (соавт. Аbugалиева С.И.)

Качество зерна твердой пшеницы питомника казахстанско-сибирского испытания // Агромеридиан. 2006. № 3 (4). С. 39–44.

Качество зерна озимых зерновых культур // Вестник науки КазГАТУ им. С. Сейфуллина. 2006. Т. 5. № 1. С. 93–96. (соавт. Тажибаева Т.Л., Мусынов Н.М., Кипшакбаева А.А.)

Коллекция озимого ячменя ИКАРДА в Казахстане // Вестник с.-х.

науки Казахстана. 2006. № 4. С. 9–13.

Оценка стабильности и надежности урожайности яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в Казахстане и Сибири // Исследования, результаты. 2006. № 3. С. 196–201. (соавт. Гомес У.)

Рекомендации по проведению весенне-полевых работ на юго-востоке Казахстана в 2017 году / сост. Бастаубаева Ш.О., Рсалиев Ш.С., Хидиров А.Э., Сариев Б.С., Мейрман Г.Т., Кудайбергенов М.С., Рамазанова С.Б., Сарбаев А.Т., Оспанбаев Ж.О., Альдеков Н.А., Бекбатыров М.Б., Тыныбаев Н.К. п. Алмалыбак: ТОО «Асыл кітап» (Баспа уйі), 2017. 24 с.

Evaluation of grain yield stability, reliability and cultivar recommendations in Spring Wheat (*Tr. aestivum* L.) from Kazakhstan and Siberia // J. Central European Agricultural. 2006. Vol. 7. No 4. P. 649–660. (соавт. Gómez-Becerra H.F., Morgunov A.I.)

Iron and zinc concentration in grain of spring bread wheat from Kazakhstan and Siberia // Agromedian. 2006. No 1 (2). P. 5–16. (соавт. Morgounov A., Gómez-Becerra H.)

Wheat, Flour and Bread in Central Asia // Cereal Foods World. 2006. Vol. 51 (4). P. 166–171. (соавт. Ranum P., Mustafarov R., Peña J., Morgounov A.)

2007

Биохимический состав, содержание каротиноидов и технологические свойства в характеристике твердой пшеницы по качеству зерна // Исследования, результаты. 2007. № 4. С. 63–66. (соавт. Моргунов А.И., Губашева Б.Е., Тохтабакиева М.И., Джубатырова С.С.)

Изучение сортов рапса в Казахстане // Исследования, результаты. 2007. № 3. С. 36–40. (соавт. Долгих Л.А.)

Индекс твердозерности и субъединицы глютеина в определении конкурентоспособности яровой мягкой пшеницы на генетическом уровне // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2007. № 5. С. 3–9.

Сорта риса Уштобинской селекции: результаты и перспективы // Исследования, результаты. 2007. № 3. С. 45–47. (соавт. Ли Г.Е., Пак Н.А.)

Evaluation of the Germplasm through the Kazakhstan-Siberian network of Spring Wheat Improvement: I. Genotype × Environment Interactions and Site Classification for Grain Yield and Grain Protein Content // Australian Journal of Agricultural Research. 2007. P. 649–660. (соавт. Gómez-Becerra H.F., Morgunov A.I.)

Iron and Zinc grain density in common wheat grown in Central Asia // Euphytica. 2007. Vol. 155. P. 193–203. (соавт. Morgunov A., Gómez-Becerra H.F., Dzhunusova M., Yessimbekova M.A., Muminjanov H., Zelenskiy Y., Ozturk L., Cakmak Y.)

2008

Выявление источников качества зерна твердой пшеницы Казахстана // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2008. № 2. С. 3–8.

Генотип *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* как источник для повышения толерантности озимого ячменя // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2008. № 10. С. 5–12. (соавт. Турусбеков Е.К., Аbugалиева С.И.)

Каталог генетических ресурсов ячменя / сост. Цыганков В.И., Сариев Б.С., Цыганков И.Г. Цыганкова М.Ю., Мустафина Р.М., Шанинов Т.С. Актобе: Актюбинская СХОС, 2008. 40 с.

Каталог генетических ресурсов пшеницы по содержанию Fe и Zn в зерне / сост. Аbugалиева А.И., Апушев А.К., Чакмак И., Савин Т.В. Алматы, 2008. 40 с.

Каталог генетических ресурсов ячменя и овса / сост. Аbugалиева А.И., Сариев Б.С., Жундибаев К.К., Тохетова Л.А., Калибаев Б.Б., Баймуратов А.Ж., Абдрахманова Г.Н. п. Алмалыбак: КазНИИЗиР, 2008. 30 с.

Каталог электронной базы данных признаковой коллекции пшеницы с иммунологической и генетической характеристикой / сост. Аbugалиева А.И., Сарбаев А.Т., Есимбекова М.А., Корытко Л.А., Туктугулова Ж.К., Оразова А. и др. п. Алмалыбак: КазНИИЗиР, 2008. Т. 3. 22 с.

Методические рекомендации «Классификация пшениц по качеству зерна на генетическом, биохимическом и технологическом уровне» / сост. Аbugалиева А.И., Буць А.А., Сейтказинов А. п. Алмалыбак, 2008. 60 с.

Охраноспособность сортов Казахстана (на примере зерновых) // Интеллектуальная собственность Казахстана. 2008. № 1. С. 48–53.

Рапс: сортоиспытание и патентоспособность // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2008. № 12. С. 11–16. (соавт. Долгих Л.А.)
Рекомендации по использованию биологических технологий в селекции озимого ячменя / сост. Аbugалиева А.И., Сариев Б.С. Алматы, 2008. 40 с.
Содержание и концентрация Fe в зерне озимой пшеницы: сорта и регионы // Исследования, результаты. КазНАУ. 2008. № 4. С. 71–77. (соавт. Савин Т.В., Чакмак И.)
Казакстаннын онтустик-шыгыс жагдайында максары улгилери мен сорттарынын жогары енимдilik калыптастыруындагы кургакшылыкка тезимдilik касиети мен тамыр жуйеси дамуынын релі // Жаршы. 2008. № 3. Б. 20–24. (соавт. Туйтенова Г.Б., Конарбеков М.)
Максары (*Сartamus tinctorius* Linn.) улгилери мен сорттарынын тукум майлыгы // Изденистер, нәжіжелер. 2008. № 1. С. 87–89. (соавт. Нургасенов Т., Туйтенова Г.)

2009

Анализ зерновых (пшеница, ячмень и дикие сородичи) по содержанию Fe и Zn // Исследования, результаты. 2009. № 3. С. 17–121. (соавт. Савин Т.В., Кожамметов К.К., Савин Э.В.)
Биохимический состав зерна озимого ячменя // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2009. № 9. С. 10–16. (соавт. Волковинская Н.Б.)
Классификация сортов яровой мягкой пшеницы по генетическому потенциалу качества (твердозерности и ВМС-глютеина) // Доклады РАСХН. 2009. № 2. С. 6–9.
Classification of Soft Spring Wheat Varieties According to Genetic Quality Potential (Grain Hardness and HMW Subunits) // Rus. Agr. Sci. 2009. Vol. 35. No 2. P. 73–76.

2010

Генотипические вариации в концентрации Fe и Zn зерна ячменя // Исследования, результаты. 2010. № 4. С. 207–211. (соавт. Грандо С., Сариев Б.С., Эль-Хараймен Ф., Савин Э.В.)
Каталог допущенных к использованию сортов и гибридов сельскохозяйственных культур селекции Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства / сост. Нурпеисов И.А., Бастаубаева Ш.О., Уразалиев Р.А., Мейрман Г.Т., Сариев Б.С., Айнебекова Б.А. п. Алматы: «Асыл кітап», 2010. 133 с.
Каталог «Классификация сортов яровой мягкой пшеницы Международных питомников Казахстанско-российской сети по показателям качества зерна / сост. Аbugалиева А.И., Зеленский Ю.И., Савин Т.В. Астана, 2010. 61 с.
Качество зерна твердой пшеницы питомника Казахстанско-Сибирского испытания // Исследования, результаты. 2010. № 3. С. 233–238. (соавт. Тохтабакиева М.И.)
Качество зерна яровой мягкой пшеницы Казахстанско-Сибирского питомника (КАСИБ 6–7) // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2010. № 9. С. 3–16. (соавт. Зеленский Ю.И., Савин Т.В., Моргунов А.И.)
Маркирование и отбор ценных генотипов пшеницы по питательным свойствам // Исследования, результаты. 2010. № 3. С. 238–243. (соавт. Савин Т.В., Апушев А.К., Тохтабакиева М.И., Буць А.А., Сейтказинов А.)
Методические рекомендации «Классификация сортов яровой мягкой пшеницы международных питомников Казахстанско-Российской сети показателей качества зерна» / сост. Аbugалиева А.И., Пенья Х.Р. Астана. 2010. 34 с.
Мониторинг качества зерна мягкой пшеницы на технологическом уровне // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2010. № 7. С. 3–9. (соавт. Буць А.А., Сейтказинов А.)
Озимый ячмень: структура урожая, качество зерна и технологическое использование // Вестник КазНУ. Серия биологическая. 2010. № 2. С. 50–56. (соавт. Тажибаева Т.Л., Сариев Б.С.)
Паспортизация озимой мягкой пшеницы Казахстана по критериям DUS-тестирования // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2010. № 8. С. 12–17. (соавт. Сейтказинов А.)
Рапс и его идентификация согласно требованиям отличимости, однородности и стабильности // Исследования, результаты. 2010. № 3. С. 243–250. (соавт. Долгих Л.А.)
Распознавание устойчивых к изменениям внешней среды и высококачественных генотипов ячменя // Исследования, результаты. 2010. № 4. С. 191–197. (соавт. Тажибаева Т.Л.)

Содержание протеина в зерне сортов яровой мягкой пшеницы Казахстана: процент, диапазон и класс // Вестник с.-х. наук Казахстана. 2010. № 6. С. 5–7. (соавт. Буць А.А.)
Сортовой генофонд овса в Казахстане: продуктивность и пленчатость // Исследования, результаты. 2010. № 2 (046). С. 186–190. (соавт. Ажгалиев Т.Б.)
Состав и качество рапсового масла для пищевой промышленности // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2010. № 8. С. 89–91. (соавт. Долгих Л.А.)
Тестирование сортового генофонда овса на отличимость, однородность и стабильность // Вестник с.-х. наук Казахстана. 2010. № 6. С. 7–9. (соавт. Ажгалиев Т.Б.)
Характеристика сортового генофонда овса Казахстана по белковому комплексу // Исследования, результаты. 2010. № 2 (046). С. 182–186. (соавт. Ажгалиев Т.Б.)
Grain Quality Spring and Winter Wheat in Kazakhstan // J. Asian and Australian of Plant Science & Biotechnology. 2010. Vol. 4 (Special Issue 1). P. 87–90. (соавт. Peña-Bautista R.J.)
Phenotypic correlations, G × E interactions and broad sense heritability analysis of grain and flour quality characteristics in high latitude spring bread wheats from Kazakhstan and Siberia // Euphytica. 2010. Vol. 171. No 1. P. 23–38. (соавт. Gómez-Becerra H.F., Morgounov A., Abdullayev K., Bekenova L., Yessimbekova M., Sereda G. et al.)

2011

Генетические ресурсы культурного и дикого ячменя. Алматы, 2011. 334 с. (соавт. Турусбеков Е.К., Аbugалиева С.И., Драчева Л.М., Скокбаев С.О., Савин Т.В.)
Озимый ячмень: продуктивность и ее слагаемые // Сибирский Вестник сельского хозяйства. 2011. № 11. С. 105–112. (соавт. Сариев Б.С., Жундибаев К.К., Калибаев Б.)
Охраноспособность сортов в соответствии с конвенцией УПОВ в стратегии селекции и семеноводства сельскохозяйственных культур. Алматы, 2011. 169 с.
Рекомендация по новым сортам зернофуражных культур и отдельным элементам технологии его возделывания в условиях Шуйского района, Жамбылской области / сост. Сариев Б.С., Оспанов Ж.З., Жундибаев К.К. Алматы, 2011. 40 с.
Содержание крахмала и амилозы в зерне сортов овса Казахстана // Биотехнология. Теория и практика. 2011. № 2. С. 25–31.
Содержание β-глюкана и питательная ценность сортов овса и ячменя Казахстана // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2011. № 12. С. 6–10. (соавт. Сариев Б.С., Савин Т.В., Грандо С., Эль-Хараймен Ф.)
Содержание Fe и Zn в зерне пшеницы (сортовой генофонд и генетические ресурсы Казахстана). Алматы. 2011. 185 с. (соавт. Савин Т.В., Моргунов А.И., Чакмак И., Зеленский Ю.И.)
Характеристика сортового генофонда овса по продуктивности и качеству // Сибирский вестник с.-х. науки. 2011. № 9–10. С. 44–51. (соавт. Ажгалиев Т.Б., Савин Т.В.)

2012

Анализ методов гомозиготизации растений в селекции и разработка протоколов культуры изолированных микроспор казахстанских сортов пшеницы // Вестник КазНУ. Серия биологическая. 2012. № 2 (54). С. 17–23. (соавт. Исмагул А., Исакова Г., Елибай С., Башабаева Б.)
Использование методов генетического маркирования в селекции яровой пшеницы // Биотехнология. 2012. № 2. С. 46–59. (соавт. Елибай С., Шавруков Ю., Исмагул А., Ленгридж П., Кененбаев С.Б.)
Оценка и маркирование диких сородичей и их гибридов с коммерческими сортами по содержанию Fe, Zn и составу глютеина // Вестник КазНУ. Серия биологическая. 2012. № 4 (56). С. 343–351. (соавт. Кожамметов К.К., Савин Т.В.)
Селекция овса на продуктивность и качество // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2012. № 7. С. 13–16. (соавт. Жундибаев К.К., Сариев Б.С.)
Селекция ячменя на юге и юго-востоке Казахстана. Алматы, 2012. 140 с. (соавт. Сариев Б.С.)
Сортовой генофонд сои в Казахстане // Вестник с.-х. науки Казахстана. 2012. № 10. С. 17–23. (соавт. Ажгалиев Т.Б., Жумаханова А.Ж.)
Содержание β-глюкана в селекции ячменя на пивоваренные и питательные свойства // Доклады РАСХН. 2012. № 2. С. 12–15. (соавт. Грандо С., Сариев Б.С., Эль-Харамейн Ф., Шевцов В.М.)
Содержание Fe, Zn и S в зерне популяции диаллоидных линий мягкой пшеницы Chinese spring × SQ1 // Вавиловский журнал генети-

ки и селекции. 2012. Т. 16. № 4/2. С. 894–901. (соавт. Аbugалиева С.И., Кворри С.А., Турусупова Е.К., Чакмак И., Савин Т.В., Ганеев В.А.)
Сортовой генофонд овса: содержание и качество жира // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 1. С. 198 (1–9). (соавт. Ажгалиев Т.Б., Савин Т.В.)
Твердозерность и состав глютеина озимой пшеницы и ее гибридов с дикими сородичами // Сибирский вестник с.-х. науки. 2012. № 2. С. 105–112. (соавт. Пенья Х.Р., Буць А.А., Савин Т.В.)
Significance of β -glucan in barley grain during breeding for brewing and nutritional properties // Russian Agricultural Sciences. 2012. Vol. 38. No 2. P. 89–93. (соавт. Sariev B.S., Grando S., El-Haramein F., Shevtsov V.M.)

2013

Культура изолированных микроспор в создании генетически однородных и стабильных дигаллоидных генотипов ячменя // Биотехнология. Теория и практика. 2013. № 1. С. 24–27. (соавт. Башабаева Б.М., Исмагул А.Ж., Алимгазина Б.Ш., Сариев Б.С.)
Метод гомозиготизации материала в культуре изолированных микроспор ячменя // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2013. Т. 171. С. 127–130. (соавт. Башабаева Б., Исмагул А.Ж.)
Общая адаптационная способность ячменя // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2013. Т. 171. С. 174–178. (соавт. Тажибаева Т.Л.)
Результаты изучения коллекции ярового ячменя на Карабалыкской СХОС // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2013. Т. 171. С. 258–261. (соавт. Чудинов В., Звейнек И., Бердагулов М.)
Селекция овса в Казахстане на продуктивность и качество зерна // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2013. Т. 171. С. 262–264. (соавт. Сариев Б.С., Жундибаев К.К.)
Содержание β -глюкана в зерне овса // Сиб. вестник с.-х. науки. 2013. № 4. С. 76–83. (соавт. Савин Т.В.)
Содержание клетчатки в определении питательной ценности сортов овса // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2013. Т. 171. С. 73–76. (соавт. Жумаханова А.Ж., Ажгалиев Т.Б.)
Твердозерность ячменя и качество генотипов конечного типа использования // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2013. Т. 171. С. 77–81.
Тритикале и его применение в хлебопекарном производстве // Вестник Верный хлеб. 2013. № 3 (6). С. 41–42.
Характеристика селекционного и коллекционного материала овса по содержанию и качеству жира // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2013. Т. 173. С. 76–82. (соавт. Лоскутов И.Г., Сариев Б.С., Жундибаев К.К., Савин Т.В., Нурпеисов М.)
Характеристика сортовых ресурсов ячменя по содержанию Fe в зерне // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2013. Т. 171. С. 81–85. (соавт. Савин Т.В., Чакмак И., Савин Э.В.)
Historical changes in grain yield and quality of spring wheat varieties cultivated in Siberia from 1900 to 2010 // Can. J. Plant Sci. 2013. Vol. 93 (3). P. 425–433. (соавт. Morgounov A.I., Belan I., Zelenskiy Y., Roseeva L., Tömösközi S., Bekes F. et al.)

2014

Качество сортов яровой мягкой пшеницы селекции Омского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина при репродукции в сети КАСИБ в степной зоне Казахстана и Западной Сибири // Достижения науки и техники АПК. 2014. № 5. С. 13–16. (соавт. Шаманин В.П., Савин Т.В., Моргунов А.И., Пенья Х., Петуховский С.Л. и др.)
Effect of climate change and variety on long-1 term variation of grain yield and quality in winter wheat in Kazakhstan // Cereal Research Commun. 2014. Vol. 42 (1). P. 163–172. (соавт. Morgounov A., Belan I., Zelenskiy Y., Roseeva L., Tömösközi S., Békés F., Cakmak I., Vargas M., Crossa J.)
Using gene fund of wild relatives for common wheat improvement // International Journal of Biology and Chemistry. 2014. Vol. 7 (2). P. 41–43. (соавт. Kozhahmetov K.K.)

2016

Биохимические и физиологические аспекты раннеспелой кукурузы при использовании на корм // AgroElem. 2016. № 12. С. 28–31. (соавт. Омарова А.Ш., Омарова А.А., Ахметова Н.Е.)

Фараби және Карасай куздік бидай сорттарының туқым шаруашылығындағы глиадиннің электрофоретикалық спектрі // Жаршы. 2016. № 3–4. Б. 17–22. (соавт. Далибаева А.М.)
Introgressive forms-approach for biotechnology advance of winter wheat on environmental adaptability // International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM. 2016. Vol. 1. P. 607–614. (соавт. Tazhibayeva T., Morgunov A., Kozhahmetov K.)
Introgressive forms of winter wheat: drought resistance and productivity indicators. Bulletin d'EUROTALENT-FIDJIP. 2016 (1). P. 72–74. (соавт. Tazhibayeva T.L., Massingaziyeva A.S., Kozhahmetov K.K.)
The History of Wheat Breeding in Southern Kazakhstan // The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding / Bonjean A., Angus W., van Ginkel M. (Eds.). Paris: Lavoisier. 2016. Vol. 3. P. 311–330. (соавт. Morgunov A.)

2017

Common bunt resistance of winter wheat genotypes under artificial infection. International Journal of Engineering and Technology (UAE). 2018. Vol. 7 (Special issue No 38). P. 737–740. (соавт. Tagayev K., Morgounov A., Yessimbekova M.)
High-yielding winter synthetic hexaploid wheats resistant to multiple diseases and pests. Plant Genet. Res. 2017. Vol. 16 (3). P. 273. (соавт. Morgounov A., Akan K., Akin B., Baenziger S., Bhatta M., Dababat A.A. et al.)
Resistance of wheat introgressive forms to heavy metals // International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM. 2017. Vol. 17. P. 777–784. (соавт. Tazhibayeva T., Kozhahmetov K.)
The grain quality classification of winter wheat genetic resource by sulfur and nitrogen // Bulletin of the National Acad. Sci. of Kazakhstan. 2017. No 2. P. 31–38. (соавт. Cakmak I., Morgounov A., Savin T.V.)

2018

Биохимический состав и технологическая оценка зерна интрогрессивных форм озимой мягкой пшеницы с участием различных видов *Triticum* и *Aegilops* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 3. С. 353–362. (соавт. Савин Т.В.)
Влияние твердой головки на агрономические показатели и устойчивость линий озимой пшеницы // Известия НАН РК. Серия аграрных наук. 2018. № 5 (47). С. 12–19. (соавт. Тагаев К.Ж., Моргунов А.И., Есимбекова М.А., Баядилова Г.О.)
Минеральный состав зерна диких сородичей и интрогрессивных форм в селекции пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 3. С. 88–96. (соавт. Савин Т.В., Чакмак И., Кожакметов К.)
Устойчивость к ржавчинным болезням синтетических озимых форм пшеницы // Известия НАН РК. Серия аграрных наук. 2018. № 2. С. 61–72. (соавт. Рсалиев А.С., Кожакметов К.К., Чудинов В.А., Рсымбетов А.)
Ерте пісетін, жемдік максатта колданылатын жүгерінің биохимиялық және физиологиялық аспектілері // Жаршы. 2017. № 7–8. Б. 23–29. (соавт. Омарова А.Ш., Омарова А.А., Ахметова Н.Е., Ермаханов Е.Е., Бекбатырова С.С.)
Идентификация устойчивости *Lz*-гена к бурой ржавчине сорта яровой мягкой пшеницы и линий сети КАСИБ // Известия НАН РК. Серия аграрных наук. 2018. № 3 (45). С. 98–102. (соавт. Рсымбетов А.А., Моргунов А.И., Гультияева Е.И.) (на каз. языке)
Chromosomal Location and Mapping of Quantitative Trait Locus Determining Technological Parameters of Grain and Flour in Strong-flour Bread Wheat Cultivar Saratovskaya 29 // Cereal research communications. 2018. Vol. 46 (4). P. 628–638. (соавт. Shchukina L.V., Pshenichnikova T.A., Khlestkina E.K., Misheva S., Kartseva T., Börner A.)
Effect of climate change on spring wheat yields in North America and Eurasia in 1981–2015 and implications for breeding // PLoS ONE. 2018. Vol. 13 (10). P. e0204932 (соавт. Morgounov A, Sonder K., Bhadauria V., Cuthbert R.D., Shamanin V. et al.)
Drought tolerance of wheat introgressive forms // Journal of Geography and Environmental Management. 2018. Vol. 50 (3). P. 70–79. (соавт. Tazhibayeva T.L.)
High-yielding winter synthetic hexaploid wheats resistant to multiple diseases and pests // Plant genetic resources. 2018. Vol. 16 (3). P. 273. (соавт. Morgounov A., Akan K., Akin B., Baenziger S., Bhatta M. et al.)
Productivity and Disease Resistance of Primary Hexaploid Synthetic

Wheat Lines and their Crosses with Bread Wheat // Cereal research communications. 2018. Vol. 46. No 2. P. 355–364. (соавт. Gadimaliyeva G., Jahangirov A., Hamidov H., Abugaliyeva A., Shamanin V., Morgounov A.)

2019

Генетический потенциал качества сортов яровой мягкой пшеницы селекции Курганского НИИСХ // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2019. Т. 180 (1). С. 24–32. (соавт. Мальцева Л.Т., Филиппова Е.А., Моргунов А.И., Зеленский Ю.И., Пенья Х.)
Источники крупнозерности и устойчивости к болезням яровой мягкой пшеницы из мирового генофонда ВИР для использования в селекции // Аграрная наука. 2019. № 1. С. 43–47. (соавт. Темирбекова С.К., Зуев Е.В., Афанасьева Ю.В.)

Association mapping for agronomic traits in six-rowed spring barley from the USA harvested in Kazakhstan // PLoS ONE. 2019. Vol. 14 (8). P. e0221064. (соавт. Almereikova S., Sariev B.)

Grain mineral composition of introgressive wheat-wild forms in breeding of spring wheat on the nutritional properties // Bulletin of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. 2019. No 1. P. 28–38. (соавт. Savin T., Chakmak I., Kozhahmetov K., Chudinov V., Morgounov A.)

2020

Качество зерна коллекционных образцов яровой тритикале (*× Triticosecale Wittmack*) // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2020. Т. 50 (3). С. 111–121. (соавт. Ержебаева Р. С., Таджибаев Д.)

Хозяйственно-ценные признаки линий синтетической яровой пшеницы в восточно-казахстанской области // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2020. № 12. С. 5–9. (соавт. Степанов К.А.)

Genetic basis of spring wheat resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) in Kazakhstan and Russia // Euphytica. 2020. Vol. 216 (11). DOI 10.1007/s10681-020-02701-y (соавт. Morgounov A., Pozherukova V., Kolmer J., Gulytaeva E., Chudinov V. et al.)

Grain quality in breeding // Wheat quality for improving processing and human health. Cham: Springer, 2020. P. 273–307. (соавт. Helguera M., Battenfield S., Békés F., Branlard G., Cuniberti M. et al.)

2021

Ionomic analysis of spring wheat grain produced in Kazakhstan and Russia // Comm. Soil Sci. Plant Anal. 2021. DOI 10.1080/00103624.2020.1865398. (соавт. Flis P., Shamanin V., Savin T., Morgounov A.)

Registration of wheat germplasm originating from wide crosses with superior agronomic performance and disease resistance // J. Plant Regist. 2021. Vol. 15 (1). P. 206–214. DOI 10.1002/plr.2.20105. (соавт. Savin T.V., Kozhahmetov K.K., Morgounov A.I.)

АВТОРСКИЕ СВИДЕТЕЛЬСТВА И ПАТЕНТЫ

А.с. № 5080001040. Выбор технологии возделывания озимой пшеницы / соавт. Утепбергенов И., Турешев О.Т., Калугулова Р.Е., Бижанов А.Б.; ВНТИЦ, опублик. 1989.

А.с. № 508790001218. Автоматизированное проектирование технологии возделывания люцерны / соавт. Утепбергенов И.Т., Ланг И.Б., Рыскалиева К.У., Турешев О.Т.; опублик. 1990.

А.с. № 50890001219. АРМ-агронома «Технология возделывания кукурузы на зерно» / соавт. Аbugалиев И.А., Турешев О.Т., Утепбергенов И., Бижанов А.Б., Атаханова Г.В.; опублик. 1990.

А.с. № 50890001220. Планирование технологии возделывания кукурузы на силос / соавт. Утепбергенов И., Рябинина Е.В., Бижанов А.Б., Атаханова Г.В., Турешев О.Т.; опублик. 1990.

А.с. № 50890001221. Прогнозирование сроков наступления фаз развития озимой пшеницы / соавт. Утепбергенов И.Т., Каличкин И.А., Сулейменова М.Ш., Турешев О.Т.; опублик. 1990.

А.с. № 50890001222. Автоматизированный выбор технологии возделывания сахарной свеклы / соавт. Аbugалиев И.А., Утепбергенов И., Ланг И.Б., Купарова А.Т.; опублик. 1990.

А.с. Агентства ИНСО РК № 346. Принцип и система ведения баз данных по маркерным и селективным признакам зерновых культур / соавт. Савин В.Н.; опублик. 23.08.1995.

А.с. Агентства ИНСО РК № 347. Способ выделения белковых биотипов; опублик. 23.08.1995.

А.с. Агентства ИНСО РК № 348. Биохимические и морфологические маркеры – в анализе генетической структуры сортовых и гибридных популяций самоопыляющихся культур / соавт. Аbugалиева С.И.; опублик. 23.08.95.

А.с. Агентства ИНСО РК № 349. Твердозерность – критерий качества пшеницы; опублик. 23.08.95.

А.с. Агентства ИНСО РК № 419. Экспресс-метод оценки качества зерна пшеницы в селекции на основе ИК-спектроскопического анализа белкового комплекса / соавт. Перуанский Ю.В., Рамазанова С.Б., Баймаганова Г.Ш.; опублик. 13.05.96.

А.с. Агентства ИНСО РК № 418. Метод определения экологической адаптивности генотипов по комплексу признаков в многомерной системе / соавт. Савин В.Н.; опублик. 13.05.96.

А.с. Агентства ИНСО РК № 420. Система мониторинга почва-растение – конечный продукт: ИК-спектроскопия / соавт. Рамазанова С.Б., Баймаганова Г.Ш., Аbugалиев И.А.; опублик. 13.05.1996.

А.с. № 130. Способ определения устойчивости генотипов пшеницы к стрессовым факторам / соавт. Перуанский Ю.В., Тажибаева Т.Л.; патент РК № 8174 (23503); опублик. 08.07.1999.

А.с. Сорт пшеницы озимой Актерекская / соавт. Кожемякин Е.В., Шегбаев О.Ш., Бухарбаева Б.Т., Малдынова Г.М., Николаев Н.А., Сарбаев А.Т., Хасенов Е.Х.; опублик. 30.10.2002.

А.с. № 135. Сорт тритикале озимой Таза / соавт. Уразалиев Р.А., Калибаев Б.С., Кожаметов К.К., Пшаева Б.С., Жангазиев А.С.; опублик. 30.10.2002.

А.с. РК № 183. Сорт риса Пак-Ли / соавт. Пак Н.А., Ли Г.Е., Уразалиев Р.А.; опублик. 17.02.2004.

А.с. № 198. Сорт ячменя ярового Туран-2 / соавт. Сариев Б.С., Нургаалиев Д.К., Жундибаев К.К.; опублик. 24.11.2004.

Предпатент РК № 15359. Способ производства зерновой лепешки / соавт. Умирралиева Л.Б., Изтаев А.К., Витавская А.В.; заявка № 2003/1102.1 от 15.08.2003. Бюллетень № 2; опублик. 15.02.2005.

А.с. РК № 207 Сорт яровой твердой пшеницы Каргала 9 / соавт. Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Шанинов Т.С., Уразалиев Р.А., Исабаев С.Я.; опублик. 15.02.2005.

А.с. № 219. Сорт риса Опытное / соавт. Пак Н.А., Ли Г.Е., Уразалиев Р.А.; заявка 0210449 от 18.01.2002, приказ МСХ РК № 193; опублик. 11.03.2005.

А.с. РК № 229. Сорт яровой твердой пшеницы Каргала 9 / соавт. Уразалиев Р.А., Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Шанин Т.С., Исабаев С.Я.; опублик. 04.04.2007.

А.с. № 260. Сорт яровой мягкой пшеницы Алем / соавт. Богданова Е.Д., Полимбетова Ф.А., Уразалиев Р.А., Оспанбаев Ж.О., Аbugалиев С.Г., Нурпеисов И.А.; опублик. 25.04.2005.

А.с. РК № 290 Сорт яровой мягкой пшеницы Актюбе 39 / соавт. Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Шанинов Т.С., Уразалиев Р.А., Исабаев С.Я.; опублик. 18.07.2007.

А.с. РК № 304. Сорт риса Заря / соавт. Пак Н.А., Ли Г.Е., Уразалиев Р.А., Кененбаев С.Б.; заявка № 0210448 от 18.01.2002, приказ МСХ РК № 391 от 13.06.2007; опублик. 02.07.2008.

А.с. РК № 337. Сорт риса Суаг / соавт. Ли Г.Е., Пак Н.А., Кененбаев С.Б., Хван М.Е., Пак А.Н.; заявка № 0410581 от 07.01.2004, приказ МСХ РК № 189 от 28.03.2008 г.; опублик. 02.07.2008.

А.с. РК № 339. Сорт сои Вита / соавт. Жанысбаев Б.М., Карягин Ю.Г., Уразалиев Р.А., Бойко А.Т., Колот В.Н., Колот В.В., Михайлова В.Н.; заявка № 0210507 от 26.12.2002, приказ МСХ РК № 391 от 13.06.2007; опублик. 19.12.2008.

Инновационный патент № 24197 «Способ оценки и отбора эталонных растений в процессе первичного и элитного семеноводства промышленных сортов риса» / соавт. Аймаков Ж.Ж., Мамонов Л.К., Таранов О.Н.; опублик. 08.06.2010.

А.с. РК № 361 Сорт яровой мягкой пшеницы Степная 2 / соавт. Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Шанинов Т.С., Уразалиев Р.А., Исабаев С.Я.; опублик. 17.11.2009.

А.с. № 382. Сорт пшеницы Степная 50 / соавт. Цыганков В.Г., Цыганков И.Г., Шанинов Т.С., Уразалиев Р.А.; опублик. 24.10.2010.

Патент РК 24197 (2010.01). Способ оценки и отбора эталонных растений в процессе первичного и элитного семеноводства промышленных сортов риса / соавт. Аймаков Ж.Ж., Мамонов Л.К., Таранов О.Н.; Промышленная собственность. Официальный

- бюллетень; опубл. 2011. № 7.
- А.с. № 411. Сорт яровой пшеницы Самгау / соавт. Уразалиев Р.А., Абсаттарова А.С., Баймагамбетова К.К., Аbugалиев С.Г., Сарбаев А.Т., Булатова К.М., Абекова А.М.; опубл. 26.03.2012.
- А.с. № 414. Сорт ячменя КазСуффле-1 / соавт. Сариев Б.С., Абдрахманов М.С., Жундибаев К.К., Алимгазинова Б.Ш.; опубл. 26.03.2012.
- А.с. № 1387. Пшеница мягкая яровая Кайыр / соавт. Уразалиев Р.А., Уразалиев Р.А., Баймагамбетова К.К., Аbugалиев С.Г., Сарбаев А.Т.; опубл. 29.04.2008.
- А.с. № 1393. Пшеница твердая озимая Ема / соавт. Уразалиев Р.А., Аширбаева С.А., Сарбаев А.Т.; опубл. 22.10.2008.
- «Способ создания генетически однородных и стабильных диглоидных генотипов ячменя на основе культуры изолированных микроспор». Заявление о выдаче патента РК на изобретение в РКП «НИИС», № 2013/0085.1 / соавт. Башабаева Б.М., Исмагул А.Ж.; опубл. 29.01.2013.
- Патент № 327 на селекционное достижение: пшеница мягкая яровая Актюбе 39 / соавт. Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Шанинов Т.С., Урозалиев Р.А., Исабаев С.Я.; опубл. 24.06.2013.
- Патент на селекционное достижение: пшеница мягкая яровая «Степная 2» / соавт. Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Шанинов Т.С., Урозалиев Р.А., Исабаев С.Я.; опубл. 24.06.2013.
- Патент № 328. На селекционное достижение: пшеница мягкая яровая «Степная 50», № 329 от 24.06.2013 / соавт. Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Шанинов Т.С., Урозалиев Р.А.
- Патент РК № 329 на селекционное достижение пшеница мягкая яровая Степная 50 / соавт. Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Шанинов Т.С., Уразалиев Р.А. Выдан по заявке ТОО «Актюбинская СХОС» № 2009/097.4 от 03.12.2009; опубл. 24.06.2013.
- Патент № 332. На селекционное достижение: пшеница твердая яровая «Каргала 9» / соавт. Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Шанинов Т.С., Урозалиев Р.А., Исабаев С.Я.; опубл. 24.06.2013.
- Патент № 334. На селекционное достижение: пшеница твердая яровая «Каргала 34» / соавт. Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Шанинов Т.С., Урозалиев Р.А.; опубл. 24.06.2013.
- Патент РК № 752 на селекционное достижение пшеница твердая яровая Серке / соавт. Урозалиев Р.А., Аширбаева С.А., Сарбаев А.Т., Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Сейдахметова А. Выдан по заявке ТОО «Казахский НИИЗиР» № 2013/039.4 от 22.11.2013; опубл. 30.03.2017.
- Патент РК № 882 на селекционное достижение пшеница мягкая яровая Степная 100 / соавт. Цыганков В.И., Цыганков И.Г., Цыганкова М.Ю., Цыганков А.В., Калыбекова Ж.Т., Баймагамбетова К.К., Сарбаев А.Т., Урозалиев Р.А., Аbugалиев С.Г. Выдан по заявке ТОО «Актюбинская СХОС» № 2015/061.4 от 02.12.2015; опубл. 27.12.2018.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.02.2021. После доработки 18.02.2021. Принята к публикации 18.02.2021.

«Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции» – сетевое научное издание открытого доступа. 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.

Всем статьям присваивается DOI.

Входит в РИНЦ и DOAJ.

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.

Регистрационное свидетельство СМИ Эл № ФС77-75536 выдано 08 мая 2019 года Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

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

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

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

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

Адрес учредителя и издателя: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090

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: 23.03.2021