

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

1(1), 2018



Сайт: <http://vir.nw.ru/pbi/>
Email: pbi@vir.nw.ru



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

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

Научный рецензируемый журнал

Scientific peer reviewed journal

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2018 1(1)

PLANT BIOTECHNOLOGY AND BREEDING

2018 1(1)

Основан в 2018 году

Founded in 2018

Периодичность 4 раза в год

Published 4 times annually

*Для биотехнологов, генетиков, селекционеров,
преподавателей вузов биологического и
сельскохозяйственного профиля.*

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

e-mail: pbi@vir.nw.ru

e-mail: pbi@vir.nw.ru

190000, Российская Федерация
г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44

42, 44, Bolshaya Morskaya St., City of
St. Petersburg, 190000, Russian Federation

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

© Federal research center The N. I. Vavilov
All-Russian institute
of plant genetic resources (VIR)

DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1
УДК 573.6:631.527

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

Используемая на обложке фотография:
© Ячмень, сорт 'Мишка', ПОС ВИР. Шипилина Л.Ю. 2015 г.

Главный редактор: д.б.н., профессор РАН **Е.К. Хлесткина**

Заместитель главного редактора: д.б.н. **Т.А. Гавриленко**

Ответственные секретари: д.б.н. **И.Н. Анисимова**, к.т.н. **Л.Ю. Новикова**

Редсовет

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

Редколлегия

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

Editor-in-Chief: Dr. Sci. in Biol., Professor **E.K. Khlestkina**

Deputy Editor-in-Chief: Dr. Sci. in Biol. **T.A. Gavrilenko**

Executive Secretaries: Dr. Sci. in Biol. **I.N. Anisimova**, Cand. Sci. in Techn. **L.Yu. Novikova**

Editorial council

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

Editorial board

D.A. Afonnikov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E.E. Andronov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
A.H. Bajmiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I.A. Belan – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
A.G. Besedin – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
R.O. Davoyan – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
Ya.N. Demurin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M.G. Divashuk – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M.V. Efimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
S.N. Elansky – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
L.A. Elkonin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
O.V. Eremina – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A.P. Ermishin – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
Yu.V. Fotev – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
S.V. Garkusha – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T.A. Gasanova – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
V.A. Gavrilova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S.V. Gerasimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M.S. Gins – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
S.V. Goncharov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E.T. Ilnitskaya – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R.N. Kalendar – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
N.N. Karpun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E.B. Khatefov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E.Z. Kochieva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N.N. Kovalenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V.S. Kovalev – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
B.R. Kuluev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
K.U. Kurkiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S.V. Kushnarenko – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
I.N. Leonova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I.E. Lihenko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
V.V. Likhovskoi – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
P.N. Malchikov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T.V. Matveeva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N.V. Mironenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I.V. Mitrofanova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S.V. Osipova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V.N. Podorozhniy – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
T.G. Prichko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T.A. Rozhmina – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
A.V. Smykov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A.A. Soloviev – Dr. Sci. in Biol., Professor (Russia)
I.I. Suprun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E.K. Turuspekov – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
E.V. Ulyanovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
O.Yu. Urbanovich – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
Ya.A. Tsepilov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
O.Yu. Shoeva – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M.A. Vishnyakova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
G.V. Yakuba – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R.Sh. Zaremuk – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
S.V. Zelentsov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

Содержание

ОТ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА 5

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 7

*Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П.,
Орина А.С., Аблова И.Б., Беспалова Л.А.*

Маркерные метаболиты грибов *Alternaria*, *Fusarium* и *Microdochium* как инструмент оценки их взаимоотношений в микобиоте зерна пшеницы

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 16

Пендинен Г.И., Чернов В.Е., Шольц М.

Характеристика интрогрессивных линии ячменя, полученных на основе межвидового гибрида *Hordeum vulgare* L. x *H. bulbosum* L. (HvHbHb)

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 25

*Супрун И.И., Насонов А.И.,
Лободина Е.В., Володина Е.А.*

Комплексный подход в создании устойчивых к парше форм яблони: фитопатологическое тестирование и маркер-опосредованный отбор

ОБЗОР 34

*Иванова К.А., Спасельникова А.В.,
Шумный В.К., Герасимова С.В.*

Гены-мишени для метаболической инженерии представителей семейства Solanaceae: эволюция и структурная организация

ОБЗОР 43

*Дунаева С.Е., Орлова С.Ю., Тихонова О.А.,
Гавриленко Т.А.*

Образцы ягодных и плодовых культур и их дикорастущих родичей в коллекции *in vitro* ВИР

ОБЗОР 52

Ухатова Ю.В., Гавриленко Т.А.

Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений

Content

FROM THE EDITOR IN CHIEF 5

ORIGINAL ARTICLE 7

*Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P.,
Orina A.S., Ablova I.B., Bepalova L.A.*

Distinctive metabolites of
Alternaria, *Fusarium* and
Microdochium fungi as a tool
for assessing their relationship
in microbiota of wheat grain

ORIGINAL ARTICLE 16

Pendinen G.I., Chernov V.E., Scholz M.

Biological characterization of
introgressive barley lines
obtained on the basis of the
interspecific hybrid
Hordeum vulgare L. ×
H. bulbosum L. (HvHbHb)

ORIGINAL ARTICLE 25

*Suprun I.I., Nasonov A.I., Lobodina E.V.,
Volodina E.A.*

An integrated approach to
creating scab-resistant apple:
phytopathological testing and
marker-assisted selection

REVIEW 34

*Ivanova K.A., Spaselnikova A.V.,
Shumny V.K., Gerasimova S.V.*

The target genes for Solanaceae
secondary metabolism
engineering: evolution and
genome organization

REVIEW 43

*Dunaeva S.E., Orlova S.Yu.,
Tikhonova O.A., Gavrilenko T.A.*

In vitro collection of berry and
fruit crops and their wild
relatives at VIR

REVIEW 52

Ukhatova Y.V., Gavrilenko T.A.

Cryoconservation methods for
vegetatively propagated crops

Дорогие коллеги!

На сегодняшний день биотехнология растений предлагает для селекции целый спектр сопутствующих методов, с помощью которых можно ускорять создание сортов, делать более точным отбор желаемых генотипов.

Например, технология геномного редактирования CRISPR/Cas¹ к настоящему моменту успешно апробирована на 24 культурах.

Только за последние полтора года опубликованы сведения о редактировании полусотни генов, внесение мутаций в которые улучшило свойства культурных растений. Речь идет о повышении устойчивости к грибным болезням, изменении технологических свойств, улучшении питательной ценности, повышении продуктивности. В Российской Федерации несколько научных центров ведут работы в данном направлении и успешно апробировали технологии геномного редактирования не только на модельных объектах, но и на возделываемых культурах, в частности, на ячмене.

Несмотря на то, что технологии геномного редактирования вошли в нашу жизнь пока лишь как инструмент научно-исследовательской работы, перспективу их использования в практической селекции будущего нельзя недооценивать. Одной из главных новостей науки осени 2018 года стала ускоренная доместикация растений, суть которой в направленном внесении нужных мутаций (при помощи геномного редактирования) в «гены доместикации» дикого родича и его превращения в культурную форму за одно поколение. Ускоренная доместикация позволит активнее использовать генетический потенциал диких родичей при создании новых сортов культурных растений. Наряду с появлением новых методов расширения генетического разнообразия культурных форм не теряет своей актуальности и традиционная отдаленная гибридизация, дополненная технологиями клеточной и хромосомной инженерии.

Еще один комплекс вспомогательных методов, применяемых совместно с подходами классической селекции – это технологии ускоренного отбора генотипов с использованием ДНК-маркеров. К ним относятся маркер-ориентированная и геномная селекция. Технологии маркер-ориентированной селекции (МОС), несмотря на серьезный срок с момента первого опыта их внедрения (более 30 лет назад), только в последние годы начинают охватывать широкий спектр генов-мишеней у разных культур, что



связано с развитием постгеномных технологий, способствовавших ускорению расшифровки большого числа селекционно значимых генов. На сегодняшний день в Российской Федерации сорта, полученные при помощи технологий маркер-ориентированной селекции, уже проходят государственное сортоиспытание.

Если МОС полезна при отборе по признакам с моно- и олигогенным контролем, то геномная селекция – это способ ускоренного отбора генотипов по комплексу количественных признаков. В этом случае у растений, находящихся в селекционном эксперименте, выявляют гены, локализованные в разных участках генома, вносящие наибольший вклад в проявление определенного количественного признака, и отбирают те генотипы, в которых желаемые аллельные варианты присутствуют в максимальном числе локусов, детерминирующих данный количественный признак. При этом отбор аллельных вариантов идет не на основе информации о структуре и функции генов, а на основе оценки SNP-маркеров², тесно сцепленных с генами или внутригенных. Широкое применение геномной селекции стало возможным после

¹ CRISPR/Cas – одна из самых современных систем геномного редактирования. С помощью специальной «направляющей» РНК эта система находит ген-мишень в геноме растения и вносит целевые изменения в его структуру (такие как нокаут гена, замена одного или нескольких нуклеотидов, вставка или делеция).

² SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм, наиболее часто встречающийся тип полиморфизма последовательностей ДНК в геноме растений)

расшифровки полногеномных последовательностей культурных видов растений и развития технологий высокопроизводительного SNP-генотипирования. Использование геномной селекции, а также новых прорывных методов автоматического фенотипирования растений неразрывно связано с вопросом обработки «больших данных» (big data), получаемых в селекционных экспериментах.

Следующий комплекс методов, который представляет несомненный практический интерес – это технологии *in vitro*. К ним относятся методы гаплоидной селекции, которые позволяют существенно сокращать время получения гомозигот, что особенно ценно для гибридной селекции на этапе выведения инбредных родительских форм, а также для создания сортов самоопыляющихся видов растений. Некоторые методы получения гаплоидов сегодня успешно сочетаются и с технологиями геномного редактирования, как способ быстрого создания не-трансгенных гомозиготных мутантных форм растений. К числу технологий *in vitro* также относятся методы клеточной селекции, методы микроклонального размножения ценных генотипов и технологии оздоровления вегетативно размножаемых культур, ставшие неотъемлемым инструментом безвирусного семеноводства и питомниководства.

Сегодня представители ведущих селекционных центров страны и академических институтов, владеющих широким спектром биотехнологических подходов, методами анализа генома и обработки больших данных, объединились вместе для создания нового научного журнала «Биотехнология и селекция растений», первый номер которого Вы держите в руках. Это перио-

дический рецензируемый журнал, открытый для публикации оригинальных результатов исследований, обзорных статей, протоколов и методов в области прикладной биотехнологии культурных растений, а также работ по традиционной селекции продовольственных, кормовых, технических и других культур в сочетании с технологиями *in vitro*, методами геномной и маркер-ориентированной селекции, геномного редактирования, отдаленной гибридизации, клеточной и хромосомной инженерии.

«Биотехнология и селекция растений» является журналом открытого доступа категории «Platinum open access» – бесплатным как для авторов, так и для читателей.

Журнал адресован читателю, интересующемуся не только последними достижениями в области биотехнологии культурных растений и современной селекции, но и новыми трендами в развитии так называемой селекции следующего поколения (next generation breeding).

Приглашаем наших читателей стать авторами журнала и представить для опубликования результаты своих оригинальных исследований, новые протоколы и методики, а также обзорные статьи. Редакция приветствует сопровождение текстов статей цветным иллюстративным материалом, дополнительными электронными приложениями, которые могут включать объемные таблицы, фото- и видеоматериалы. Принимаются статьи как на русском, так и на английском языках. Коллектив, работающий над изданием нового журнала, прилагает все усилия для скорейшего его продвижения в ведущие мировые базы индексирования научных журналов!

Главный редактор,
Профессор РАН,
Е.К. Хлесткина.

МАРКЕРНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ГРИБОВ *ALTERNARIA*, *FUSARIUM* И *MICRODOCHIUM* КАК ИНСТРУМЕНТ ОЦЕНКИ ИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В МИКОБИОТЕ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

Гагкаяева Т. Ю.¹, Гаврилова О. П.¹, Орина А. С.¹,
Аблова И. Б.², Беспалова Л. А.²

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», ш. Подбельского, 3, Санкт-Петербург, Пушкин, 196608, Россия;

² ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко», центральная усадьба КНИИСХ, Краснодар, 350012, Россия
t.gagkaeva@mail.ru

Проведен анализ контаминации микромицетами зерна 17 сортов озимой пшеницы, выращенных в Краснодарском крае на естественном фоне инфекции. Кроме традиционной микологической оценки зараженности зерна грибами использовали методы, основанные на количественном выявлении метаболитов грибов, заведомо отсутствующих в растительной ткани. Определяли диапазоны содержания в зерне пшеницы ДНК грибов *Alternaria*, *Microdochium* и *Fusarium*, а также количества образуемых ими микотоксинов. Установлено обильное присутствие грибов *Alternaria* в зерне всех сортов. Впервые в России проведено количественное выявление в зерне видов грибов *Microdochium*. Показано, что содержание ДНК *M. nivale* значительно превышает содержание ДНК *M. majus*. ДНК представителей рода *Fusarium* также выявлено в зерне всех сортов, однако показано, что *F. graminearum* преобладал в комплексе фузариевых грибов по сравнению с другими видами. Установлен значительный разброс содержаний вторичного метаболита *F. graminearum* – дезоксиниваленола (ДОН), – в зерне всех сортов. Максимальное количество этого метаболита выявлено в зерне восприимчивого сорта Бригада, а минимальное – в зерне сортов Адель и Курс, которые обладали высокой относительной устойчивостью к патогенным грибам *Fusarium*. Доля ДНК *F. graminearum* в процентах от ДНК группы *Fusarium*, образующих трихотеценовые микотоксины, составляла от 6,1% до 100,9%. Этот показатель является индикатором устойчивости растений к заражению патогенами: значения выше 30% характерны для восприимчивых сортов. Выявлена достоверная положительная связь между контаминацией грибами *F. sporotrichioides* и *M. nivale*. В то же время, не установлена связь между наиболее обильно присутствующими в зерне грибами *Alternaria* и показателями его контаминации другими анализированными грибами. Результаты исследования показывают существенные различия реакции генотипов пшеницы на внедрение различных гетеротрофных грибов, и возможность использования количественных показателей для оценки устойчивости. Существенная вариабельность в зерне содержания маркерных метаболитов, присутствующих высокоагрессивным видам грибов, и стабильность этих показателей у сапротрофных организмов, может иметь принципиальное значение при выборе объективных количественных показателей оценки устойчивости растений к инфицированию патогенами.

Ключевые слова: микромицеты, зараженность зерна, ДНК, количественная ПЦР, микотоксины, ИФА.

Прозрачность финансовой деятельности:

авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует

Гагкаяева Т.Ю., Гаврилова О.П., Орина А.С., Аблова И.Б., Беспалова Л.А. Маркерные метаболиты грибов *Alternaria*, *Fusarium* и *Microdochium* как инструмент оценки их взаимоотношений в микобиоте зерна пшеницы. Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):7-15. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-7-15

Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Orina A.S., Ablova I.B., Bepalova L.A. Distinctive metabolites of *Alternaria*, *Fusarium* and *Microdochium* fungi as a tool for assessing their relationship in micobiota of wheat grain. Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):7-15. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-7-15

Distinctive metabolites of *Alternaria*, *Fusarium* and *Microdochium* fungi as a tool for assessing their relationship in micobiota of wheat grain

Gagkaeva T.Yu.¹, Gavrilova O.P.¹, Orina A.S.¹,
Ablova I.B.², Bepalova L.A.²

¹All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR), Podbelskogo shosse, 3, St.Petersburg, 196608, Russia

²National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, central farmstead KNIISH, Krasnodar, 350012, Russia
t.gagkaeva@mail.ru

Fungal contamination of 17 winter wheat varieties grown in the Krasnodar region under the natural infections was analyzed. In addition to the traditional mycological analysis of infection with fungi, methods based on the quantitative detection of metabolites inherent in fungi and absent in the host plant were used. For this purpose, the ranges of DNA contents of *Alternaria*, *Fusarium* and *Microdochium* fungi, as well as mycotoxins produced by these fungi were characterized in the grain. Abundant presence of *Alternaria* fungi was detected without a significant difference between the varieties. A quantitative detection of the *Microdochium* fungi in grain was carried out at the first time in Russia and it was shown that the content of *M. nivale* DNA was significantly exceeds the content of *M. majus* DNA. The dominant of *F. graminearum* in the complex of *Fusarium* fungi in comparison to other species and the significant range of the content of the metabolites produced by this pathogen were shown. The high variation of contents of marker metabolites inherent in highly aggressive species of fungi and the stability of these parameters for saprotrophic organisms can be of fundamental importance in the selection of objective for quantitative measurements of plants resistant to patho-gens. The maximum amount of *F. graminearum* metabolites was found in the grains of susceptible Brigada. The minimum content of *Fusarium* metabolites was established in the grain of Adel and Kurs varieties, which are the relatively resistant to pathogenic *Fusarium* fungi. The proportion of *F. graminearum* DNA as a percentage of the DNA of *Fusarium* group forming trichothecene mycotoxins ranged from 6.1% to 100.9%. This value is an indicator of plant resistance to infection by pathogens. According to our observations, values above 30% are characteristic of susceptible varieties. A positive correlation was found between DNA contents of *M.nivale* and *F. sporotrichioides* fungi. Any significant relations between the most abundantly present fungi of *Alternaria* and the parameters of grain contamination by other analyzed fungi have not been revealed. Diversity of the reactions of wheat genotypes to the invasion of various heterotrophic fungi and the possibility of using objective quantitative assessment of resistance were shown.

Keywords: micromycetes, grain infection, DNA, quantitative PCR, mycotoxins, ELISA.

УДК 632.4:633.11

Поступила в редакцию 03.10.2018

Принята к публикации 08.11.2018

Микобиота зерна пшеницы представлена совокупностью различных таксономических групп грибов. Среди них часто встречаются виды, относящиеся к родам *Alternaria* Nees, *Fusarium* Link, *Microdochium* Syd. & P. Syd. и другие грибы, отличающиеся своими физиолого-биохимическими свойствами. Они могут оказывать разно-стороннее действие на состояние зерна и развивающегося из него растения. Некоторые из них угнетают прорастание семян и вызывают корневые гнили, другие – стимулируют развитие растений.

Накопление первичных метаболитов (белков, жиров, углеводов, нуклеиновых кислот) характеризует скорость образования биомассы грибов и глубину колонизации растения, тогда как образуемые вторичные метаболиты выполняют адаптационную функцию, в том числе преодоление иммунного ответа растений на внедрение, и сдерживание размножения в тканях растения конкурентных видов.

При взаимодействии растений и инфицирующих их грибов возникает каскад метаболических реакций, зависящих от сочетания специфических характеристик организмов и среды их обитания. Заражение зерна пшеницы грибами зависит от условий, складывающихся в период формирования колоса и зерновки, устойчивости сорта, наличия инфекционного фона и др. Разнообразие патогенных свойств гетеротрофных организмов обуславливает различия в защитных реакциях растения-хозяина и, по принципу обратной связи, оказывает влияние на содержание образуемых метаболитов. Анализ содержания в растительной ткани метаболитов грибов позволяет характеризовать взаимодействия растения и патогена, что особенно важно в случаях, когда инфицирование происходит бессимптомно.

Постоянное и долговременное существование различающихся по свойствам микроорганизмов на одном субстрате неизменно приводит к установлению определенных связей между ними. Зачастую решающую роль в том, кто из представителей микобиоты получит преимущество, играют складывающиеся в определенный момент условия окружающей среды. Показано, что между грибами *Fusarium* spp. и *Alternaria* spp. существуют различия в стратегии колонизации растений пшеницы: для активного распространения представителей *Fusarium*, которые являются более агрессивными патогенами и способны легко заражать здоровые растения, необходимы более влажные и прохладные условия, в отличие от грибов *Alternaria* (Schiro et al., 2018). Кроме того, доминирование высоко агрессивного патогена *F. graminearum* Schwabe, как правило, имеет обратную связь с выявлением других грибов (Nicolaisen et al., 2014). Результаты исследований, направленных на сравнение конкурентных свойств грибов *F. graminearum*, *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc., *F. poae* (Peck) Wollenw. и *Microdochium* sp. при заражении ими колоса пшеницы показали, что, несмотря на наличие смешанной инфекции, в одном колосе доминирует один вид гриба (Siou et al., 2015).

Современная практика растениеводства требует постоянного совершенствования методов получения результатов, объективно отражающих взаимодействия растения и патогена. Они включают как оценку изменений биохимического состояния самого растений (Smirnova et al., 2018), так и определение присутствия патогенов и их метаболитов в растительных тканях (Orina et al., 2017). Кроме микологического анализа зараженности зерна грибами в настоящее время используют методы, основанные на количественном выявлении метаболитов, заведомо отсутствующих в растительной ткани, но присущих грибам (Gagkaeva et al., 2017). Такой подход позволяет охарактеризовать иммунный ответ сортов зерновых культур по метаболитным маркерам заселяющих их грибов – по количеству ДНК, синтезируемой в процессе накопления биомассы гриба, и содержанию токсичных метаболитов, характерных для конкретного таксона.

Целью данного исследования являлся анализ взаимоотношений грибов *Alternaria*, *Fusarium* и *Microdochium* в зерне озимой пшеницы различных сортов через содержание метаболитов: ДНК грибов и продуцируемых ими микотоксинов.

Материалы и методы

Образцы зерна

Анализировали 17 сортов озимой пшеницы селекции ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко», выращенных в Краснодарском крае в 2016 году: Адель, Алексеич, Антонина, Баграт, Безостая 100, Бригада, Васса, Велена, ГРОМ, Гурт, Курс, Лебедь, Морозко, Память, Таня, Утриш, Юка. Сорта пшеницы возделывали в условиях естественного инфекционного фона на экспериментальном поле ФГБНУ «НЦЗ им. П. П. Лукьяненко» без применения фунгицидов на делянках площадью 10 кв. м по предшественнику подсолнечник. После уборки урожая пшеницы в оптимальные сроки были отобраны средние образцы зерна каждого сорта, используемые в дальнейшем для лабораторных анализов.

Микологический анализ зараженности зерна

Для оценки внутренней зараженности и выявления видового состава сообщества микромицетов, поверхность зерен каждого образца (не менее 100 шт.) стерилизовали 5% гипохлоритом натрия, затем отмывали стерильной водой. В чашки Петри на поверхность картофельно-сахарозной агаризованной среды (КСА), в которую предварительно вносили раствор смеси антибиотиков НуClone™ (GE Healthcare Life Sciences, Австрия) в концентрации 1 мл/л и раствор Triton X-100 (PanGeac, Испания) в концентрации 0,4 мкл/л, раскладывали поверхностно стерилизованные зерна и инкубировали их при 24°C в темноте. Через 7 суток проводили учет внутренней зараженности зерна грибами: подсчитывали их численность и определяли видовую принадлежность (Gerlach, Nirenberg, 1982; Ellis, 1971; Samson et al., 2002).

Таблица 1. Последовательности праймеров и проб, протоколы амплификации кПЦР, использованные в исследовании
Table 1. The list of primers and probes and the protocols of quantitative PCR used in this study

Целевой объект	Название праймеров и проб	Нуклеотидные последовательности праймеров и проб (5'→3')	Протоколы амплификации	Литературный источник
Пшеница	Hor1,f	TCCTGGGTTTGAGGGTGAC	50° - 2 мин; 95° - 10 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Nicolaisen et al., 2009
	Hor2,r	GGCCCTGTACCAGTCAAGGT		
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	PfusF	CCGCGCCCCGTA AAAACG	95° - 3 мин; [95° - 10 с; 60° - 10 с; 72° - 20 с]×40	Yli-Mattila et al., 2004
	FspoR	ACTGTGTTTGACACAGATC		
<i>Microdochium majus</i>	Mmajus1f	AACCCCTCCCGGGTCAG	50° - 2 мин; 95° - 10 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Nielsen et al., 2013
	Mmajus1r	GGATAAACGACACTTGAAGACAGAAAA		
<i>Microdochium nivale</i>	Mniv1f	TTGGCTTGACAAACAATACTTTT	50° - 2 мин; 95° - 10 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Nielsen et al., 2013
	Mniv1r	AGCACAAACAGGCGTGGATAAG		
<i>Fusarium graminearum</i>	TMFg12,f	CTCCGGATATGTTGCGTCAA	95° - 3 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Yli-Mattila et al., 2008
	TMFg12,r	CGAAGCATATCCAGATCATCCA		
	TMFg12,p	FAM-TGAGAATGTCTTGAGGCAATGCGAACTTT-BHQ1		
Tri- <i>Fusarium</i> *	TMTRI,f	CAGCAGMTRCTCAAGGTAGACCC	95° - 3 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Halstensen et al. 2006
	TMTRI,r	AACTGTAYACRACCATGCCAAC		
	TMTri,p	Cy5-AGCTTGGTGTGGGACTGTCTTACCG-BHQ2		
<i>Alternaria</i>	DirITSAIt	TGTC TTTGCGTACTTCTGTTCCT	95° - 3 мин; [95° - 10 с; 60° - 60 с; 72° - 3 с]×40	Pavón et al., 2012
	InvITSAIt	CGACTTGTGCTGCGCTC		
	AltTM	FAM-AACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAAT-TAMRA		

* Tri-*Fusarium* – виды грибов, способные образовывать трихотеценовые микотоксины.

Молекулярно-генетический анализ зараженности зерна

Зерно каждого образца (20 г) гомогенизировали в стерильных размольных стаканах на мельнице Tube Mill Control (IKA, Германия). Выделение общей ДНК из 200 мг полученной муки проводили с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва). С помощью этого набора также выделяли ДНК из культур типовых штаммов *A. tenuissima* (Nees et T. Nees: Fr.) Wiltshire (MGP556081), *F. graminearum* (MGF58775), *F. sporotrichioides* Sherb. (MGF163303), *M. majus* (Wollenw.) Glynn & S.G. Edwards (MGF58924), *M. nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett (MGF58876), выращенных на КСА. Типовые штаммы грибов хранятся в коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР.

С помощью количественной ПЦР (кПЦР) во всех пробах ДНК, экстрагированных из образцов зерна, определяли содержание ДНК пшеницы, ДНК грибов рода *Alternaria*, ДНК группы видов *Fusarium*, способных к продуцированию трихотеценовых микотоксинов (Tri-*Fusarium*), отдельно ДНК двух видов из этой группы – *F. graminearum*, продуцирующего ДОН, и *F. sporotrichioides*, продуцирующего Т-2 токсин, а также ДНК двух представителей рода *Microdochium* – *M. nivale* и *M. majus* (Табл. 1). Концентрации полученной ДНК из муки и штаммов грибов оценивали, используя флуориметр Qubit 2.0 с набором реагентов Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Исходную концентрацию ДНК штаммов грибов разбавляли до 10 нг/мл и использовали для построения калибровочной кривой в

десятикратных последовательных разведениях от 0,1 до 10⁻⁶ нг/мкл. ДНК, выделенную из зерна, доводили до рабочих концентраций в диапазоне от 2-50 нг/мкл. Все реакции проводили на термоциклере CFX 96 Real-Time System (BioRad, США) минимум двукратно, обработку первичных данных – с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 1.6. Содержание ДНК грибов представляли в виде доли от содержания ДНК пшеницы (пг/нг), поскольку такой прием точнее отображает результат взаимодействия растения и грибов.

Анализ микотоксинов в зерне

С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в зерне всех образцов определяли количества ДОН, Т-2 токсина и альтернариол (АОЛ). Микотоксины экстрагировали из 1 г муки, добавляя 5 мл водного раствора ацетонитрила (84:16, v/v), в условиях постоянного перемешивания на шейкере S-3M (ELMI) при 300 об/мин в течение 14 – 16 часов. Анализ выполняли с помощью диагностических тест-систем «Дезоксиниваленол-ИФА», «Т-2 токсин-ИФА» и «Альтернариол-ИФА» (ВНИИВСГЭ). Нижние пределы чувствительности метода составляли 20 мкг/кг для ДОН и 50 мкг/кг для АОЛ, 4 мкг/кг для Т-2 токсина.

Статистическая обработка

Лабораторные анализы выполнены как минимум двукратно. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 10.0 (ANOVA). Коэффициент вариации (V, %) рассчитывали, как процентное отношение среднеквадратического отклонения к средней арифметической ряда показателей.

Таблица 2. Зараженность грибами и содержание микотоксинов в зерне сортов пшеницы, выращенных на естественном инфекционном фоне (Краснодарский край, 2016)
Table 2. Fungal infection and mycotoxins content in grain of wheat varieties grown under natural infection (Krasnodar region, 2016)

Сорт пшеницы Wheat variety	Зараженность зерна грибами, % Fungal infection of grain, %			Количество микотоксинов, мкг/кг Mycotoxins content, µg/kg	
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Microdochium</i>	ДОН DON	T-2 токсин T-2 toxin
Адель / Adel	89±5	2±1	0	0	0
Алексеич / Alekseich	81±2	2±1	3±1	0	12±1
Антонина / Antonina	68±7	6±1	2	62±10	0
Баграт / Bagrat	81±5	5,0±0,5	1±0,5	130±25	0
Безостая 100 / Bezostaya 100	93±6	6±1	0	43±13	0
Бригада / Brigada	86±3	11±2	0	421±20	0
Васса / Vassa	83±2	10±1	4±1	134±6	0
Велена / Velena	91±6	6±1	10±2	166±5	0
ГРОМ / GROM	77±8	8±2	3±1	189±9	5,5±0,5
Гурт / Gurt	92±3	2	5,0±0,5	33±3	6±0
Курс / Kurs	85±5	4±1	4±2	50±23	0
Лебедь / Lebed'	83±8	7±2	2	11±15	5±1
Морозко / Morozko	89±5	6	3±1	54±3	5,5±0,5
Память / Pamyat'	89±6	6±2	2	172±33	0
Таня / Tanya	93±2	4	0	12±17	0
Утриш / Utrish	78±4	15,0±0,5	3±1	162±5	20±3
Юка / Yuka	74±1	3,0±0,5	15±3	24±6	8,5±0,5
V, %^a	10,4	57,3	115,5	109,1	153,2

^a В таблице приведены средние значения показателей ± доверительный интервал, при уровне значимости $p < 0,05$. ^b V – коэффициент вариации.

Результаты

Зараженность зерна грибами

Наиболее обильно в микобиоте зерна всех анализированных сортов пшеницы были представлены грибы рода *Alternaria*. Зараженность этой группой грибов колебалась в пределах от 68 до 93 % зерновок (Табл. 2).

Зараженность зерна грибами *Fusarium* также была выявлена у всех сортов и составляла в среднем 6,1 %. Доминирующую долю (34,8 %) от общего числа выявленных фузариевых грибов занимал *F. graminearum*. Реже встречались изоляты видов *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum* (Corda) Sacc., *F. incarnatum* (Desm.) Sacc., *F. equiseti* (Corda) Sacc. и *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Выявлена значительная встречаемость грибов рода *Microdochium* – в зерне 13 из 17 анализируемых сортов пшеницы, с максимальной зараженностью 15% зерновок.

Кроме представителей родов *Alternaria*, *Fusarium* и *Microdochium*, которых можно отнести к доминирующим составляющим микобиоты зерна, также были выделены изоляты других грибов, идентифицированных как виды родов *Bipolaris* Shoemaker, *Cladosporium* Link, *Epicoccum* Link, *Penicillium* Link и *Phoma* Sacc.

На основании результатов микологического анализа были выбраны объекты для дальнейших молекулярно-генетических исследований.

Содержание ДНК грибов в зерне

Выявленное количество ДНК грибов *Alternaria* в зерне пшеницы было высоким и в среднем составило 1,5–4,0 пг/нг, при этом в зерне различных сортов не обнаружено существенного варьирования значений этого показателя (Рисунок). Также в зерне обнаружено высокое количество ДНК группы Tri-*Fusarium*, с диапазоном значений 0,14–0,42 пг/нг. Содержание ДНК *F. graminearum* в зерне пшеницы значительно варьировало 0,01–0,43 пг/нг. Такие существенные различия по содержанию ДНК этого патогена позволили распределить все анализированные сорта на три группы. Первую группу сортов, с низким содержанием ДНК *F. graminearum* (не более 0,03 пг/нг) составили Адель, Таня, Лебедь, Курс, Гурт и Юка. Ко второй группе сортов, с диапазоном выявленных количеств ДНК гриба 0,03–0,10 пг/нг, были отнесены Алексеич, Морозко, ГРОМ, Васса, Баграт и Безостая 100. Третью группу сортов, содержащих наибольшее количество ДНК *F. graminearum* (более 0,10 пг/нг), составили Антонина, Утриш, Память, Велена и Бригада. Количество выявленной во всех образцах зерна ДНК *F. sporotrichioides* было существенно меньше, чем ДНК *F. graminearum*, но также значительно

варьировало в зависимости от сорта. Сорта Память и Курс содержали наименьшие количества ДНК *F. sporotrichioides* – $5,7 \times 10^{-4}$ и $7,8 \times 10^{-4}$ пг/нг, соответственно, а наибольшим значением этого показателя характеризовался сорт Юка – 0,05 пг/нг. С помощью кПЦР выявлено присутствие в зерне пшеницы двух видов *Microdochium*: *M. nivale* и *M. majus*. Количество ДНК гриба *M. nivale* в зерне составило 0,06–0,93 пг/нг и было в среднем в три раза выше, по сравнению с количеством *M. majus* (0,042–0,20 пг/нг).

Содержание микотоксинов в зерне

В зерне сортов пшеницы, выращенных в естественных условиях, ДОН был выявлен во всех сортах, кроме Адель и Алексеич. Максимум этого микотоксина (420 мкг/кг) был выявлен в зерне сорта Бригада. Т-2 токсин, образуемый некоторыми видами грибов *Fusarium*, обнаружен в зерне только шести сортов в незначительных количествах (от 5 до 20 мкг/кг). Микотоксин АОЛ, который является одним из метаболитов, образуемых видами грибов *Alternaria*, не был обнаружен в образцах зерна всех сортов пшеницы.

Обсуждение

Выявленные диапазоны содержания в зерне метаболитов различных видов грибов демонстрируют генетическую детерминированность взаимоотношений растений и заселяющих их гетеротрофных организмов, что является веским основанием для использования количественных показателей в качестве критериев устойчивости растений к патогенам. Создание генотипов с групповой устойчивостью представляет серьезную проблему, особенно если визуальный анализ не позволяет корректно провести сравнительную оценку устойчивости/восприимчивости, поскольку видимые симптомы присутствия патогенов часто не наблюдаются. Совмещение классических и современных методов количественной оценки реакции растений на внедрение грибов даёт возможность приблизиться к пониманию природы механизмов взаимодействия компонентов. Трофические связи нескольких организмов различной патогенности, совместно населяющих растение, и его иммунологический ответ могут коренным образом отличаться от редко встречающихся в естественных биоценозах взаимоотношений конкретного патогена и растения-хозяина, – модели, часто используемой в условиях искусственной инокуляции (Gagkaeva et al., 2018). Для совершенствования создания устойчивых по заданным параметрам генотипов необходимо развитие исследований взаимодействия продуцентов и консументов различных порядков в агробиоценозах и выявление механизмов генетической реакции растений (Vilkova, 2000). Нами установлено, что содержание ДНК грибов *Alternaria*, так же, как и число зараженных ими зерен, были высокими без существенной разницы между сортами. Подтверждением служат коэффициенты вариации (V) этих показателей, которые составили 25,9 и 10,4%, соответственно. Низкие значения данного коэффициента, демонстрирующего однородность показателя изменчивости признака, свидетельствуют об отсутствии специфических реакций растений на проникновение гриба. По всей видимости, поскольку грибы рода *Alternaria* взаимодействуют с растениями

пшеницы как сапротрофы, то их обилие в растительной ткани зависит в основном, от условий среды и не вызывает специфического иммунного ответа растения. Один из наиболее распространенных вторичных метаболитов грибов рода *Alternaria* – АОЛ (Andersen, Frisvad, 2004; Zwickel et al. 2018) в нашем исследовании в зерне всех 17 сортов пшеницы не выявлен. Согласно опубликованным данным, этот микотоксин встречается в зерне пшеницы реже и более низких количествах, по сравнению с другими злаковыми культурами (Burkin, Kononenko, 2011). Тем не менее, обнаружение АОЛ не является чем-то исключительным, например, ранее этот микотоксин был выявлен в зерне 29% анализированных образцов овса, выращенных на северо-западе России, и его максимальное количество достигало 1545 мкг/кг (Burkin et al., 2015). К видам грибов *Fusarium*, продуцирующим трихотеценовые микотоксины, относятся многие широко встречающиеся виды, среди которых есть как высокоагрессивные патогены *F. graminearum* и *F. sporotrichioides*, так и виды, характеризующиеся как сапротрофы и эндофиты, например, *F. langsethiae* Torp & Nirenberg, продуцирующий Т-2 токсин, или *F. poae* и *F. cerealis* (Cooke) Sacc., образующие ниваленол. По всей видимости, кроме высокоагрессивных патогенов, присутствие которых определяется устойчивостью сорта, возможную нишу в трофических отношениях с растением занимают грибы с сапротрофным типом питания. Коэффициент вариации общего числа всех фузариевых грибов в зерне сортов пшеницы составил 57,3%. Такая же ситуация наблюдалась и в случае оценки содержания ДНК грибов Tri-*Fusarium*, которое имело незначительный разброс по сортам (V=36,0 %). Таким образом, суммарная биомасса грибов Tri-*Fusarium* в зерне сортов пшеницы была достаточно выровненной. В то же время содержания ДНК *F. graminearum* и *F. sporotrichioides* варьировали значительно (V=129,3–133,0 %), показывая существенное различие реакции генотипов на внедрение агрессивных патогенов.

Существует устоявшееся мнение, что устойчивость сорта к одному виду гриба *Fusarium* сохраняется в случае его заражения другими видами грибов этого рода. Ранее это было подтверждено, как минимум, для видов *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. sporotrichioides* (Mesterhazy, 2002). Однако все эти виды грибов являются относительно агрессивным и реакцию растений на их внедрение оценивали на фоне искусственной инокуляции. Мы же выявляли взаимоотношения различающихся по патогенности видов, естественным образом взаимодействующих с растениями. Выявленная достоверная положительная связь между содержаниями ДНК группы Tri-*Fusarium* и ДНК гриба *F. graminearum* ($r=0,68$, $p < 0,05$) подчеркивает преобладание этого патогена в комплексе трихотеценопродуцирующих фузариевых грибов по сравнению с другими видами (Табл. 3).

Если оценить долю ДНК *F. graminearum* в процентах от ДНК группы Tri-*Fusarium*, то этот показатель по сортам будет колебаться от 6,1 % до 100,9 %. По нашему мнению, если такое соотношение более 30 %, то сорт следует характеризовать как восприимчивый.

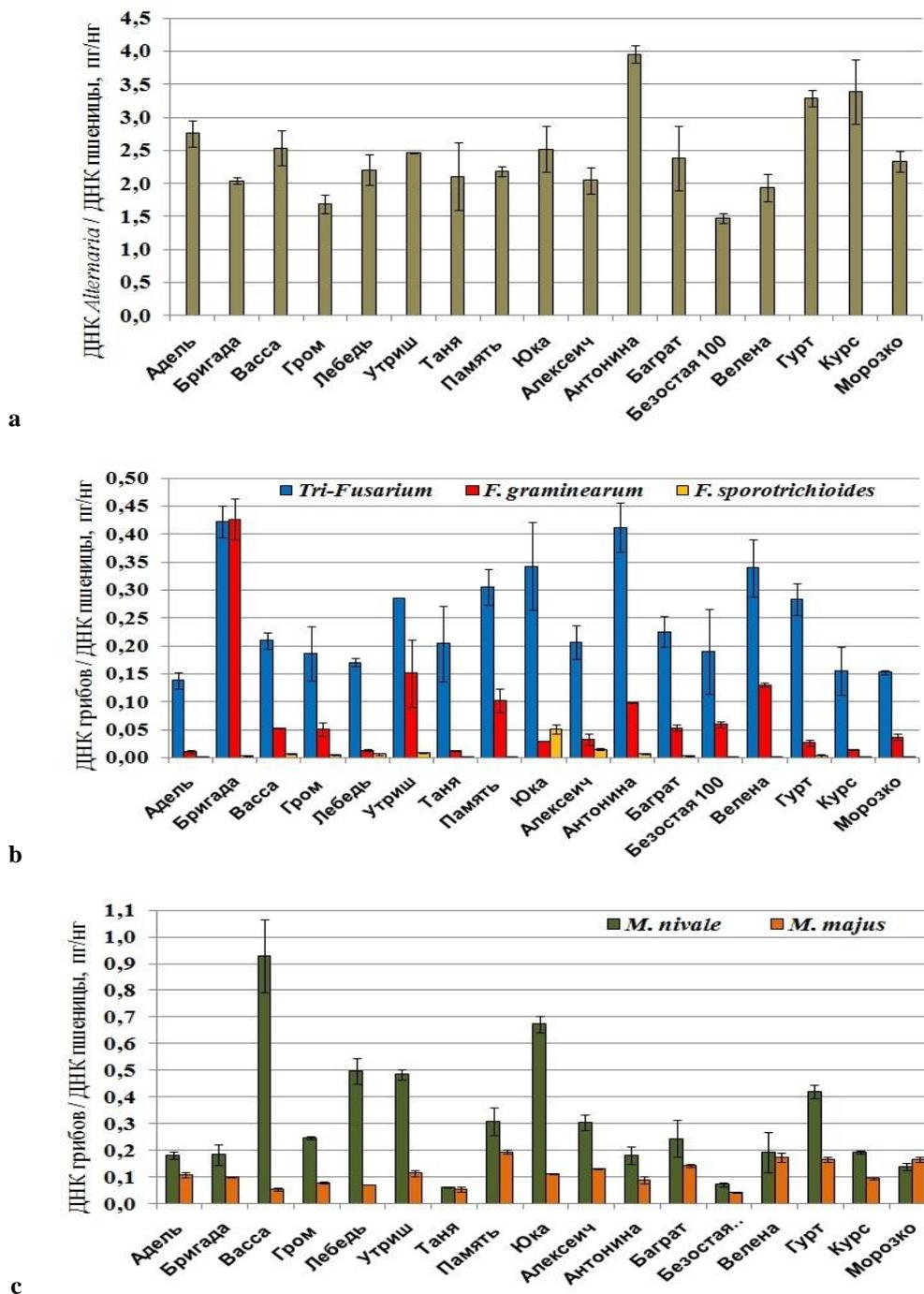


Рисунок. Содержание ДНК грибов (а – *Alternaria*, б – *Fusarium*, в – *Microdochium*) в зерне сортов пшеницы, выращенных на естественном инфекционном фоне (Краснодарский край, 2016)

Figure. The content of fungal DNA (а – *Alternaria*, б – *Fusarium*, в – *Microdochium*) in grain of wheat varieties grown under natural infection (Krasnodar region, 2016)

К таким сортам были отнесены Бригада (100,9 %), Утриш (53,1 %), Велена, Память, Безостая 100 (38,5–31,4%). Чем сорт устойчивее к заражению патогеном, тем меньше доля ДНК *F. graminearum*: сорта Адель, Лебедь, Таня, Юка, Гурт и Курс могут быть охарактеризованы как

относительно устойчивые (6,1–9,4%). Несомненно, факт ингибирования устойчивыми сортами развития высокоагрессивных патогенов в тканях растений и их «либерализм» в отношении сапротрофов в дальнейшем должен быть изучен с точки зрения механизмов иммунитета. Тем

не менее, в случае выбора объективных количественных методов такой подход может оказать определенную помощь в диагностике устойчивых к фузариозу растений.

Таблица 3. Взаимосвязь показателей контаминации грибами и микотоксинами зерна пшеницы
Table 3. Relationship between measured parameters characterizing contamination of wheat grains by fungi and mycotoxins

Показатели Indicators		Зараженность зерна грибами Fungal infection of grain			ДНК грибов Fungal DNA						ДОН DON
		<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Microdochium</i>	<i>Alternaria</i>	Tri- <i>Fusarium</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>M. nivale</i>	<i>M. majus</i>	
Зараженность зерна Fungal infection of grain	<i>Fusarium</i>	-0,31									
	<i>Microdochium</i>	-0,26	-0,18								
ДНК грибов Fungal DNA	<i>Alternaria</i>	0,40	-0,22	0,09							
	Tri- <i>Fusarium</i>	-0,22	0,27	0,31	0,21						
	<i>F. graminearum</i>	-0,13	0,59*	-0,15	-0,17	0,68**					
	<i>F. sporotrichioides</i>	-0,05	-0,33	0,78**	0,17	0,33	-0,18				
	<i>M. nivale</i>	-0,07	0,26	0,46	0,13	0,07	-0,12	0,47			
	<i>M. majus</i>	0,31	-0,21	0,29	0,10	0,25	0,09	0,15	-0,10		
Микотоксины Mycotoxins	ДОН	-0,15	0,66**	-0,13	-0,28	0,55*	0,90**	-0,27	-0,02	0,13	
	Т-2 токсин	-0,14	0,30	0,25	-0,07	-0,00	-0,04	0,39	0,33	0,14	-0,11

Коэффициенты корреляции существенны при уровне значимости * $p < 0,05$ и ** $p < 0,001$.

Выявлена высокая достоверная положительная связь между присутствием ДНК *F. graminearum* и содержанием в зерне образуемого им метаболита ДОН ($r=0,90$, $p<0,001$). Максимальное количество ДОН выявлено в зерне сорта Бригада, также содержащего максимальное количество ДНК *F. graminearum*. Кроме того, содержание ДОН было положительно связано с общим числом выявленных в зерне грибов *Fusarium* ($r=0,66$, $p<0,001$) и ДНК Tri-*Fusarium* ($r=0,55$, $p<0,05$). Микотоксин ДОН, являясь фактором патогенности, способствует подавлению представителей сопутствующей микобиоты – конкурентов за субстрат и питательные вещества, необходимые для роста и развития патогенов (Audenaert et al., 2013). С этой точки зрения интересно проследить доли конкурирующих за субстрат грибов *F. graminearum* и *F. sporotrichioides* в группе грибов Tri-*Fusarium*. Минимальные значения доли гриба *F. sporotrichioides* выявлены в зерне сортов, где содержание ДНК *F. graminearum* значительно, за исключением сортов

Адель и Курс, которые, по всей видимости, обладают уникальной устойчивостью к патогенам рода *Fusarium*.

Достоверной связи между содержаниями ДНК *F. sporotrichioides* и ДНК Tri-*Fusarium* не выявлено, что обусловлено низкой зараженностью зерна грибом *F. sporotrichioides*, которая также привела к отсутствию какой-либо связи (при $p<0,05$) между содержанием ДНК этого гриба и его метаболита – Т-2 токсина. Хотя в данном исследовании невозможно ранжировать сорта по содержанию Т-2 токсина, однако максимальное содержание этого микотоксина установлено в зерне двух сортов Гурт и Юка, где также доля ДНК гриба *F. sporotrichioides* была наиболее высокой (11,6 – 15,1%).

Впервые в России проведено количественное выявление в зерне видов грибов рода *Microdochium*. Установлено, что содержание ДНК *M. nivale* значительно превышает содержание ДНК *M. majus*. Этот факт объясняет выявленную достоверную положительную связь ($r=0,46$, $p<0,05$) между числом зараженных зерен грибами

Microdochium и количеством ДНК *M. nivale*. Коэффициент вариации содержания ДНК в зерне пшеницы был выше у гриба *M. nivale* (V=71 %), по сравнению с *M. majus* (V=47 %). Виды *Microdochium* не образуют микотоксины и как эндофиты сопровождают растение на протяжении всего жизненного цикла. Однако в отдельные годы в условиях ослабления растений под действием абиотических и биотических факторов, они приводят к визуально заметным заболеваниям зерновых культур, вызывая снежную плесень на посевах озимых культур в весенний период, а позднее пятнистость листьев, паршу колоса и зерна (Gagkaeva et al., 2017). Своевременное количественное выявление их присутствия в растениях чрезвычайно важно и позволит прогнозировать развитие ситуации во время вегетации. В нашем исследовании выявлена значительная положительная корреляция между зараженностью зерна грибом *M. nivale* и количеством ДНК *F. sporotrichioides* ($r=0,78$, $p<0,001$). Связи между наиболее обильно присутствующими грибами *Alternaria* и показателями зараженности зерна другими анализированными грибами и их микотоксинами не выявлено. На сегодняшний день очень мало сведений о механизмах реакции сортов на инфицирование зерна представителями различных таксономических групп грибов. Очевидно, что иммунологический ответ организма растения может быть различен при заражении зерна грибами, отличающимися по физиологическим характеристикам. Соответствие реакции сортов по устойчивости к различным представителям сообщества гетеротрофных организмов, обитающих на зерне, должно являться темой будущих исследований.

Благодарности: исследование выполнено при поддержке проекта РФФ № 14-26-00067.

References/Литература

- Andersen B, Frisvad JC (2004) Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *J Agric Food Chem* 52(25): 7507–7513. doi:10.1021/jf048727k
- Audenaert K, Vanheule A, Höfte M, Haesaert G (2013) Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins (Basel)* 6: 1–19. doi:10.3390/toxins6010001
- Burkin AA, Kononenko GP (2011) Enzyme immunassay of alternariol for the assessment of risk of agricultural products contamination. *Appl Biochem Microbiol* 47(1): 72–76. doi:10.1134/S0003683811010030
- Burkin AA, Kononenko GP, Gavrilova OP, Gagkaeva TYu (2015) Микотоксикологическое обследование зерна овса и продуктов его переработки // Современная микология в России. 2015. Т.5. С.221–223.
- Ellis MB (1971) *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Gagkaeva TYu, Gavrilova OP, Orina AS, Blinova EV, Loskutov IG (2017) Response of wild *Avena* species to fungal infection of grain. *The Crop Journal* 5(6): 499–508. doi: 10.1016/j.cj.2017.04.005
- Gagkaeva TYu, Orina AS, Gavrilova OP, Aablova IB, Bepalova LA (2018) Characterization of resistance of winter wheat varieties to *Fusarium* head blight (Harakteristika sortov ozimoy pshenicy po ustojchivosti k fuzariozu zerna). *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 22 (6): 685–692 [in Russian] (Гагкаева Т. Ю., Орина А. С., Гаврилова О. П., Аблова И. Б., Беспалова Л. А. Характеристика сортов озимой пшеницы по устойчивости к фузариозу зерна // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 6. С. 685–692). doi:10.18699/VJ18.411
- Gannibal PhB (2018) Factors affecting *Alternaria* appearance in grains in European Russia (Izuchenie faktorov, vliyayushchih na razvitiye al'ternarioza zerna u zlakov, vozdel'nyayemyh v evropejskoj chasti Rossii). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya – Agricultural Biology* 53(3): 605–615 [in Russian] (Ганибал Ф. Б. Изучение факторов, влияющих на развитие альтернариоза зерна у злаков, возделываемых в европейской части России // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 3. С. 605–615). doi: 10.15389/agrobiology.2018.3.605rus
- Gerlach W, Nirenberg HI (1982) *The genus Fusarium — a pictorial atlas*. Berlin: Dahlem.
- Halstensen AS, Nordby KC, Eduard W, Klemsdal SS (2006) Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins. *J Environ. Monit* 8: 1235–1241. doi: 10.1039/b609840a
- Kahl SM, Ulrich A, Kirichenko AA, Müller ME (2015) Phenotypic and phylogenetic segregation of *Alternaria infectoria* from small-spored *Alternaria* species isolated from wheat in Germany and Russia. *J Appl Microbiol* 119(6): 1637–1650. doi:10.1111/jam.12951
- Lawrence DP, Rotondo F, Gannibal PhB (2016) Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycol Prog* 15:3. doi:10.1007/s11557-015-1144-x
- Mesterházy A, Bartók T, Kászonyi G, Varga M, Tóth B, Varga J (2005) Common resistance to different *Fusarium* spp. causing *Fusarium* head blight in wheat. *Eur J Plant Pathol* 112: 267–281. doi:10.1007/s10658-005-2853-9
- Nicolaisen M, Justesen AF, Knorr K, Wang J, Pimmschmidt HO (2014) Fungal communities in wheat grain show significant co-existence patterns among species. *Fungal Ecol* 11: 145–153. doi: 10.1016/j.funeco.2014.06.002
- Nicolaisen M, Suproniene S, Nielsen LK, Lazzaro I, Spliid NH, Justesen AF (2009) Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *J Microbiol Methods* 76: 234–240. doi: 10.1016/j.mimet.2008.10.016
- Nielsen LK, Justesen AF, Jensen JD, Jørgensen LN (2013) *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* in seed samples of Danish small grain cereals. *Crop Prot* 43: 192–200. doi: 10.1016/j.cropro.2012.09.002
- Orina AS, Gavrilova OP, Gagkaeva TYu, Loskutov IG (2017) Symbiotic relationships between aggressive *Fusarium* and *Alternaria* fungi colonizing oat grain (Simbioticheskie vzaimootnosheniya gibrov roda *Fusarium* i *Alternaria*, koloniziruyushchih zerno ovsa). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya – Agricultural Biology* 52(5): 986–994 [in Russian] (Орина А. С., Гаврилова О. П., Гагкаева Т. Ю., Лоскутов И. Г. Симбиотические взаимоотношения грибов рода *Fusarium* и *Alternaria*, колонизирующих зерно овса // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 5. С. 986–994). doi: 10.15389/agrobiology.2017.5.986rus
- Pavón MÁ, González I, Martín R, García Lacarra T (2012) ITS-based detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR. *Food Microbiol* 32: 165–171. doi:10.1016/j.fm.2012.05.006
- Rotem J (1994) *The genus Alternaria. Biology, epidemiology and pathogenicity*. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O (2002) *Introduction to food- and airborne fungi*. Sixth Ed. Utrecht: Centraalbureau Voor Schimmelcultures.
- Schiro G, Verch G, Grimm V, Müller MEH (2018) *Alternaria* and *Fusarium* fungi: differences in distribution and spore deposition

- in a topographically heterogeneous wheat field. *J Fungi* (Basel) 4: 63. doi:10.3390/jof4020063
- Siou D, Gélisse S, Laval V, Suffert F, Lannou C (2015) Mutual exclusion between fungal species of the *Fusarium* head blight complex in a wheat spike. *Appl Environ Microbiol* 81(14): 4682–4689. doi:10.1128/AEM.00525-15
- Smirnova OG, Shumnyj VK, Kochetov AV (2018) The gene network and the database of gene of resistance of wheat to pathogenic fungi (Gennaya set' i baza dannyh genov ustojchivosti pshenicy k patogennym gribam). *Fiziologiya rastenij – Russian Journal of Plant Physiology* 65(3): 181–195 [in Russian] (Смирнова О. Г., Шумный В. К., Кочетов А. В. Генная сеть и база данных генов устойчивости пшеницы к патогенным грибам // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 3. С. 181–195). doi:10.7868/S0015330318030028
- Tralamazza SM, Piacentini KC, Iwase CHT, de Oliveira Rocha L (2018) Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Curr Opin Food Sci* 23: 57. doi: 10.1016/j.cofs.2018.05.002
- Vilkova NA (2000) Plant immunity against pest organisms and its role in stabilizing agroecosystems and plant growing (Immunitet rastenij k vrednym organizmam i ego biocenoticheskoe znachenie v stabilizacii agroehkosistem i povyshenii ustojchivosti rastenievodstva). *Vestnik zashchity rastenij – Plant Protection News* (2): 3–15. [in Russian] (Вилкова Н. А. Иммуитет растений к вредным организмам и его биоценоотическое значение в стабилизации агроэкоосистем и повышении устойчивости растениеводства // Вестник защиты растений. 2000. № 2. С. 3–15).
- Yli-Mattila T, Paavanen-Huhtala S, Jestoi M, Parikka P, Hietaniemi V, Gagkaeva T, Sarlin T, Haikara A, Laaksonen S, Rizzo A (2008) Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Arch Phytopathology Plant Protect* 41: 243–260. doi:10.1080/03235400600680659
- Zwickel Th, Kahl SM, Rychlik M, Müller MEH (2018) Chemotaxonomy of mycotoxigenic small-spored *Alternaria* fungi – do mult toxin mixtures act as an indicator for species differentiation? *Front Microbiol* 9: 1368. doi:10.3389/fmicb.2018.01368

ХАРАКТЕРИСТИКА ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ ЯЧМЕНЯ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ МЕЖВИДОВОГО ГИБРИДА

Hordeum vulgare L. × *H. bulbosum* L. (H^vH^bH^b)

Пендинен Г. И.¹, Чернов В. Е.¹, Шольц М.²

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И.Вавилова, ул.Большая Морская, д.42, 44, 190000, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: pendinen@mail.ru

²Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops (ZL), Rudolf-Schick-Platz 3a, Groß Lüsewitz, 18190, Sanitz, Germany

Актуальность Привлечение чужеродного генетического материала *Hordeum bulbosum* L. для расширения разнообразия ячменя культурного является важной задачей, поскольку этот вид характеризуется рядом ценных признаков. Одним из путей использования генетического потенциала ячменя луковичного служит межвидовая гибридизация и получение на основе гибридов фертильных интрогрессивных линий *H. vulgare*. Целью нашего исследования было изучение в полевых условиях интрогрессивных линий культурного ячменя, полученных на основе триплоидного гибрида *H. vulgare* L. cv 'Igrī'(2x) × *H. bulbosum* (4x) в сравнении с исходным сортом Igrī. **Материал и методы** В полевых условиях изучали линии ячменя с терминальными интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного в различных плечах хромосом: 1HL, 2HL, 3HL, 7HL, 2HS, 1HL + 5HL, и с субтерминальной интрогрессией в хромосоме 5HL. Для идентификации интрогрессий и анализа их сохранения при полевой репродукции использовали метод *in situ* гибридизации (FISH, GISH). При культивировании в поле у растений определяли зимостойкость, озерненность. Структурный анализ растений проводили на побегах главного колоса после созревания. Показатели качества зерна определяли неразрушающим методом – спектроскопией в ближней инфракрасной области, используя БИК анализатор Инфралом ФТ-10. **Результаты** Было установлено, что для растений изучаемых линий характерно, как и для родительского сорта, закрытое цветение, линии сохраняют интрогрессии в потомстве при культивировании в поле без изоляции. Анализ показал, что небольшие фрагменты хромосом *H. bulbosum* 1HL, 2HL, 3HL, 1HL + 5HL, 7HL, 5HL изучаемых линий не оказывают существенного влияния на характеристику сорта по признакам фертильности, продуктивности и качества зерна. Отличия от исходного сорта отмечено у линии 14.10 с интрогрессией генетического материала в хромосоме 2HS. Для нее характерна более низкая фертильность и продуктивность при более высоком, чем у исходного сорта, содержании белка. **Выводы** Изученные линии представляют собой высокофертильные формы ячменя, для которых характерно закрытое цветение и самоопыление, что обеспечивает сохранение интрогрессивных чужеродных фрагментов хромосом в последующих поколениях. Интрогрессия генетического материала *H. bulbosum* в терминальный участок короткого плеча хромосомы 2H вызывает изменения некоторых характеристик сорта Igrī. **Ключевые слова:** ячмень, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, межвидовая гибридизация, чужеродная интрогрессия, интрогрессивная линия

Прозрачность финансовой деятельности:

авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует

Пендинен Г.И., Чернов В.Е., Шольц М. Характеристика интрогрессивных линий ячменя, полученных на основе межвидового гибрида *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H^vH^bH^b). Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):16-24. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-16-24

Pendinen G. I., Chernov V. E., Scholz M. Biological characterization of introgressive barley lines obtained on the basis of the interspecific hybrid *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H^vH^bH^b). Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):16-24. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-16-24

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF INTRO- GRESSIVE BARLEY LINES OBTAINED ON THE BASIS OF THE INTERSPECIFIC HYBRID *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. (H^vH^bH^b)

Pendinen G. I.¹, Chernov V. E.¹, Scholz M.²

¹N.I.Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Bolshaya Morskaya St., St.Petersburg. 19000, Russia. E-mail: pendinen@mail.ru

²Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops (ZL), Rudolf-Schick-Platz 3a, Groß Lüsewitz, 18190, Sanitz, Germany

Background. Involving alien genetic material *Hordeum bulbosum* in the genome for the expansion of the genetic diversity of barley is a cultural important task because this species is characterized by a number of valuable traits. One way of using the genetic potential of bulbous barley is interspecies hybridization and the production of fertile introgressive lines of *H. vulgare* on the base of interspecies hybrids. The purpose of our investigation was to study introgressive lines of cultural barley obtained on the basis of the triploid hybrid *H.vulgare* cv 'Igrī' (2x) × *H. bulbosum* (4x) in compare to the original Igrī variety in the field conditions. **Materials and methods.** In the field conditions the barley lines with intro-gressions of the genetic material of bulbous barley in the different arms of chromosomes *H. vulgare* (1HL, 2HL, 3HL, 5HL, 7HL, 2HS, 1HL + 5HL) were studied. **Methods.** *In situ* hybridization (FISH, GISH) was used to identify the introgressions and to analyze their saving in line kar-yotypes after field reproduction. For cultivated in field conditions plants the estimation of winter survival and graininess were estimated. Structural analysis of plants was carried out on tillers of the main spike after maturation. The quality of the grain was determined by the non-destructive method of monitoring - near infrared spectroscopy, using the Infraloom FT-10 BIC analyzer. **Results.** Closed flowering and self pollination were observed for plants of the studied lines same as for parent variety. The introgressions were saved in the offspring when the plants cultivated in a field conditions without isolation of spike. The analysis showed that small fragments of chromosomes of *H. bulbosum* in chromosomes 1HL, 2HL, 3HL, 5HL, 7HL, 1HL + 5HL of the studied lines do not significantly affect on characteristics (of fertility, productivity and grain quality) of the variety. Differences from the initial variety were observed at line 14.10 with the introgression of genetic material in the chromosome 2HS. It is characterized by lower fertility and productivity, and protein content in the grain is higher than that of the original variety. **Conclusions** The studied lines are highfertility forms of barley. The introgression of the genetic material of *H. bulbosum* into the terminal region of the short arm of the chromosome 2H causes changes in some characteristics of the Igrī variety. **Key words:** barley, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, interspecific hybridization, alien introgression, introgressive line

УДК 575.222.72

Поступила в редакцию 17.10.2018
Принята к публикации 08.11.2018

Межвидовая гибридизация является одним из важных методов расширения генетического разнообразия видов культурных растений. Дикорастущие виды рода *Hordeum* L. обладают рядом ценных признаков, однако их использование в скрещиваниях с *H. vulgare* ограничено. В зависимости от возможности использования в селекции культурного ячменя, виды *Hordeum* относят к первичному, вторичному и третичному генным пулам (Bothmer et al., 1992). Первичный генный пул включает все многообразие *H. vulgare* (селекционные сорта, ландрасы, дикорастущие подвиды, такие как *H. vulgare* subsp. *spontaneum*, которые свободно скрещиваются с культурным ячменем, дают плодovitое потомство). К вторичному генетическому пулу относят ячмень луковичный *H. bulbosum*. Третичный генный пул составляют все остальные виды, в настоящее время генофонд этих видов не использован для расширения генетического разнообразия *H. vulgare* из-за репродуктивных барьеров и межвидовой несовместимости на разных стадиях развития гибридов. Ячмень луковичный нашел применение в селекции для получения удвоенных гаплоидов культурного ячменя (Ho, Jones, 1980; Furusho, 1995). Кроме того, образцы этого вида характеризуются рядом ценных признаков, таких как устойчивость к мучнистой росе, стеблевой и листовой ржавчине, которые могут быть перенесены в геном культурного ячменя при межвидовой гибридизации (Jones, Pickering, 1978). На основе гибридов *H. vulgare* с *H. bulbosum* получены фертильные интрогрессивные линии (Pickering, 1988; Pickering, 1992; Pickering et al. 1994; Pickering et al., 2000; Jonson, Pickering, 2002; Scholz et al., 2009). Среди них выделены формы, характеризующиеся устойчивостью к болезням, переданной от луковичного ячменя. У линий, устойчивых к листовой ржавчине, генетический материал луковичного ячменя интрогрессирован в длинное плечо 2Н или 4Н хромосомы *H. vulgare*, а у форм, устойчивых к стеблевой ржавчине – в короткое плечо хромосомы 6Н, устойчивость к ринхоспориозу передана с интрогрессией генетического материала *H. bulbosum* в короткое плечо хромосомы 4Н, устойчивость к мучнистой росе – с интрогрессией в короткое плечо хромосомы 2Н (Pickering et al., 2000; Pickering et al., 2006; Shtaya et al., 2007). Среди межвидовых гибридов культурного ячменя с ячменем луковичным, а также полученных на их основе интрогрессивных линий выявлены формы, устойчивые к VaMMV, VaYMV, BYDV вирусам, идентифицированы новые гены устойчивости (Michel, 1996; Szigat, Szigat, 1991; Ruge, et al, 2003; Ruge-Wehling et al., 2006; Scholz et al., 2009). Интрогрессия генетического материала *H. bulbosum* в геном ячменя культурного происходит в результате мейотической рекомбинации гомеологичных хромосом в терминальных участках хромосомных плеч (Zhang et al., 1999; Pickering et al., 2004; Pickering et al., 2006; Scholz et al., 2017)

В наших совместных исследованиях (начиная с 2005 года) на базе института Сельскохозяйственных растений (Гросс Люзевиц) на основе триплоидных гибридов культурного ячменя сорта Igrі с *H. bulbosum* (4x) получена серия форм ячменного типа с интрогрессиями *H. bulbosum* в хромосомах 1НL, 2НL, 3НL, 5НL, 7НL, 2НS. При получении линий все работы проводились в условиях теплицы, в

дальнейшем линии размножали, выращивая их после яровизации в лабораторных условиях в сосудах на вегетационной площадке, семена получали от самоопыления при изолировании колосьев.

Целью нашего исследования была характеристика фертильности, продуктивности, качества зерна изучаемых интрогрессивных линий и их сравнении по этим признакам с исходным сортом ячменя Igrі при культивировании в условиях экспериментального поля ВИР.

Материал

Интрогрессивные линии ячменя *Hordeum vulgare* L. получены на основе триплоидного межвидового гибрида *H. vulgare* Igrі (2n=2x=14) × *H. bulbosum* A17 (2n=4x=28). Родительский сорт ячменя опыляли частично фертильной пылью этого гибрида. С использованием метода *in situ* гибридизации в ВС1 отбирали растения, несущие хромосомы с интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного. В последующих поколениях от самоопыления двух растений ВС1 отбирали формы с соответствующими интрогрессиями в обоих гомологах. На рисунке 1 представлена схема получения интрогрессивных линий.

Полученные таким образом линии озимого ячменя с терминальными интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного в различных плечах хромосом: 12.46 – 1НL, 12.47 – 2НL, 12.52 – 3НL, 11.103.013 – 7НL, 14.10 – 2НS, 15.1. b3 – 1НL + 5НL, и с субтерминальной интрогрессией: 12.42 – 5НL (Рис. 2, б-з) служили объектом исследования в работе.

Методы

Анализ сохранения интрогрессий при репродукции линий без изоляции. В первой репродукции семян линий, полученных в полевых условиях, изучали сохранение интрогрессий генетического материала *H. bulbosum* с использованием метода *in situ* гибридизации. Для этого отбирали по 20 зерен из полевой репродукции 2015 года линий 12.46, 12.47, 12.42, 12.52, 11.103.013 и по 10 зерен из полевой репродукции 2017 линий 15.1. b3 и 14.10

Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH, GISH). Для цитогенетического анализа корешки проростков помещали в воду со льдом (0°C) на сутки, затем в фиксатор 3:1 (96%-й этанол: ледяная уксусная кислоты), фиксации хранили в морозильнике (-20°C) до их использования. Подготовку препаратов, мечение ДНК, флюоресцентную *in situ* гибридизацию проводили по стандартной методике (Leitch et al., 1994) с ранее описанными модификациями (Scholz et al., 2009; Scholz et al., 2017). Геномную ДНК *H. bulbosum* и плазмидную ДНК, несущую 18S/25S рДНК (зонд Ver17) (Yakura, Tanifuji, 1983) метили Nick –трансферазой, 5S рДНК метили методом ПЦР ДНК *H. vulgare* сорта Igrі с использованием праймеров согласно Gottlob-McHugh с соавторами (Gottlob-McHugh et al., 1990). Для идентификации интрогрессий использовали флюоресцентную *in situ* гибридизацию с дифференциально мечеными геномной ДНК *H. bulbosum* (DIG) и ДНК хромосомспецифичных маркеров культурного ячменя: 5S rDNA

(BIO) – локализован в 2HL, 3HL, 4HS, 7SH; 18S/25S rDNA (BIO, DIG) – локализован в 1HS, 5HS, 6HS (рис. 2а). Для анализа препаратов, создания и обработки изображений использовали эпифлюоресцентные микроскопы Nikon 90i

с камерой DS-Qi1 и AxioImager M2 с камерой Axio-CamMRm и программное обеспечение AxioVision Rel 4.8, и Adobe Photoshop 6.0.

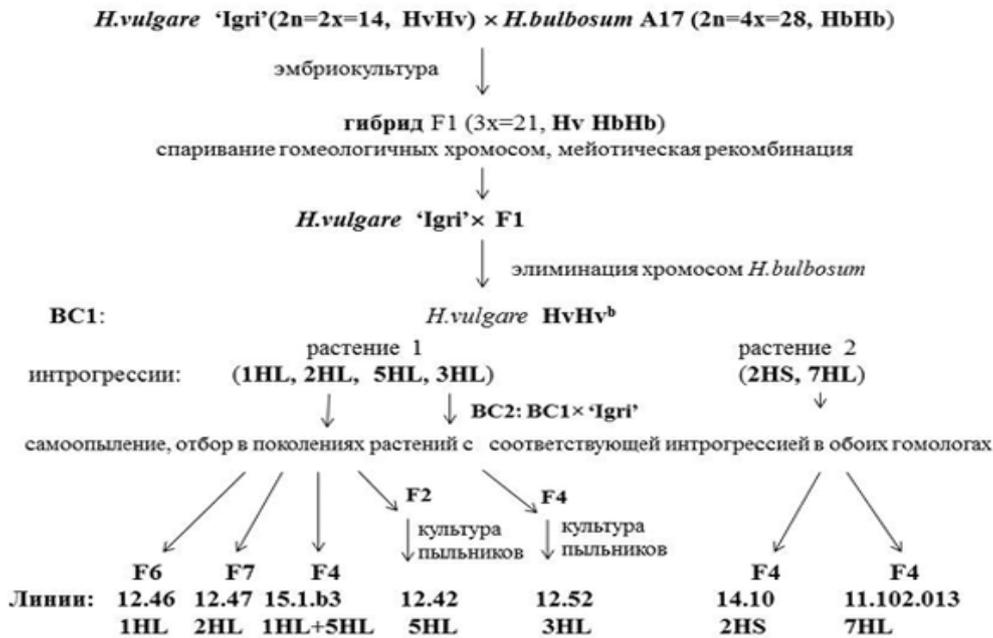


Рис. 1. Схема создания интрогрессивных линий *H. vulgare* на основе межвидового гибрида *H. vulgare* сорт Igrī (2x) × *H. bulbosum* (4x)

Fig. 1. The scheme of *H. vulgare* introgressive lines synthesis on the base of the interspecific hybrid *H. vulgare* cv Igrī (2x) × *H. bulbosum* (4x)

Анализ зимостойкости. Зимостойкость линий определяли в полевом эксперименте в течение 3-х лет (2014, 2015, 2016). Семена ячменя сорта Igrī и полученных на его основе интрогрессивных линий высевали под зиму в середине сентября на экспериментальном поле ВИР в г. Пушкин. Посев линий 12.46, 12.47, 12.42, 12.52, 11.103.013 и исходного сорта Igrī 2015 и 2016 проводили в 1 повторности (по 20 и по 40 зерен каждой линии в 2015 и 2017 г. соответственно), в 2017 – в двух повторностях (по 60 зерен в каждой повторности). Кроме того, в 2017 году были высеяны линии 15.1.b3 (по 60 зерен в двух повторностях) 14.10. (по 60 зерен в 1 повторности). Учет количества растений перед уходом под зиму проводили в конце октября. Учет количества перезимовавших растений проводили в начале мая. Перезимовавшими считали растения, у которых наблюдали формирование новых листьев. Зимостойкость линий определяли, вычисляя процент растений, выживших после перезимовки, от числа растений, ушедших под зиму.

Определение озерненности колоса. После созревания в посеве отбирали стебли растений с главным колосом (не менее чем у 10 растений на образец). Учитывали число цветков и число завязавшихся зерновок в главном колосе растений в эксперименте 2017 г. Озерненность линий определяли, как процент завязавшихся зерновок в колосе

от общего числа цветков в колосе. Рассчитывали процент озерненности в среднем на колос и ошибку среднего.

Определение массы зерна с главного колоса и массы 1000 зерен. В образцах зерна линий урожая 2015 и 2017 годов у каждого отобранного побега учитывали массу зерна с главного колоса. Среднюю массу 1000 зерен определяли по результатам взвешивания 5 отобранных проб по 200 зерен из образца. Результат каждого взвешивания умножали на 5, затем находили среднее значение и рассчитывали ошибку среднего. Для определения массы использовали весы L610D Sartorius.

Определение высоты растения. Высоту растения определяли, измеряя длину стебля с главным колосом (с учетом длины главного колоса без остей) не менее чем у 10 растений. Линейные измерения проводили, используя линейку ГОСТ 427-75.

Анализ качества зерна. В связи с тем, что для экспериментов имелось небольшое количество зерен, которое необходимо было сохранить для следующего посева, показатели качества зерна определяли неразрушающим методом контроля – спектроскопией в ближней инфракрасной области, используя БИК анализатор Инфралюм ФТ-10. Спектры снимали, помещая в кювету анализатора пробу целого неразрушенного зерна объемом 45 – 50 мл, что составляло 400 – 450 зерен на образец. Полученный

спектр автоматически, в программе InfralumPro сравнивался с калибровочной базой данных, созданной на основе спектров стандартных референтных образцов с определением показателей по ГОСТ. Были определены следующие показатели качества зерна: содержание белка, содержание крахмала, пленчатость в % от общей массы зерна.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 12. Для изучаемых показателей определяли среднюю арифметическую и ошибку средней. Для сравнения средних использовали критерий t Стьюдента.

Результаты

Сохранение интрогрессий при воспроизведении линий в полевых условиях. Изучаемые линии имеют интрогрессии генетического материала в обоих гомологах различных хромосом (рис. 2, б–з). Одной из задач работы было изучение сохранения интрогрессий генетического материала *H. bulbosum* при выращивании в полевых условиях без изоляции колоса.

Было установлено, что для растений изучаемых линий характерно, как и для родительского сорта, закрытое цветение. Созревание пыльцы и растрескивание пыльника в главном колосе происходит, как и у родительского вида, в закрытом цветке, когда колос только начинает выходить из трубки. Анализ кариотипов растений из случайно выбранных зерен полевой репродукции 2015 года для линий 12.46 (1HL), 12.47 (2HL), 12.42 (3HL), 11.103.013 (7HL), 12.52 (5HL) не выявил форм, отличных от исходного материала: все изученные растения имели соответствующие интрогрессии генетического материала *H. bulbosum* в обоих гомологах. Линии 14.10 (2HS), и 15.1.b3 (1HL + 5HL) были созданы и включены в эксперимент позднее, поэтому высеяны в поле только 2017. Анализ кариотипов случайно отобранных семян (по 10 на линию) также не выявил форм, отличных от исходного материала. Таким образом, при полевой репродукции изучаемые интрогрессивные линии *H. vulgare* сохраняют чужеродные фрагменты хромосом *H. bulbosum*.

Зимостойкость. Анализ результатов перезимовки изучаемых интрогрессивных линий в полевых условиях, показал, что процент перезимовавших растений у линий в эксперименте 2014–2015 и 2016–2017 года не ниже исходного сорта Igrі (табл. 1). В условиях зимы 2015–2016 годов все растения сорта Igrі и изучаемых линий погибли, за исключением одного растения линии 42.12 (5HL).

Показатели урожайности. Одной из характеристик, связанных с урожайностью, является озерненность колоса. По числу цветков в колосе линии 12.47(2HL), 12.52(3HL), 12.42(5HL), 15.1.b3(1HL + 5HL), 14.10(2HS) соответствуют ячменю сорта Igrі. Линия 11.102.013 (7HL) достоверно превышает по этой характеристике исходный сорт ($t=5,51$, при $df=64$ $p=0,00001$), а у линии 12.46 (1HL) этот показатель достоверно ниже, чем у исходного сорта ($t=4,56$ при $df=69$ $p<0,00001$) (табл. 2.). По озерненности колоса 6 из 7 изученных линий соответствуют исходному сорту ячменя. Для них характерна озерненность более 90%. У линии 14.10 с интрогрессией в коротком плече

хромосомы 2Н этот показатель ниже, чем у ячменя сорта Igrі. Число зерен в колосе у этой линии достоверно ниже, чем у исходного сорта ($t=2,770$, при $df=51$ $p=0,00779$), при этом число цветков в колосе не отличается достоверно от сорта Igrі ($t=1,124$ при $df=51$ $p=0,266$).

Важными характеристиками, отражающими продуктивность растений, являются показатели масса зерна с колоса и масса 1000 зерен. В таблице 3 приведены средние значения этих показателей, учитывая данные 2015 и 2017 годов для 5 из 7 изученных линий и исходного сорта ячменя. Линии 15.1.b3 и 14.10 высевались только в 2017 году, потому для них приведены данные за 2017. Масса зерна с колоса у линий 12.47 (2HL), 12.52 (3HL), 12.42 (5HL), 15.1.b3 (1HL + 5HL) с числом зерен в колосе, соответствующим исходному сорту, в среднем, несколько ниже, чем у сорта Igrі (табл. 3). По массе зерна с колоса линия 11.102.013 (7HL) превышает исходный сорт, что, вероятно, определяется большим числом зерен, формируемых в колосе, по массе же 1000 зерен эта линия близка к исходному сорту. В среднем, значение массы 1000 зерен (усредненные данные 2015 и двух повторностей 2017 года) для всех линий несколько ниже, чем у сорта Igrі (табл. 3). Наименьшие значения изучаемых показателей продуктивности отмечено для линии 14.10 (2HS). Масса 1000 зерен этой линии достоверно ниже, чем у сорта Igrі в соответствующей повторности опыта ($t=11,616$, при $df=8$ $p=0,00003$), масса зерна с колоса также достоверно ниже, чем у исходного сорта ячменя в соответствующей повторности ($t=5,246$, при $df=10$ $p=0,00037$). Таким образом, у линии 14.10 показатели, определяющие продуктивность: число зерен в колосе, массе зерна с колоса и масса 1000 зерен ниже, чем у исходного сорта ячменя.

Высота растений. Высоту растений определяли по длине стебля с главным колосом (с учетом длины главного колоса без остей). Результаты анализа растений эксперимента 2015 года и двух повторностей 2017 года приведены на рисунке 3.

Как видно на диаграмме, для исходного сорта ячменя Igrі характерно невысокое варьирование высоты растения в зависимости от года выращивания: от 79,1 до 72,2 см. Для линии 11.102.013 (7HL) отмечены сходные пределы варьирования этого показателя: от 81,60 до 72,80 см. Для линий 12.47, 12.52, 12.42 отмечено большее варьирование этого признака, что, возможно, связано с чувствительностью этих линий к условиям произрастания. Линии 11.102.013, 15.1.b3 и 14.10 по длине стебля с главным колосом соответствуют сорту Igrі.

Показатели качества зерна. Результаты анализа приведены в таблице 4. Как показали результаты, наименее вариабельным является содержание крахмала в зерне: от 63,5 % у сорта Igrі до 64,5 % - у линии 11.102.013. По показателю содержания белка линии 12.46, 12.47, 12.52, 12.42, 15.1.b3 близки к исходного сорта ячменя Igrі (16,1 %). Для линии 11.102.013 отмечено более низкое, чем у сорта Igrі, содержание белка: 12,8. У линии 2HS выявлено самое высокое содержание белка в зерне: 18,7%.

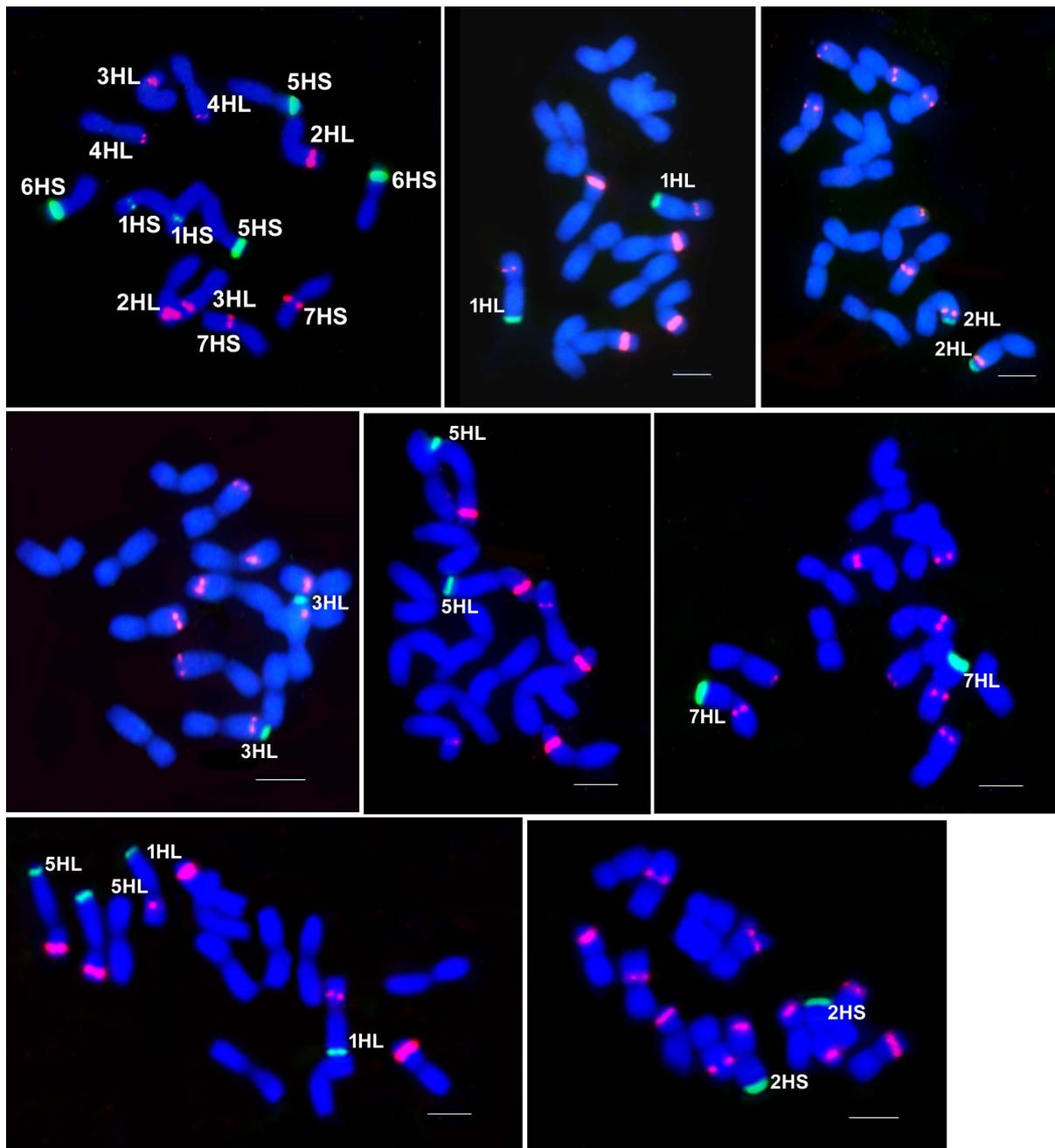


Рис. 2. Локализация генетического материала *H. bulbosum* в хромосомах интрогрессивных линий *H. vulgare*

а - локализация хромосомных маркеров 5S (BIO – красная метка) и 18S/25S (DIG – зеленая метка) на хромосомах ячменя сорта Igri; б - з – карно-
 типы линий с интрогрессиями генетического материала *H. bulbosum* (DIG – зеленая метка): б – 12.46 (1HL), в – 12.47 (2HL); г – 12.42 (3HL);
 д – 12.52 (5HL), е – 11.103.013 (7HL); ж – 15.1.b3 (1HL+5HL), з – 14.10 (2HS); для идентификации рекомбинантной хромосомы использованы хромо-
 сомные маркеры 18S/25S (б, д, ж) (BIO – красная метка) и хромосомный маркер 5S (в, г, е, з) (BIO – красная метка)

Fig. 2. Localization of *H. bulbosum* the genetic material in the chromosomes of the introgressive lines of *H. vulgare*

a-localization of chromosome markers 5S (BIO - red) and 18S / 25S (DIG - green) on chromosomes of barley Igri; b - h - karyotypes of lines with introgressions of genetic material *H. bulbosum* (DIG - green): b – 12.46 (1HL), c – 12.47 (2HL); d – 12.42 (3HL); e – 12.52 (5HL), f – 11.103.013 (7HL); g – 15.1.b3 (1HL + 5HL), h – 14.10 (2HS); for identification of recombinant chromosomes the next markers were used: 18S/ 5S (b, e, g) and c, d, f, h 5S (c, d, f, h) (BIO - red)

Таблица 1. Результаты перезимовки интрогрессивных линий в полевых условиях, Пушкин.
Table 1. Winter survival of introgressive lines in field conditions, Pushkin.

Линия	Рекомбинантная хромосома	Год	Высеяно зерен	Количество растений			
				Проросло		Перезимовало	
				Число	%	Число	%
Igri	-	2014-2015	60	57	95,0	16	28,1 ± 6,0*
- « -	-	2015-2016	40	36	90,0	0	0
- « -	-	2016-2017	120	101	84,2	39	38,6 ± 4,8
12.46	1HL	2014-2015	20	18	90,0	11	61,1 ± 11,5
- « -	1HL	2015-2016	40	35	87,5	0	0
- « -	1HL	2016-2017	120	107	89,2	47	43,9 ± 4,8
12.47	2HL	2014-2015	20	17	85,0	11	64,7 ± 18,1
- « -	2HL	2015-2016	40	32	80,0	0	0
- « -	2HL	2016-2017	120	67	55,5	40	59,7 ± 8,7
12.52	3HL	2014-2015	20	20	100	5	25,0 ± 9,7
- « -	3HL	2015-2016	40	35	87,5	0	0
- « -	3HL	2016-2017	120	99	82,5	46	46,5 ± 5,0
12.42	5HL	2014-2015	20	19	95,0	8	42,1 ± 11,3
- « -	5HL	2015-2016	40	37	92,5	1	2,7 ± 2,7
- « -	5HL	2016-2017	120	115	95,8	37	32,1 ± 4,4
11.102.013	7HL	2014-2015	20	20	100,0	13	65,0 ± 10,7
- « -	7HL	2015-2016	40	38	95,0	0	0
- « -	7HL	2016-2017	120	112	93,33	48	42,9 ± 4,8
14.10	2HS	2016-2017	40	36	90,0	12	33,3 ± 7,9
15.1.b3	1HL+5HL	2016-2017	141	134	95,0	33	24,6 ± 3,7

* - приведены значения процента перезимовки и ошибка процента

Таблица 2. Характеристика озерненности колоса интрогрессивных линий, Пушкин, 2017 г.
Table 2. Characteristic of the spike graininess of introgressive lines, Pushkin, 2017.

Линия	Рекомбинантная хромосома	Число растений	Число цветков в колосе	Число зерен в колосе	Озерненность колоса, %
Igri	-	47	22,7 ± 0,3*	21,3 ± 0,3*	93,8 ± 3,5*
12.46	1HL	24	18,9 ± 0,7	18,0 ± 0,8	95,3 ± 4,3
12.47	2HL	30	23,2 ± 0,4	21,3 ± 0,5	91,8 ± 5,0
12.52	3HL	21	22,3 ± 0,4	21,5 ± 0,6	96,4 ± 4,1
12.42	5HL	25	23,5 ± 0,5	22,5 ± 0,6	95,7 ± 4,1
11.102.013	7HL	19	27,3 ± 1,0	25,5 ± 1,1	93,4 ± 5,7
15.1.b3	1HL + 5HL	44	23,8 ± 0,3	22,9 ± 0,4	96,2 ± 2,9
14.10	2HS	15	23,8 ± 1,4	18,2 ± 1,8	76,5 ± 10,9

* - приведены значения процента озерненности в среднем на колос и ошибка среднего

Показатель пленчатости зерна близок по значению у всех изучаемых форм и варьирует от 7,12% у линии 15.1.b3 с двумя рекомбинантными хромосомами до 7,99% у сорта Igri. Таким образом, наличие интрогрессий у изу-

чаемых линий не влияет на важную характеристику качества ячменя – пленчатость зерна. По показателю пленчатости линий и исходного сорта Igri их зерно можно охарактеризовать как среднепленчатое, ближе к тонкопленчатому (Sumina et al., 2013).

Таблица 3. Характеристика интрогрессивных линий по массе зерна с колоса и массе 1000 зерен, Пушкин, 2015, 2017 г.
Table 3. Characteristic of introgressive lines to the features of the mass of grain from the spike and the mass of 1000 grains, Pushkin, 2015, 2017.

Линия	Рекомбинантная хромосома	Масса зерна с колоса, г.	Масса 1000 зерен, г.
Igri(2x)	-	1,39 ± 0,08 (1,23 - 1,54)*	64,7 ± 4,0 (54,8 - 67,4)*
12.46	1HL	1,07 ± 0,18 (0,89 - 1,25)	58,2 ± 2,2 (56,9 - 60,7)
12.47	2HL	1,17 ± 0,11 (1,05 - 1,21)	53,2 ± 6,0 (46,8 - 58,6)
12.52	3HL	1,13 ± 0,044 (1,08 - 1,22)	57,8 ± 1,606 (55,3 - 60,8)
12.42	5HL	1,26 ± 0,04 (1,19 - 1,33)	54,6 ± 2,3 (50,3 - 58,1)
11.102.013	7HL	1,52 ± 0,100 (1,39 - 1,72)	61,4 ± 2,8 (55,7 - 64,3)
15.1.b3	1HL + 5HL	1,29 ± 0,03 (1,27; 1,32)	59,1 ± 0,6 (59,6; 58,4)
14.10	2HS	0,95 ± 0,09	48,3 ± 0,5

* -- приведены средние значения и ошибка среднего, включая данные 2015 и 2017 годов

* - варьирование средних значений в разные годы, включая данные 2015 и двух повторностей 2017г.

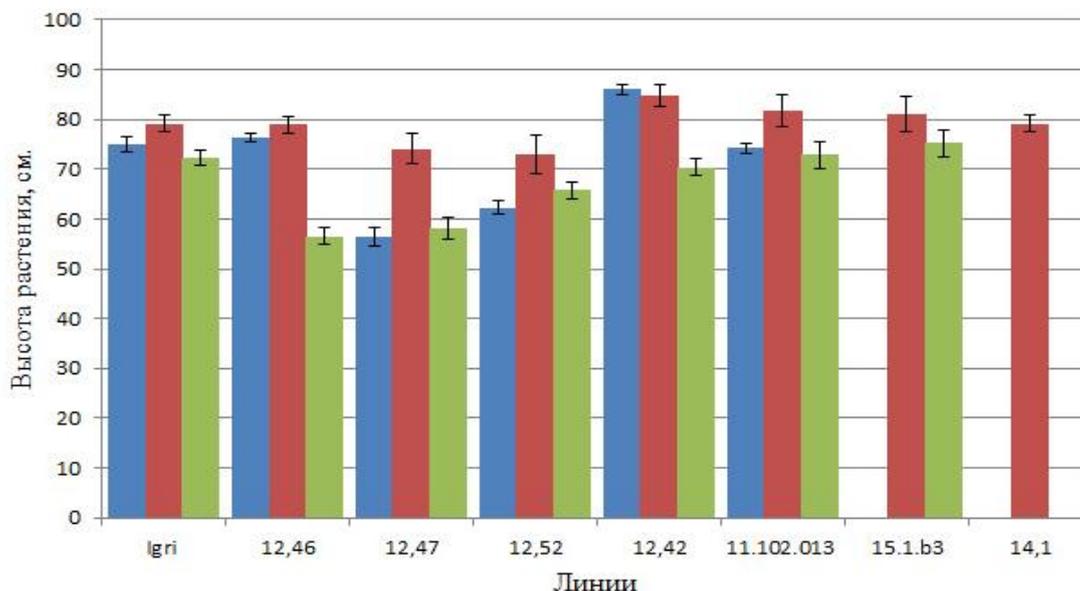


Рис. 3. Высота растений интрогрессивных линий: голубой – результаты 2015 года; красный и зеленый – результаты двух повторностей 2017.

Планка погрешностей отражает ошибку среднего значения.

Fig. 3. The plant height of introgression lines: blue – the results of 2015, red and green – the results of two replications 2017.

Error bars indicates a standart error.

Обсуждение

В нашем исследовании были изучены 7 интрогрессивных линий, полученных на основе гибрида *H. vulgare* Igri

(2x) × *H. bulbosum* A17(4x), для которого характерна высокая частота гомеологичного спаривания хромосом: число тривалентов, включающих хромосомы обоих родительских геномов, варьировало от 0 до 4, составляя 0,74 в

среднем на клетку. Мейотическая гомеологичная рекомбинация обеспечивает интрогрессию генетического материала *H. bulbosum* в хромосомы культурного ячменя. Быстрое получение рекомбинантных форм *H. vulgare* с интрогрессиями ячменя луковичного на основе триплоидных гибридов с геномным составом Н^vН^bН^b связано с особенностями взаимодействия геномов этих видов в гибридах, приводящее к элиминации хромосом *H. bulbosum*, которая зависит от ряда факторов, в том числе – от генотипа родительских форм (Pickering, 1984). Ранее нами показано, что при соотношении геномов 1 : 1 при скрещивании тетраплоидной формы ячменя сорта Igrі(4x) с *H. bulbosum* A17(4x) в гибридном геноме на ранних этапах эмбриогенеза (до 10 суток после опыления) происходит элиминация хромосом луковичного ячменя (Pendinen et al., 2013). Триплоидные гибриды, имеющие стабильную геномную

структуру Н^vН^bН^b стерильны, получение потомства этих форм проблематично, необходимо использование специальных приемов, стимулирующих образование нередуцированных гамет, обладающих сбалансированным числом хромосом. В результате опыления культурного ячменя пыльцой триплоидного гибрида, обработанного колхицином, были получены растения ВС₁, представляющие собой диплоидный *H. vulgare* (2n=2x=14) с интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного. Таким образом, мейотическая рекомбинация и последующая элиминация хромосом *H. bulbosum* при получении растений ВС₁ обуславливают быстрое получение фертильных форм ячменя с рекомбинантными хромосомами. При дальнейшем отборе растений *H. vulgare* с интрогрессиями генетического материала ячменя луковичного в обоих гомологах созданы фертильные интрогрессивные линии.

Таблица 4. Показатели качества зерна интрогрессивных линий, выращенных в полевых условиях, Пушкин, 2017.

Table 4. Grain quality of introgressive lines cultivated in field conditions, Pushkin, 2017.

№	Линия	Рекомбинант-ная хромосома	Содержание белка, %	Содержание крахмала, %	Пленчатость зерна, %
1	Igrі	-	16,1 ± 1,01*	63,5 ± 0,09*	7,99 ± 0,044*
2	12.46	1HL	16,4 ± 0,14	63,6 ± 0,12	7,65 ± 0,156
3	12.47	2HL	15,7 ± 0,61	64,1 ± 0,12	7,54 ± 0,257
4	12.52	3HL	14,6 ± 0,44	63,7 ± 0,35	7,59 ± 0,396
5	12.42	5HL	15,9 ± 0,08	63,7 ± 0,21	7,61 ± 0,108
6	11.102.013	7HL	12,8 ± 0,97	64,5 ± 0,22	7,44 ± 0,148
7	15.1.b3	1HL + 5HL	15,5 ± 0,44	64,2 ± 0,26	7,12 ± 0,099
8	14.10	2HS	18,7 ± 0,39	63,9 ± 0,21	7,26 ± 0,016

* - среднее значение оцениваемого показателя и ошибка среднего

Изучение в полевых условиях линий ячменя с терминальными интрогрессиями в различных хромосомах: 12.46 (1HL), 12.47 (2HL), 12.52 (3HL), 11.103.013 (7HL), 14.10 (2HS), 15.1.b3 (1HL + 5HL), и с субтерминальной интрогрессией: 12.42 (5HL) показало, что эти формы близки по изучаемым показателям к исходному сорту ячменя Igrі. Важной характеристикой линий является закрытое цветение и самоопыление, что дает возможность поддерживать и размножать линии в полевых условиях, сохраняя интрогрессии, без изоляции колоса. Показатели зимостойкости линий не ниже, чем у исходного сорта. Однако, выживание растений при перезимовке зависит от погодных условий конкретного года. Так, в 2015–2016 году все изучаемые формы и сходный сорт Igrі, погибли при перезимовке. Поэтому на основе озимых линий начато создание яровых интрогрессивных форм путем вовлечения в скрещивания сортов ярового ячменя. Для отбора яровых растений с интрогрессией в обоих гомологах используется метод *in situ* гибридизации для строгих рекомбинантных хромосом. По характеристикам, определяющим урожайность, таким как озерненность колоса, масса зерна с колоса и масса 1000 зерен 6 из 7 изученных линий, в общем, близки к исходному сорту Igrі. Для линии 14.10 харак-

терно значительное снижение этих показателей в сравнении с исходным сортом и другими линиями, что, вероятно, связано с наличием интрогрессии в коротком плече хромосомы 2Н. Следует отметить, что эта линия также выделяется более высоким содержанием белка в зерне, чем у остальных линий и исходного сорта.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что интрогрессия генетического материала ячменя луковичного в 2HS хромосоме вызывает изменения некоторых характеристик ячменя сорта Igrі у линии 14.10. Для линии 11.102.013 с интрогрессией в хромосоме 7HL, отмечено снижение содержания белка в зерне в сравнении с исходным сортом.

В настоящее время продолжается изучение полученных линий. Так, начато изучение устойчивости к воздействию солевого (NaCl) стресса. По предварительным данным, полученным в лабораторных условиях на проростках, линии 14.10, 11.102.013, 15.1.b3 выделяются по солеустойчивости на ранних стадиях развития. Таким образом, изучаемые интрогрессивные линии могут представлять интерес как источники хозяйственно значимых признаков. Фертильность линий и сохранение интрогрессий в полевых условиях при самоопылении дает возможность их размножения и дальнейшего изучения.

Заключение

Небольшие фрагменты хромосом *H. bulbosum*, интрогрессированные в терминальные участки хромосом 1НЛ линии 12.46, 2НЛ линии 12.47, 3НЛ линии 12.52, 1НЛ + 5НЛ линии 15.1. b3, 7НЛ линии 11.103.013, и в субтерминальный участок плеча 5НЛ линии 12.42, в целом, не изменяют значительно характеристику исходного сорта Igr1 по признакам фертильности, продуктивности и качества зерна. Наибольшие отличия от исходного сорта отмечены у линии 14.10 с интрогрессией генетического материала в терминальном участке короткого плеча хромосомы 2Н. Для этой линии характерна более низкая фертильность, масса зерна с колоса и масса 1000 зерен, однако содержание белка в зерне выше, чем у исходного сорта. Таким образом, интрогрессия генетического материала *H. bulbosum* в терминальный участок короткого плеча хромосомы 2Н вызывает изменения некоторых характеристик сорта Igr1 у линии 14.10.

Изученные линии представляют собой высокофертильные формы ячменя, для которых характерно закрытое цветение и самоопыление, что обеспечивает сохранение интрогрессированных чужеродных фрагментов хромосом в последующих поколениях.

Благодарности: работа выполнена по госзаданию № 0662-2018-0007 и в рамках двустороннего российско-германского сотрудничества (проект №145)

References/Literature

- Bothmer R, Seberg O, Jacobsen N (1992). Genetic resources in the *Triticeae*. *Hereditas* 116: 141-150.
- Furusko M (1995) Dreding of malting barley using the haploid method. *Japan Agric. Research Quarterly* 29: 9-15.
- Gottlob-McHugh S, Levesque M, MacKenzie K, Olson M, Yarosh O, Johnson D. (1990) Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5SrDNA repeat structure in higher plants. *Genome*. 33: 486-494.
- Ho KM, Jones E. (1980) Mingo Barley. *Can. J. Plant Science*. 60 (1): 279-280.
- Jones IT, Pickering RA (1978) The mildew resistance of *Hordeum bulbosum* and its transference into *H. vulgare* genotypes/ *Ann. Appl. Biology*. 88: 295-298.
- Jonson PA., Pickering RA (2002) PCR detection of *Hordeum bulbosum* introgression in a *H. vulgare* background using a retrotransposon-like sequence. *Theor. and Appl. Genetics* 104: -726.
- Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ. (1994) *In situ* hybridization: a practical guide. Royal Microscopical Society: Microscopy Handbooks. 27. BIOS Scientific Publishers, Oxford
- Michel M (1996) Untersuchungen zur Übertragung von Resistenzgenen aus der Wildart *Hordeum bulbosum* L. in die Kulturgerste *Hordeum vulgare* L. PhD Thesis, Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Technische Universität München. 117 p.
- Pickering RA (1988) The production of fertile triploid hybrids between *Hordeum vulgare* L. (2n=2x=14) and *H. bulbosum* L. (2n=4x=28). *Barley Genetics Newsletter*. 18:25-29.
- Pendinen GI, Scholz M, Schrader O, A. Habekuß A (2013) Using of bulbous barley *Hordeum bulbosum* L. for widening of genetic diversity of *Hordeum vulgare* L. Proseeding on Applied Botany. *Genetics and Breeding*. 171: 123-126 [in Russian] (Пендинен Г.И., Шольц М., Шрадер О., Хабекус А. Использование ячменя луковичного *Hordeum bulbosum* L. для расширения генетического разнообразия *Hordeum vulgare* L. // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2013. Т. 171. С. 123-126.
- Pickering RA (1992) Monosomic and double monosomic substitutions of *Hordeum bulbosum* L. chromosomes into *H. vulgare* L. *Theor. and Appl. Genetics*. 84: 466-472.
- Pickering R (1984) The influence of genotype and environment on chromosome elimination in crosses between *Hordeum vulgare* L., *Hordeum bulbosum* L. *Plant Sci Lett* 34: 153-164.
- Pickering RA, Klatt S, Butler RC (2006) Identification of all chromosome arms and their involvement in meiotic homoeologous associations at metaphase I in 2 *Hordeum vulgare* L. *Hordeum bulbosum* L. hybrids. *Genome*. 49: 73-78.
- Pickering RA, Hudakova S, Houben A, Johnson P., Butler RC (2004) Reduced metaphase I associations between the short arms of homoeologous chromosomes in a *Hordeum vulgare* L. x *H. bulbosum* L. diploid hybrid influences the frequency of recombinant progeny/ *Theor. Appl. Genet.* 109: 911-916.
- Pickering RA, Timmerman GM, Cromey MG, Melz G (1994) Characterisation of progeny from backcrosses of triploid hybrids between *Hordeum vulgare* L.(2x) and *H. bulbosum* L.(4x) to *H. vulgare*. *Theor. and Appl. Genet.* 88: 460-464.
- Pickering RA, Malyshev S, Kunzel G, Johnson PA, Korzun V, Menke M, Schubert I (2000) Locating introgressions of *Hordeum bulbosum* chromatin within the *H. vulgare* genome 100: 27-31.
- Pickering R, Ruge-Wehling B, Johnston PA, Schweizer G, Wehling P (2006) The transfer of a gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) from *Hordeum bulbosum* into *H. vulgare* chromosome 4HS // *Plant Breeding*. 125: 576-579.
- Ruge B, Linz A., Pickering R, Proeseler G, Greif P, Wehling P (2003) Mapping of *Rym14Hb*, a gene introgressed from *Hordeum bulbosum* and conferring resistance to BaMMV and BaYMV in barley *Theor. and Appl. Genet.* 107: 965-971.
- Ruge-Wehling B, Linz A, Habekuß A, Wehling P. (2006) Mapping of *Rym16Hb*, the second soil-born virus-resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* *Theor Appl Genet.* 113: 867-873
- Scholz M, Ruge-Wehling B, Habekuß A, Schrader O, Pendinen G, Fischer K, Wehling P (2009) *Ryd4Hb*: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus// *Theor. and Appl. Genet.* 119: 837-849
- Scholz M, Pendinen G. (2017) The Effect of Homoeologous Meiotic Pairing in Tetraploid *Hordeum bulbosum* L. x *H. vulgare* L. Hybrids on Alien Introgressions in Offspring // *Cytogenet Genome Research* 150 (2): 139-149 DOI: 10.1159/000455141
- Shitaya M, Sillero JC, Flath K, Pickering R, Rubeales D (2007) The resistance to leaf rust and powdery mildew of recombinant lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) derived from *H. vulgare* x *H. bulbosum* crosses. *Plant Breeding*. 126: 259-267.
- Sumina AV, Polonskiy VI (2013) The influence of cultivation conditions and genotype on scariob characteristic indicator of siberian selection barley grain. *Vestnik Kras GAU* 8: 80-84 [in Russian] Сумина А.В., Полонский В.И. Влияние условий выращивания и генотипа на показатель пленчатости зерна ячменя сибирской селекции // *Вестник Крас ГАУ*. 2013. № 8. С. 80-84.
- Szigat G, Szigat G (1991) Amphidiploid hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* – basis for the development of new initial material for winter barley breeding// *Vortr. Pflanzenzüchtg* 20: 34-39.
- Yakura K, Tanifuji S (1983) Molecular cloning and restriction analysis of *Eco* RI-fragments of *Vicia faba* rDNA// *Plant Cell Physiol*. 24: 1327-1330.
- Zhang L, Pickering R, Murray. (1999) Direct measurement of recombination frequency in interspecific hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum*, using genomic in situ hybridization. *Heredity*. 83: 304-309

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД В СОЗДАНИИ УСТОЙЧИВЫХ К ПАРШЕ ФОРМ ЯБЛОНИ: ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ И МАРКЕР-ОПОСРЕДОВАННЫЙ ОТБОР

Супрун И.И., Насонов А.И., Лободина Е.В., Володина Е.А.

Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия
350901, Россия, Краснодарский край, г. Краснодар,
ул. им. 40 – летия Победы, 39
e-mail: supruni@mail.ru

AN INTEGRATED APPROACH TO CREATING SCAB-RESISTANT APPLE: PHYTOPATHOLOGICAL TESTING AND MARKER-ASSISTED SELECTION

Suprun I. I., Nasonov A. I., Lobodina E. V., Volodina E. A.

North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making
e-mail: supruni@mail.ru

Создание высокоустойчивых к парше генотипов яблони повышает рентабельность и экологичность производства основной плодовой продукции. Использование ранней оценки устойчивости получаемых гибридов с помощью фитопатологического тестирования и ДНК-маркеров позволяет ускорить этот процесс. Цель исследования состояла в комплексной оценке устойчивости к возбудителю парши гибридного потомства яблони, полученного от скрещивания восприимчивого (Ренет Смиренко) и устойчивого (Моди – донор гена *Rvi6*) сортов, с использованием естественного инфекционного фона и молекулярного маркирования целевого гена устойчивости. Фитопатологический анализ 207 гибридных сеянцев яблони на естественном фоне выявил 117 (56%) растений без поражений паршой (0 баллов). Оставшиеся сеянцы имели поражения разной степени. ДНК-маркерный анализ по гену *Rvi6* позволил идентифицировать 105 растений (51%) с генотипом *Rvi6rvi6* и 102 (49%) – *rvi6rvi6*, что близко к теоретическому расщеплению 1 : 1, получаемому при скрещивании такого типа. Сопоставление результатов инфекционной оценки и ДНК-маркирования показало 98% совпадений данных о наличии гена устойчивости с отсутствием поражений. В целом комплексное использование методов фенотипической и молекулярной оценки гибридной семьи на устойчивость к *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter показывает высокую степень совпадения результатов. Однако несовпадение качественных классов реакций на инфицирование с результатами молекулярно-генетического анализа указывает на недостаточную силу естественного инфекционного фона года исследования. Низкая интенсивность развития заболевания была обусловлена неблагоприятными погодноклиматическими условиями начала вегетационного периода и становления инфекции, выразившимися в более высокой по сравнению с нормой среднемесячной температурой и небольшим количеством осадков. Полученные нами результаты говорят о преимуществе комплексной оценки устойчивости к возбудителю парши с использованием инфекционного фона и молекулярного маркирования гена *Rvi6*, при котором на первом этапе проводится отбор устойчивых образцов на естественном инфекционном фоне с последующим подтверждением наличия искомого гена с помощью ДНК-маркерного анализа.

Ключевые слова: *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, устойчивость, *Vf* (*Rvi6*), естественный инфекционный фон, маркер-опосредованный отбор

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.
Конфликт интересов отсутствует

Супрун И.И., Насонов А.И., Лободина Е.В., Володина Е.А. Комплексный подход в создании устойчивых к парше форм яблони: фитопатологическое тестирование и маркер-опосредованный отбор. Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):25-33. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-25-33

Suprun I. I., Nasonov A. I., Lobodina E. V., Volodina E. A. An integrated approach to creating scab-resistant apple: phytopathological testing and marker-assisted selection. Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):25-33. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-25-33

The creation of highly scab-resistant apple genotypes increases the profitability and environmental friendliness of the production of this fruit crop. Early stage evaluation of the resistance using phytopathological testing and DNA markers allows to accelerate the process of breeding for this trait allows the use. The purpose of the study was to comprehensively assess resistance to the causative agent of scab of hybrid seedlings of apple obtained from crossing susceptible (Rennet Simirenko) and resistant (Modi) cultivars for the *Rvi6* gene, using infectious background and marker assisted selection. A phytopathological analysis of 207 hybrid apple seedlings against the natural background of apple scab pathogen revealed 117 (56%) plants without scab lesions (0 points). The remaining seedlings had lesions of varying degrees. DNA marker analysis of the *Rvi6* gene allowed identification of 105 plants (51%) with the *Rvi6rvi6* genotype and 102 (49%) – *rvi6rvi6*, which is close to a theoretical segregation ratio 1:1 in the crosses of this type. Comparison of the results of infectious evaluation and DNA-marker analysis showed 98% coincidence of the presence of the resistance gene with no lesions. In general, the complex use of the phenotypic and molecular markers evaluation of the hybrid family for resistance to *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter shows a high degree of agreement between the results of the methods. However, the discrepancy between the qualitative classes of reactions to infection and the results of molecular genetic analysis indicates an insufficient strength of the natural infectious background of the study year. The low efficiency of the development of the disease was due to the unfavorable weather and climatic conditions at the beginning of the vegetative period and the formation of infection, which were expressed in a higher average monthly temperature and a small amount of precipitation compared to the norm. Our results suggest an advantage, a comprehensive assessment of resistance to the scab pathogen using an infectious background and marker-assisted selection for the *Vf* gene (*Rvi6*) in which the first stage involves the selection of resistant samples against a natural infectious background, followed by confirmation of the presence of the desired gene using a DNA marker analysis.

Key words: *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, resistance, *Rvi6* (*Rvi6*), natural scab inoculation, marker-assisted selection

УДК 632.4: 632.03: 631.52: 634.11
Поступила в редакцию 16.10.2018
Принята к публикации 26.11.2018

Введение

Потери, обусловленные эпифитотиями грибных фитопатогенов, являются одними из самых существенных в промышленном садоводстве Юга России. Лидирующее значение среди них занимает возбудитель парши яблони *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. Регион характеризуется благоприятными условиями для широкого распространения заболевания (Yakuba, 2013). Для безопасного и высокоэффективного контроля за развитием патогена, на современном этапе товарного производства плодов рациональным является использование комплексного подхода, включающего как химические и биологические средства защиты, так и создание устойчивых к возбудителю заболевания сортов (Sedov et al., 2013). Применение высокоустойчивых генотипов яблони позволяет минимизировать пестицидный прессинг на агрофитоценоз и улучшить качественные показатели плодов.

Во многих странах-производителях яблок, в том числе и России, рекордно широко используется в селекционной практике ген устойчивости *Rvi6*, интрогрессированный от клона *Malus × floribunda* 821. Этот ген определяет полный иммунитет к пяти расам (1–5) *V. inaequalis*. Такое интенсивное использование этой детерминанты устойчивости в селекции определяется ее эффективностью в течение достаточно продолжительного времени. От момента первого применения гена в 1944 году до сегодняшнего дня прошло уже 74 года (Kozlovskaya, 2004; Sedov et al., 2013). Первые сообщения о его преодолении патогеном в Европе появились в 1993–1994 годах, это были единичные сады Германии (Parisi et al., 1993) и Англии (Roberts, Crute, 1994). И хотя распространение новых рас парши 6 и 7 продолжается, пока что оно ограничивается только территорией Европы, кроме Франции, Нидерландов, Дании, Швейцарии (Parisi et al., 2006), а также включает некоторые восточно-европейские, такие как Чехия, Польша и Беларусь (Vavra, Bocek, 2010; Masny, 2017; Kozlovskaya, 2006; Kozlovskaya et al., 2009). В России эти расы не зарегистрированы.

Временные затраты для создания сортов с длительной устойчивостью к парше яблони затруднены прежде всего изменчивостью возбудителя и возможным появлением его новых вирулентных форм. Преодоление эффективных генов, как это было с геном *Rvi6*, заставляет селекционеров осуществлять поиск новых источников устойчивости или проводить пирамидирование нескольких генов в одном генотипе, которое позволяет получать образцы с длительной устойчивостью.

Накопление данных о взаимодействии патоген-хозяин, не всегда систематическое, привело к необходимости ревизии всех имеющихся на данный момент генов устойчивости яблони к парше и создания коллекции сортов-дифференциаторов. Такая работа была проведена международной группой исследователей (Bus et al., 2010), предложившей новую номенклатуру 17 генов устойчивости с указанием номера расы, к которой ген определяет невосприимчивость растения-хозяина.

Создание новых сортов яблони требует интенсификации процесса селекции. Методическим подходом, ускоряющим селекцию, является оценка устойчивости образцов к болезням на ранних этапах онтогенеза с помощью фитопатологического теста, и/или с использованием ДНК-маркерного анализа, уже ставших важным инструментом в работе селекционера (Kozlovskaya et al., 2009; Suprun et al., 2016). Выбровка зараженных растений в условиях искусственного фона делает возможным исключение до 90%, а в некоторых случаях и 100% восприимчивых генотипов. Успех фитопатологической оценки во многом определяется качественным используемым инокулюмом, который должен иметь достаточно разнообразный биотипный набор патогенного агента, характеризующий состав его популяций в регионе возделывания культуры, а также наличием благоприятных условий для протекания реакции инфицирования растений (Zhdanov, Sedov, 1991). Особо важна достоверность оценки устойчивости к парше на естественном инфекционном фоне из-за отсутствия возможности создания контролируемых условий, оптимальных для развития инфекции.

Для некоторых генов устойчивости яблони к парше, в том числе и для гена *Rvi6* были созданы различные ДНК-маркеры, которые могут быть эффективно использованы в селекции (Gessler et al., 2006). Молекулярное маркирование позволяет оценивать гибридные семьи сеянцев на устойчивость на самых начальных этапах развития растений, значительно сокращая сроки оценки этого важного селекционного признака. Однако согласно современным знаниям, на проявление устойчивости, определяемой геном *Rvi6*, оказывает влияние генное окружение (Gessler et al., 2006). Поэтому некоторая часть потомства, несущая этот ген, может проявлять различные качественные реакции устойчивости, в том числе с незначительным спорношением (Gessler et al., 2006). Необходимо отметить, что в зависимости от родительских форм, некоторые сеянцы, не несущие известных генов устойчивости, могут обладать невосприимчивостью к патогену в силу наличия других генетических детерминант устойчивости. Использование системного подхода для определения устойчивых к парше сеянцев яблони в гибридных семьях с применением, как фитопатологического теста, так и молекулярного маркирования, позволяет получить более полную информацию о характере их устойчивости. Кроме того, немаловажным фактором является экономическая составляющая ДНК-маркерного анализа. Очевидно, что в потомстве, полученном от скрещивания устойчивого к парше сорта с геном *Rvi6* в гетерозиготе (*Rvi6rvi6*) и восприимчивого (*rvi6rvi6*) сорта, 50% потомства будет восприимчиво к патогену, так как будет иметь генотип *rvi6rvi6*. В случае получения гибридных семей значительных объемов (более 500 сеянцев) применение на первом этапе работы фитопатологического тестирования может снизить затраты ресурсов и времени в два раза. В то же время недостаточная сила инфекционного фона может привести к ложной оценке образцов как устойчивых. Поэтому, для получения максимально достоверных данных необходимо

применение ДНК-маркерного анализа в целях подтверждения наличия гена устойчивости.

Цель исследования состояла в комплексной оценке устойчивости к возбудителю парши гибридного потомства яблони, полученного от скрещивания восприимчивого и устойчивого сортов, с использованием естественного инфекционного фона и молекулярных маркеров гена *Rvi6*, и обоснование целесообразности их совместного применения.

Материалы и методы

В работе, выполненной на вегетационной площадке и в лаборатории генетики и микробиологии Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия (СКФНЦСВВ), были исследованы

гибридные сеянцы яблони, полученные от скрещивания сортов Ренет Симиренко (восприимчив к парше) и Моды (устойчив к парше, несет ген *Rvi6* в гетерозиготе) в 2016 г. Гибридные семена извлекали из зрелых плодов, сушили в течение 3-4 дней и хранили в холодильнике при +4°C. Перед высевом семена стратифицировали. Посев осуществляли в открытый грунт весной 2017 г. по схеме 0,5 × 0,05–0,1 м. Все сеянцы этикетировали (рис. 1).

В результате скрещивания было получено 457 гибридных семян. Выход всходов сеянцев составил 236 растений. Фитопатологическому и ДНК-маркерному анализу были подвергнуты 207 оставшихся двухлетних сеянцев. Доля погибших сеянцев ко второму году эксперимента составила 12%.



Рис. 1. Общий вид плотной посадки гибридных сеянцев в школке

Примечание: А – общий вид школки гибридной семьи сеянцев; Б – маркированные сеянцы.

Fig. 1. General view of dense planting of hybrid seedlings in apple seedling nursery

Note: A is a general view of seedling nursery; Б – labeled seedlings.

Оценку сеянцев на устойчивость к парше осуществляли на естественном инфекционном фоне в июле 2018 г. В качестве контроля наличия инфекционного фона служили взрослые деревья восприимчивых сортов Ренет Симиренко и Айдаред, произрастающие в непосредственной близости от школки сеянцев (2 м). Посадки сорта Айдаред представляли собой 12 деревьев возрастом 20 лет, характеризующиеся высоким (5 баллов) ежегодным уровнем поражения паршой яблони на естественном фоне. Ренет Симиренко был представлен двумя трехлетними деревьями, которые поразились на 4 балла. Контрольные деревья и гибридные сеянцы не подвергались обработкам средствами химической защиты в течение всего вегетационного периода.

Метеорологические условия в период вегетации представлены в таблице 1. В целом можно отметить более высокие среднемесячные показатели температуры и низкие

значения влажности и количества осадков текущего года по сравнению с многолетними данными. Наиболее благоприятными для развития заболевания условиями является диапазон температур 19–25°C при влажности от 70% и выше.

Поражение учитывали по шкале качественных классов инфекции, предложенной Chevalier et al. (1991, цит по Gessler et al., 2006) в баллах: 0 – отсутствие признаков поражения; 1 – гиперчувствительный ответ типа «булавочных уколов»; 2 – хлоротические пятна без спороношения; 3а – хлоротические и некротические пятна со слабым спороношением; 3б – как в предыдущем типе, но с более сильным спороношением; 4 – темно-оливковые пятна с обильным спороношением. Также оценку степени поражения вели по количественной шкале, отражающей площадь поражения листа паршой: 0 – листья здоровые; 1 – единичные мелкие пятна, занимающие до 1% поверхности

листа; 2 – поражено 1–10 % поверхности листа; 3 – поражено 11–25% поверхности листа; 4 – поражено 26–50% поверхности листа, пятна крупные, с темным налётом спороношения; 5 – пятна, занимающие более 50% поверхности листа, крупные, сливающиеся, с темным налётом спороношения гриба (Zhdanov, Sedov, 1991).

роношения; 5 – пятна, занимающие более 50% поверхности листа, крупные, сливающиеся, с темным налётом спороношения гриба (Zhdanov, Sedov, 1991).

Таблица 1. Сравнение средних месячных метеорологических характеристик в вегетационный период 2018 г. с многолетними данными
Table 1. Comparison of the average monthly meteorological characteristics of growing season of 2018 with multi-year data

Условия/ Conditions		Месяц/ Month			
		май may	июнь june	июль july	август august
Температура воздуха, °С Air temperature, °С	текущая ¹ current	19,4	24,1	26,2	25,8
	многолетняя ² perennial	17,2	21,3	24,1	23,7
Относительная влажность воздуха, % Relative humidity, %	текущая current	64	53	58	41
	многолетняя perennial	66	68	63	62
Сумма осадков, мм The amount of precipitation, mm	текущая current	43	11	117	57
	многолетняя perennial	68	86	56	44
Количество дней с осадками Number of days with precipitation	текущее current	8	5	11	2
	многолетнее perennial	14	14	10	9

Примечание: ¹метеорологические показатели текущего года исследования, составлены на основании данных интернет-портала rp5.ru (номер метеостанции 34927, Круглик);

²многолетние показатели были получены с использованием данных интернет-портала pogodaiklimat, точка удалённого доступа <http://www.pogodaiklimat.ru/climate/34927.htm>.

Note: ¹the current year meteorological indicators of the study compiled on the basis of data from the Internet portal rp5.ru (meteorological station number 34927, Kruglik);

²long-term indicators were obtained using data from the Internet portal pogodaiklimat, remote access point <http://www.pogodaiklimat.ru/climate/34927.htm>.

Экстракцию ДНК из молодых листьев проводили методом, основанным на использовании буфера с ЦТАБ (Murray, 1980). ПЦР проводили в 25 мкл смеси содержащей 50-70 нг ДНК, 0,1 мМ dNTPs (дезоксинуклеотидтрифосфаты), 0,3 мкМ каждого праймера; 2,5 мкл 10X реакционного буфера, 2,5 мМ MgCl₂, 1 единицу Taq-полимеразы. Условия реакции были следующими: начальная денатурация – 5 мин при 95°C, далее – 35 циклов: денатурация 15 сек 95°C, отжиг праймеров – 30 сек при 58°C, элонгация – 30 сек при 72°C, финальный цикл элонгации – 3 мин при 72°C. Для проведения ПЦР использовали амплификатор Bio-Rad T100. Для проведения ПЦР использовали пару праймеров VfC1F+VfC2R, которая амплифицирует три фрагмента размерами 286, 484 и 646 пар нуклеотидов (пн) при наличии доминантного аллеля искомого гена. При отсутствии доминантного аллеля гена *Rvi6* амплифицируется два фрагмента – 484 и 646 пн. Целевым является фрагмент 286 пн (Afunian et al. 2004).

Для электрофоретического анализа продуктов ПЦР использовали 2% агарозный гель. Для окрашивания гелевых

пластин использовали 0,1% раствор бромистого этидия, после чего их фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты

На ранних этапах вегетационного периода нами было отмечено регрессивное развитие заболевания исследуемых растений паршой. Так, в середине и в конце мая поражение на контрольных деревьях сортов Ренет Симиренко и Айдаред отмечалось только на уровне 2 баллов и на единичных опытных растениях в виде качественных реакций. В июне изменения в динамике развития болезни не были замечены в обеих группах растений. Только к концу июля было зафиксировано поражение на контрольных растениях на уровне 4–5 баллов и проявление инфекции на значительной части сеянцев. Контрольные растения сорта Айдаред (20-летние деревья) поразились сильнее трехлетних растений сорта Ренет Симиренко.

Значительное влияние на развитие качественного инфекционного фона оказывают погодно-климатические характеристики вегетационного периода года. Сравнение средних месячных метеорологических показателей мая, июня и июля, имеющих критическое значение для развития инфекционного процесса с многолетними значениями (см. табл. 1) показывает отклонения от нормы по некоторым параметрам. Для температуры разница составила +2,1 и +2,2°C для всех рассматриваемых месяцев, т.е. средняя температура этого года оказалась выше по сравнению с нормой. Имелись также отклонения, как по относительной влажности, так и количеству осадков, в основном в сторону более низких значений за исключением показателей по второму параметру в июле. Так, сумма осадков в мае оказалась на 37% ниже нормы, а в июне на 87%. Более низкой оказалась и относительная влажность июля – на 22 % от нормы. Между тем, количество осадков в

июле превысило климатическую норму на 109%. Более высоким оказалось и количество дней с осадками в этом летнем месяце.

Оценка поражения паршой сеянцев яблони с использованием качественной шкалы показало наличие четырех классов реакции: 0, 3а, 3б и 4 (рис. 2). Классы поражений 3а (рис. 2Б) и 3б (2В) различаются степенью развития спороношения и относятся к слабой устойчивости и слабой восприимчивости, соответственно (Clark et al., 2014). Реакции 1 и 2 не были зафиксированы в исследованной выборке сеянцев. Данные оценки с применением количественной шкалы приведены вместе с результатами молекулярно-генетического анализа на наличие гена устойчивости (табл. 2). Сравнение результатов оценки по количественной и качественной шкале показали, что классы поражений 3а и 3б соотносятся с восприимчивой реакцией на 1 балл по количественной шкале.

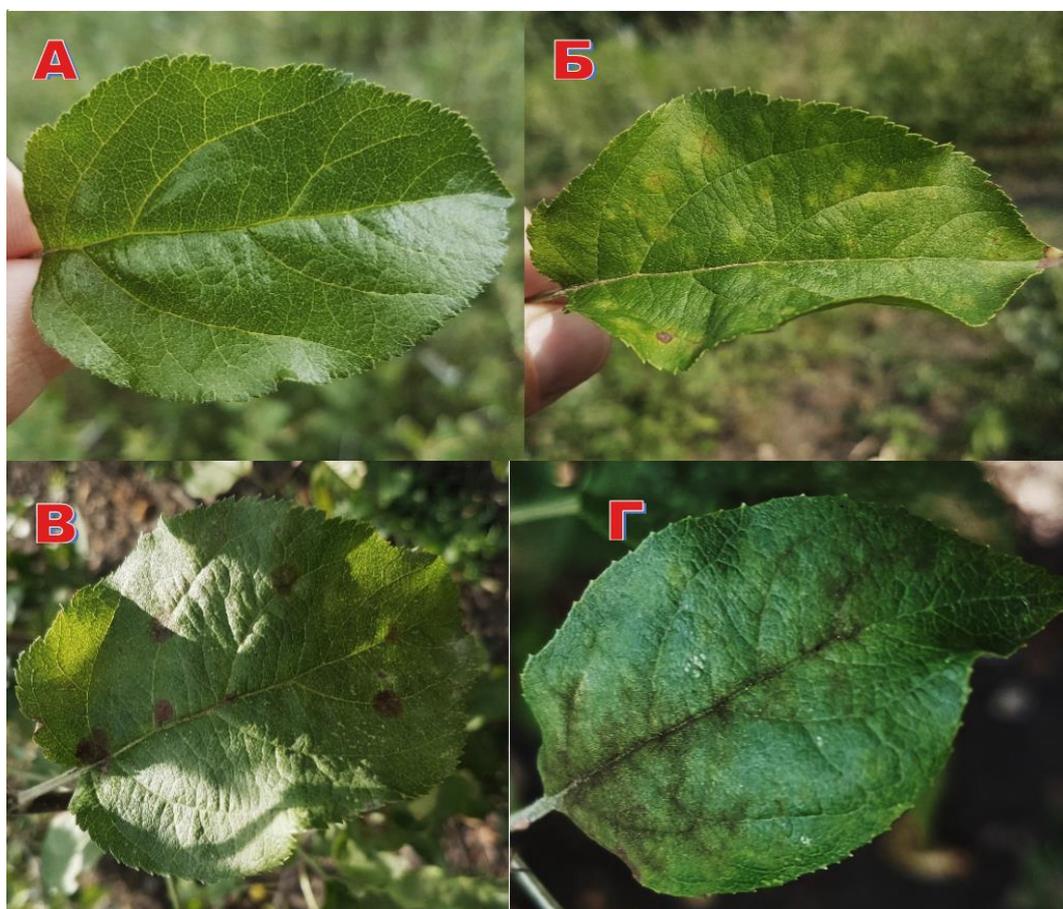


Рис. 2. Типичный вид поражений, идентифицированных в исследовании для различных баллов качественной шкалы Chevalier et al. (1991)

Примечание: А – отсутствие симптомов (0 баллов), Б – хлоротические и некротические пятна со слабым спороношением (балл 3а), В – хлоротические и некротические пятна с более сильным, чем в предыдущем классе спороношением (балл 3б), Г – обильное спороношение (4 балла).

Fig. 1. A typical patterns of lesions identified in the study for different scores using qualitative scale (Chevalier et al., 1991)

Note: A – no symptoms (0), Б – chlorotic and necrotic lesion with weak sporulation (3a), В – chlorotic and necrotic lesion with stronger than in the previous class sporulation (3b), Г – abundant sporulation (4).

Таблица 2. Оценка устойчивости к парше гибридных сеянцев яблони с использованием количественной шкалы и молекулярных гена *Rvi6*
Table 2. Evaluation of hybrid seedlings for resistance to apple scab quantitative scale and molecular markers of the *Rvi6* gene

№ п/п	Балл поражения/ Class of infection	<i>Rvi6</i>	№ п/п	Балл поражения/ Class of infection	<i>Rvi6</i>	№ п/п	Балл поражения/ Class of infection	<i>Rvi6</i>	№ п/п	Балл поражения/ Class of infection	<i>Rvi6</i>
1	1	-	52	0	+	103	1	-	156	1	-
2	0	+	53	1	+	104	0	+	157	0	+
3	0	+	54	0	+	105	0	+	158	0	+
4	1	-	55	0	+	106	0	+	159	0	+
5	0	-	56	1	-	107	0	+	160	1	-
6	0	+	57	1	-	108	1	-	161	1	-
7	0	+	58	0	+	109	0	+	162	0	+
8	0	+	59	1	-	110	2	-	163	1	+
9	0	+	60	0	+	111	0	-	164	1	-
10	0	-	61	0	+	112	1	-	165	0	+
11	0	+	62	0	+	113	0	+	166	0	+
12	0	+	63	0	+	114	0	-	167	0	+
13	0	+	64	0	-	115	1	-	168	0	+
14	0	+	65	0	+	116	0	+	169	0	+
15	0	+	66	0	+	117	0	+	170	0	+
16	0	-	67	1	-	118	2	-	171	1	-
17	1	-	68	4	-	119	0	+	172	1	-
18	1-2	-	69	3	-	120	1	-	173	0	+
19	0	+	70	0	+	121	3	-	174	0	+
20	0	+	71	0	+	122	2	-	175	0	-
21	0	+	72	0	+	123	0	+	176	0	+
22	2	-	73	1	+	124	0	+	177	1	+
23	0	+	74	0	+	125	2	-	178	1	-
23/1	1	-	75	1	-	126	3	-	179	0	+
24	0	+	76	1	-	127	0	+	180	0	-
25	2	-	77	1	-	128	0	+	181	2	-
26	1	-	78	1	-	129	0	+	182	0	+
27	0	+	79	0	+	130	0	+	183	0	+
28	0	+	80	0	+	132	1-2	-	184	0	+
29	0	+	81	0	+	133	3	-	185	0	+
30	0	+	82	0	+	134	1	-	186	0	+
31	0	+	83	1	-	135	1	-	187	1	-
32	0	+	84	1	-	136	1	-	188	0	+
33	1	-	85	1	-	137	0	+	189	3	-
34	0	+	86	0	+	138	1	-	190	0	+
35	2	-	87	0	+	139	3	-	191	1	-
36	0	+	88	0	+	140	1	-	192	1	-
37	1	-	89	2	-	141	1	-	193	0	+
38	2	-	90	0	+	142	1	-	194	0	-
39	1	-	91	1	-	143	0	+	195	2	-
40	1	-	92	0	-	144	1	-	196	0	-
41	0	-	93	0	+	145	1	-	197	0	-
42	0	-	94	0	-	146	0	+	198	3	-
43	0	+	95	1	-	147	0	+	199	1	-
44	1	-	96	0	+	148	2	-	200	3	-
45	0	+	97	0	+	149	2	-	201	2	-
46	1	+	98	1	-	150	0	-	202	1-2	-
47	1	-	99	0	-	151	2	-	203	1	-
48	1	-	100	0	+	152	1	-	204	1	-
49	0	+	101	1	-	153	0	+	205	3	-
50	0	+	102	1	-	154	0	+	206	5	-
51	0	+	102/1	0	+	155	0	+	207	1	-

Примечание: «+» – наличие гена *Rvi6*; «-» – отсутствие гена *Rvi6*.

Как видно из таблицы 2, количество растений без поражений (0 баллов) составило 117 (56%). С помощью молекулярных маркеров гена *Rvi6* идентифицированы 105 растений (51%) с генотипом *Rvi6rvi6* и 102 (49%) с генотипом *rvi6rvi6*, что близко к теоретическому расщеплению 1:1, получаемому при скрещивании генотипа, несущего ген *Rvi6* в гетерозиготе с восприимчивым сортом (*rvi6rvi6*).

По результатам молекулярно-генетического анализа, 16 семян, показавшие балл поражения 0, не содержали ген *Rvi6*. Отсутствие развития заболевания у данных растений, очевидно, является следствием влияния фактора окружающей среды в условиях естественного инфекционного фона – наличием неблагоприятных условий для интенсивного развития инфекции.

Согласно имеющимся данным, в условиях искусственного инфекционного фона возможно исключение до 90%, а в некоторых случаях и 100% восприимчивых генотипов

(Zhdanov, Sedov, 1991). Учитывая данный факт, можно сделать вывод о достаточно высоком уровне эффективности использования естественного инфекционного фона, который позволил выбраковать 91 растение из 107 восприимчивых, что составляет 85%.

Как видно из рисунка 3, на котором представлена электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с парой праймеров, специфичных для гена *Rvi6*, фрагмент размером 286 пн отсутствует у ряда образцов. На электрофореграмме видно, что у образцов 182–186 и 188 имеется данный целевой фрагмент, также присутствующий и у сорта-контроля. В 98% случаев у пораженных на 1–5 баллов генотипов был отрицательный результат на наличие молекулярных маркеров гена *Rvi6*. Всего пять растений (46, 53, 73, 163 и 177) имели несоответствие с ожидаемыми результатами, что согласуется с данными Gessler et al. (2006) о влиянии генного окружения на фенотипическое проявление данного гена.

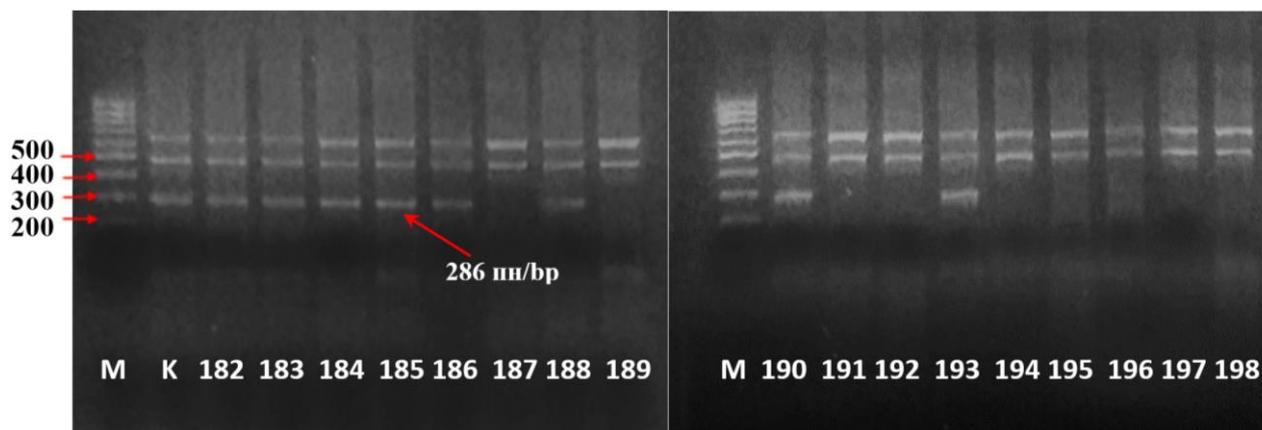


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР, амплифицируемых с использованием пары праймеров VfC1F+VfC2R

Примечание: с левого края рисунка приведены размеры фрагментов маркера молекулярной массы ДНК; длинной красной стрелкой показан целевой ПЦР-продукт; М – маркер молекулярной массы ДНК; К – контрольный образец (сорт Флорина), имеющий ген *Rvi6*; 182–198 – исследуемые образцы

Fig. 3. Electrophoregram of PCR products amplified using primer pair VfC1F+VfC2R.

Note: from the left edge of the figure the sizes (in base pairs, bp) of the DNA molecular weight marker fragments are shown; a long red arrow shows the band of the target PCR product; M – DNA molecular weight marker; K – lane with the control sample having the *Rvi6* gene; 182–198 – the investigated samples

Обсуждение

Анализ погодных-климатических характеристик года исследования показал наличие неблагоприятных условий окружающей среды в начале вегетационного периода для развития сильного естественного инфекционного фона, выразившиеся в более высоких температурах и пониженной влажности. Усиление или ослабление инфекционного фона может происходить не только в результате колебаний инфекционной нагрузки, но и под действием изменений внешних условий в период инокуляции и инкубации. Важность влияния температуры и влажности на успешное развитие парши яблони было показано ранее (Fedorova, 1977; Zhdanov, Sedov, 1991). Влага важна на всех этапах развития патогена и инфицирования растения:

при распространении, закреплении на поверхности хозяина, при прорастании, инвазии и развитии внутри его тканей. Так, для прорастания споры на поверхности листа необходимо не просто увлажнение, а наличие капельно-жидкой воды, такое требование характерно для аэрогенных возбудителей (Fedorova, 1977). Продолжительность периода увлажнения яблони тесно связана с температурой. При создании прогностических кривых скорости становления инфекционного процесса Миллом были учтены количество часов оптимальной влажности при разных показателях температуры (MacHardy, 2001). Keit, Jones (1926, цит. по Zhdanov, Sedov, 1991) установили, что наименьшая продолжительность при заражении аскоспорами колебалась от 13–14 ч при 6°C до 4–6 ч при 20–24°C.

Yakuba (2013) отмечает, что в степных районах Краснодарского края, где количество осадков за вегетационный период составляет 160 мм, а в результате неравномерного ее распределения случаются засухи, вредоносность парши яблони значительно снижена.

В июле достаточное количество дождливых дней обеспечило развитие инфекционного фона, позволившего провести оценку гибридных растений на устойчивость к заболеванию. Кроме факторов окружающей среды на становление инфекционного процесса в этом месяце могло способствовать накопление естественного инфекционного фона в течение сезона. Так Nasonov et al. (2017) отмечают возрастание естественного инфекционного фона ко второму месяцу лета.

Развитие более сильного инфекционного фона на контрольных растениях обусловлено долговременным существованием карантинного необрабатываемого насаждения, особенно сорта Айдаред (20 летний сад), в котором произошёл отбор наиболее агрессивных форм возбудителя. Некоторыми учеными также отмечалось более сильное поражение старых деревьев по сравнению с молодыми, в силу большого загущения и многолетнего накопления инокулаума (Zhdanov, Sedov, 1991).

В целом, комплексное использование фенотипической оценки на естественном инфекционном фоне и молекулярно-генетического анализа гибридной семьи на устойчивость к *V. inaequalis* показывает достаточно высокую степень совпадения результатов, полученных разными методами, между собой.

Несоответствие между некоторыми результатами фитопатологического теста, показавшими отсутствие поражения, и данными молекулярного анализа, не подтвердившими наличие гена устойчивости, может говорить, с одной стороны, об ошибке в одном из методов, а с другой – о наличии другого источника устойчивости к патогену. Наличие другого источника возможной устойчивости к патогену маловероятно, так как используемые в эксперименте родительские сорта хорошо изучены по этим показателям и один них характеризуется полной восприимчивостью. Более вероятна ошибка в результатах фитопатологической оценки, которая могла быть обусловлена недостаточной силой естественного инфекционного фона текущего года на гибридных сеянцах. Это предположение подтверждается, с одной стороны, анализом погодных климатических показателей (см. табл. 1.) начала вегетационного периода, а с другой – слабым развитием инфекции на сортах-контролях в начале вегетационного периода. Таким образом, как качественные реакции на некоторых сеянцах, так и отсутствие симптомов поражения, могли стать результатом остановки развития инфекционного

процесса, а некоторых случаях и гибели патогена, в силу более высоких температур и засушливых периодов года исследований. Так, начавшееся инфицирование могло быть прервано на любом из этапов, в том числе и на стадии спороношения, что приводило к изменению его степени и выражалось в появлении качественных реакций 3а и 3б, носящих частично количественный характер (см. рис. 2.), а также, возможно, и к нарушению распознавания Avr-фактора патогена, обеспечивающего совместимые взаимоотношения с растением-хозяином. Применение ДНК-маркерного анализа позволило подтвердить, как относительную эффективность естественного инфекционного фона для оценки по целевому признаку, так и наличие у устойчивых сеянцев доминантного аллеля гена *Rvi6*.

Заключение

Комплексная оценка гибридной семьи, полученной от скрещивания восприимчивого (*rvi6rvi6*) и устойчивого (*Rvi6rvi6*) сортов яблони на устойчивость к парше с использованием естественного инфекционного фона и молекулярного маркирования показала необходимость такого подхода. С одной стороны, точность фитопатологического тестирования зависит от множества различных факторов, наиболее существенным из которых является влияние погодных климатических условий. С другой стороны, использование только молекулярного маркирования исключает возможность оценки степени проявления устойчивости по конкретному гену в зависимости от его генного окружения или условий окружающей среды. Однако, такая оценка не обладает высокой актуальностью при решении селекционных задач, когда необходим отбор исключительно устойчивых образцов.

Полученные нами результаты говорят в пользу алгоритма, при котором на первом этапе проводится отбор устойчивых образцов на естественном инфекционном фоне, для которых в последствии подтверждается наличие искомого гена с помощью ДНК-маркерного анализа. Такой подход позволяет сократить затраты ресурсов и времени на ДНК-маркерную идентификацию гена устойчивости в два раза за счет выбраковки порядка 50% неустойчивых сеянцев на основании фенотипической оценки.

Полученные в ходе работы гибридные сеянцы, устойчивые к парше с маркером гена *Rvi6*, представляют ценность для использования в селекции по данному признаку.

Благодарности (работа выполнена в рамках Госзадания: тема № 0689-2018-0003).

References/Литература

- Afjarian MR, Goodwin PH, Hunter DM (2004) Linkage Vfa4 in *Malus domestica* and *Malus floribunda* with Vf resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. *Plant Pathology* 53: 461–467 DOI: 10.1111/j.1365-3059.2004.01047.x
- Bus VGM, Rikkerink EH, Caffier V, Durel CE, Plummer KM (2011) Revision of the nomenclature of the differential host–pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annual Review of*

Phytopathology 49: 391–413 DOI: 10.1146/annurev-phyto-072910-095339.

Chevalier M, Lespinasse Y, Renaudin S (1991) A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology* 40(2): 249–256.

Clark MD, Bus VG, Luby JJ, Bradeen JM (2014) Characterization of the defence response to *Venturia inaequalis* in ‘Honeycrisp’ apple, its

- ancestors, and progeny. *European journal of plant pathology* 140(1): 69–81.
- Fedorova RN* (1977) Scab of apple trees (Parsha yabloni). – Leningrad: 61 [in Russian] (*Фёдорова Р. Н.* Парша яблони. – Ленинград: Колос, 1977. 61 с).
- Gessler C, Patocchi A, Sansavini S, Tartarini S, Gianfranceschi L* (2006) *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25 (6): 473–503.
- Gianfranceschi L, Koller B, Seglias N, Kellerhals M, Gessler C* (1996) Molecular selection in apple for resistance to scab caused by *Venturia inaequalis*. *Theoretical and Applied Genetics* 93 (1–2): 199–204 DOI: 10.1007/BF00225746.
- Kozlovskaya ZA, Vasekha VV, Gashenko TA, Urbanovich OYU* (2009) The effectiveness of the use of the original forms of different genetic origin in the selection of apple trees for resistance to scab (Rezultativnost' ispol'zovaniya iskhodnykh form razlichnogo geneticheskogo proiskhozhdeniya v selekcii yabloni na ustojchivost' k parshe). *Plodovodstvo – Orchardng: nauch. tr. RUP «Institut plodovodstva – Institute for Orchardng: 9–17* [in Russian] (*Козловская З. А., Васеха В. В., Гащенко Т. А., Урбанович О. Ю.* Результативность использования исходных форм различного генетического происхождения в селекции яблони на устойчивость к парше // Плодоводство: науч. тр. / РУП «Институт плодководства». 2009. С. 9–17).
- Kozlovskaya ZA* (2004) Modern trends in apple selection (review of foreign breeding programs) (Sovremennye napravleniya selekcii yabloni (obzor zarubezhnykh selekcionnykh programm)). *Plodovodstvo – Orchardng* 16: 256–270. [in Russian] (*Козловская З. А.* Современные направления селекции яблони (обзор зарубежных селекционных программ) // Плодоводство. 2004. Т. 16. С. 256–270).
- Kozlovskaya ZA* (2006) Scientific basis of apple selection for intensive gardens of Belarus (Nauchnye osnovy selekcii yabloni dlya intensivnykh sadov Belarusi): avtoref. Dis. BGSKHA. Gorki: 39 [in Russian] (*Козловская З. А.* Научные основы селекции яблони для интенсивных садов Беларуси: автореф. Дис. БГСХА. – Горки. 2006. С. 39).
- Masny S* (2017) Occurrence of *Venturia inaequalis* races in Poland able to overcome specific apple scab resistance genes. *European Journal of Plant Pathology* 147 (2): 313–323 DOI: 10.1007/s10658-016-1003-x.
- Murray MG, Thompson WF* (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 10: 4321–4325.
- Nasonov AI, Suprun II, Lobodina EV, Stepanov IV, Barsukova ON* (2017) Artificial scab resistance evaluation of *Malus orientalis* forms – a potential source of new genes for resistance to apple scab (Ocenka na iskusstvennom infekcionnom fone form *Malus orientalis* – potentsial'nykh istochnikov genov ustojchivosti k parshe yabloni). *Politematicheskij setevoj ehlektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta – Polythematic network electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University (Scientific journal of KubSAU)* 131: 1377–1388 [in Russian] (*Насонов А. И., Супрун И. И., Лободина Е. В., Степанов И. В., Барсукова О. Н.* Оценка на искусственном инфекционном фоне форм *Malus orientalis* – потенциальных источников генов устойчивости к парше яблони // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2017. № 131. С. 1377–1388) DOI: 10.21515/1990-4665-131-113.
- Osterman LA* (1981) Methods for the study of nucleic acids (Metody issledovaniya nukleinovykh kislot). M.: Nauka: 288 [in Russian] (*Остерман Л. А.* Методы исследования нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1981. С. 288).
- Parisi L, Lespinasse Y, Guillaumes J, Krüger J* (1993) A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the Vf gene. *Phytopathology* 83 (5): 533–537 DOI: 10.1094/Phyto-83-533.
- Parisi L, Laurens F, Didelot F, Evans K, Fischer C, Fouillet V, Tsipouridis C* (2006) Geographical distribution of *Venturia inaequalis* strains virulent to the Vf gene in Europe. *IOBC WPRS BULLETIN* 29 (1): 49.
- Roberts T, Crute I* (1994) Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective from *Malus floribunda*. *Norwegian Journal of Agricultural Science* 17: 403–406.
- Sedov EN, Zhdanov VV, Serova ZM, Makarkina MA* (2013) Apple tree breeding for scab resistance: the development of the ideas of NI Vavilova and IV Michurin (Selekcija yabloni na ustojchivost' k parshe: razvitie idej NI Vavilova i IV Michurina). *Sel'skokozyajstvennaya biologiya – Agricultural biology* 1: 42–52 [in Russian] (*Седов Е. Н., Жданов В. В., Серова З. М., Макаркина М. А.* Селекция яблони на устойчивость к парше: развитие идей НИ Вавилова и ИВ Мичурина // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 1. С. 42–52) DOI: 10.15389/agrobiol-ogy.2013.1.42rus.
- Suprun II, Nasonov AI, Yakuba GV, Lobodina EV, Barsukova ON* (2016) Effective selection of apple seedlings in a seed plot on resistance to scab and powder mildew (Ehffektivnost' otbora seyancev yabloni v shkolkе na ustojchivost' k parshe i muchnistoj rose). *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii – Journal Kubansad* 38(2): 117–129 [in Russian] (*Супрун И. И., Насонов А. И., Якуба Г. В., Лободина Е. В., Барсукова О. Н.* Эффективность отбора сеянцев яблони в школке на устойчивость к парше и мучнистой росе // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2016. № 38 (2). С. 117–129).
- Vavra R, Bocek S* (2010) Apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.) attacks on cultivars and genotypes carrying different resistant genes in plantings with breaking through Vf–Rvi6 gene. *XIV International Conference on Organic Fruit Growing. Germany.* 22–24.02.2010: 10–15.
- Yakuba GV* (2013) Protection of apple from scab in a climate of change (Ehkologizirovannaya zashchita yabloni ot parshi v usloviyah klimaticheskikh izmenenij): Monograph – Krasnodar: GNU SKZ-NIISiV: 213 [in Russian] (*Якуба Г. В.* Экологизированная защита яблони от парши в условиях климатических изменений: Монография – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ. 2013. С. 213).
- Zhdanov VV, Sedov EN* (1991) Apple breeding for scab resistance (Selekcija yabloni na ustojchivost' k parshe). Tula: Priok. kn. izd-vo: 208 [in Russian] (*Жданов В. В., Седов Е. Н.* Селекция яблони на устойчивость к парше. Тула: Приок. кн. изд-во, 1991. 208 с.).

ГЕНЫ-МИШЕНИ ДЛЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА SOLANACEAE: ЭВОЛЮЦИЯ И СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ (ОБЗОР)

Иванова К. А.¹, Спасельникова А. В.^{1,2}, Шумный В. К.¹, Герасимова С. В.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,

Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 10.

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2
e-mail: gerson@bionet.nsc.ru

Метаболическая инженерия растений является инструментом получения продуцентов ценных метаболитов, и также может применяться для снижения токсичности ядовитых растений с целью расширения области их применения. Культурные растения семейства пасленовых широко применяются в хозяйственных целях. Вторичный метаболизм пасленовых (Solanaceae) отличается широким разнообразием. В селекции картофеля и томата направленно отбирались формы растений со сниженной токсичностью, а в селекции такого экзотического индийского растения, как витания снотворная (*Withania somnifera* L.), напротив, отбирались растения с повышенной токсичностью. В результате естественных процессов и направленного отбора, в геномах пасленовых сформировались сложные системы генов, регулирующих разнообразие биосинтетические процессы. Недавние исследования показывают, что формирование генетического контроля вторичного метаболизма происходило путем дубликаций генов первичного метаболизма и формирования кластеров, регулирующих новые метаболические пути. Секвенирование геномов пасленовых дает возможность отследить эволюционные пути формирования метаболизма алкалоидов, одних из наиболее представленных токсичных метаболитов этого семейства. Знание геномной организации и эволюции метаболизма алкалоидов позволяет предлагать стратегии по модификации его генетического контроля с целью снижения токсичности растений табака и картофеля. Получение безникотиновых форм табака (*Nicotiana tabacum* L.) позволит более широко вовлекать эту культуру в биотехнологию как перспективную растительную систему синтеза рекомбинантных белков. Снижение токсичности картофеля актуально для некоторых сортов и необходимо при привлечении в селекцию диких родственников этой культуры. В отличие от культурного картофеля (*Solanum tuberosum* L.), многие дикие родственные ему виды накапливают токсичные стероидные гликоалкалоиды, что мешает введению этих видов в селекцию как доноров генов устойчивости к различным биотическим и абиотическим факторам.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, картофель, табак, геномная инженерия, CRISPR/Cas, никотин, стероидные гликоалкалоиды, гены GAME

Прозрачность финансовой деятельности:

авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует

Иванова К.А., Спасельникова А.В., Шумный В.К., Герасимова С.В. Гены-мишени для метаболической инженерии представителей семейства Solanaceae: эволюция и структурная организация. Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):34-42. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-34-42

Ivanova K. A., Spasel'nikova A. V., Shumnyj V. K., Gerasimova S. V. The target genes for Solanaceae secondary metabolism engineering: evolution and genome organization. Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):34-42. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-34-42

THE TARGET GENES FOR SOLANACEAE SECONDARY METABOLISM ENGINEERING: EVOLUTION AND GENOME ORGANIZATION

Ivanova K. A.¹, Spaselnikova A. V.^{1,2}, Shumny V. K.¹, Gerasimova S. V.^{1,2}

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

10, Acad. Lavrentjev pr., Novosibirsk 630090, Russia

²Novosibirsk State University,

2, Pirogova Street, Novosibirsk 630090, Russia

e-mail: gerson@bionet.nsc.ru

Metabolic engineering of plant secondary metabolism provides a way to obtain plants with elevated level of valuable molecular compounds. Alternatively, metabolic engineering can be used for reduction of toxic substances accumulation in plant tissues. This approach allows one to expand the application of toxic plants in agriculture and biotechnology. The crops of Solanaceae family provide an example of toxic plants of high economic value. Solanaceae family includes edible crops such as potato, tomato and eggplants, medicinal plants like *Withania somnifera* L. and major non-food crop *Nicotiana tabacum* L. The secondary metabolism of Solanaceae family is widely diverse and includes the biosynthesis and accumulation of number of toxic compounds, such as nicotine and other alkaloids in tobacco, steroidal glycoalkaloids in potato and withanolides in winter cherry *W. somnifera*. The secondary metabolic pathways of Solanaceae family have evolved from primary metabolism via duplication of the enzyme coding genes and diversification of genes functions. Local, segment and the whole genome duplications and subsequent formation of metabolic genes clusters are the main processes in secondary metabolic pathways formation. Recent whole genome sequence data from number of Solanaceae species allows one to reconstruct the putative mechanism of primary and secondary metabolism genetic control and evolution. Genomic data together with novel guided endonuclease based genome modification tools provide an opportunity for introduction of precise changes into secondary metabolism. Suppression of nicotine accumulation in tobacco is promising approach for developing of novel plant systems for molecular farming. Toxicity of wild potato relatives impedes their usage in potato breeding. Tobacco and wild potato toxicity reduction can be achieved by different genome modification approaches: knock-out of the key enzyme genes of alkaloids synthesis, the large deletion of the whole cluster of the secondary metabolic genes or the precise editing of key transcription factors in secondary metabolism regulation pathways.

Key words: *Nicotiana tabacum*, potato, tobacco, genome engineering, CRISPR/Cas, nicotine, steroidal glycoalkaloids, GAME genes

УДК 575.852

Поступила в редакцию 15.10.2018

Принята к публикации 26.11.2011

Введение

Метаболизм растений представляет собой сложную систему многоступенчатых биосинтетических и катаболических процессов. Большинство элементарных событий метаболизма, а именно отдельных химических превращений простых молекул, катализируется специфическими ферментами, которые, в свою очередь, кодируются отдельными генами. Метаболизм принято подразделять на первичный и вторичный. Первичный метаболизм является неотъемлемой составляющей жизнеобеспечения растения, в него входят реакции, снабжающие организм веществом и энергией. Вторичный метаболизм объединяет биохимические процессы, специфические для отдельных растений и/или напрямую не связанные с их основными жизненно важными процессами. Растения производят сотни тысяч небольших молекул, известных как специализированные метаболиты, включающие фенольные соединения, терпеноиды/изопреноиды, и такие азот- и серо-содержащие вещества как алкалоиды и глюкозинолаты, соответственно (Patra et al., 2013). Функции таких соединений могут быть различными – от защиты против патогенов или абиотического стресса до, наоборот, привлечения опылителей или симбионтов (Patra et al., 2013). Такое разнообразие функций имеет экономическое и экологическое значение (Aharoni, Galili, 2011). Термин «метаболическая инженерия» означает направленное изменение метаболизма растения при помощи модификации его генетического контроля. Как правило, метаболическая инженерия подразумевает ряд манипуляций, приводящих к увеличению продукции какого-либо ценного вещества в растении. В ряде случаев метаболическая инженерия может также служить инструментом снижения содержания токсичных веществ, что может расширить применение растения в пищевых, кормовых и биотехнологических целях.

Семейство пасленовых включает как ценные возделываемые пищевые культуры, такие как картофель (*Solanum tuberosum* L.) и томат (*Solanum lycopersicum* L.), так и ряд полезных, но токсичных растений, накапливающих различные ядовитые алкалоиды, – белена (*Hyoscyamus niger* L.), дурман (*Datura* L.), витания снотворная (*Withania somnifera* L.). Дикие виды картофеля также токсичны и могут накапливать стероидные гликоалкалоиды (СГА). Важной непищевой пасленовой культурой является табак обыкновенный (*Nicotiana tabacum* L.), накапливающий мажорные токсические компоненты никотин и норникотин. Растения рода петуния (*Petunia* Juss.), известные как ценная декоративная культура, также накапливают алкалоиды для защиты от вредителей (Matsuura, Fett-Neto, 2017). Изменение метаболизма различных представителей семейства Solanaceae в процессе domestikации происходило в противоположных направлениях, в зависимости от их значения для человека. Домestikация пищевых культур и растений, использующихся в биотехнологических целях, была направлена на снижение токсичности. В то же время, известны случаи направленного отбора более токсичных форм, например, метаболизм *W. somnifera*, использующейся в индийской аюрведической медицине в качестве одного из главных целебных растений,

эволюционировал по пути увеличения накопления токсичных стероидных лактонов – витанолидов. При domestikации табака также выделялись направления отбора в пользу увеличения содержания никотина. Метаболическая инженерия пасленовых представляет интерес как инструмент изменения содержания ядовитых веществ в разных видах этого семейства с целью расширения их хозяйственного применения. Для проведения работ по метаболической инженерии таких сложных в плане организации генома объектов как пасленовые, многие из которых имеют полиплоидные геномы и другие особенности, необходимо исследовать организацию контроля вторичного метаболизма и его происхождение. Чтобы разработать оптимальные подходы к изменению токсичности, необходимо рассмотреть генетический контроль метаболизма алкалоидов и выделить гены-мишени, модификация которых приведет к снижению или увеличению накопления ядовитых веществ без негативного влияния на первичный метаболизм и жизнеспособность растений.

1. Происхождение и эволюция вторичных метаболических путей

Разнообразие вторичных метаболитов растений является следствием эволюционного расхождения и быстрого развития специализированных метаболических путей. Эти новые пути биосинтеза появляются в результате дублирования генов или функционального расхождения существующих генов, и впоследствии они эволюционируют путем отбора и/или дрейфа. Исследования за последние два десятилетия показали, что специализированные метаболические пути являются следствием встраивания в них ферментов первичного метаболизма. Хотя структурное разнообразие вторичных метаболитов гораздо обширнее первичных метаболитов, все специализированные классы вторичных метаболитов происходят из первичных метаболических предшественников (Moghe et al., 2015).

Дупликация генов является центральным генетическим механизмом для создания новых специализированных ферментов, поскольку до тех пор, пока дублированный ген не потерян, он позволяет сохранять старые функции при создании новых возможностей для метаболической диверсификации. Таким образом, дублированные гены могут последовательно вовлекаться в процесс субфункционализации и иметь дополнительную функцию, либо в процесс неофункционализации и приобретать совершенно новую функцию или, наоборот, лишаться какой-либо роли и дефункционализировать. Дупликация происходит тремя способами: tandemным, segmentным и целым геномом, а гены, происходящие из этих процессов, могут расходиться в контроле экспрессии и аминокислотной последовательности, что приводит к новым биохимическим активностям (Moghe et al., 2015). Анализ последовательностей геномов у нескольких видов растений показал, что дупликации генов первичного метаболизма, возникающие в результате tandemного дублирования или дупликации целого генома, имеют разные эволюционные судьбы. Гены, которые участвуют в первичном метаболизме (например, в углеводном, липидном, аминокислотном и нуклеотидном обмене) обычно имеют тенденцию возвращаться к статусу единичной копии как после tandemного

удвоения, так и после удвоения целого генома. Гены вторичного метаболизма при удвоении цельного генома тоже возвращаются к статусу единичной копии, а при локальном удвоении, как правило, становятся гомологами, образуют семейство или генетические кластеры (Chae et al., 2014). Формирование генетических кластеров специализированных биосинтетических путей является важной характеристикой вторичного метаболизма. Часто гены одного биосинтетического пути образуют кластеры, подобные прокариотическим оперонам, с единой регуляцией всей системы. Кластеризация генов отдельных путей вторичного метаболизма открыта относительно недавно и на настоящий момент показана для многих видов растений (Nützmann, Osbourn, 2014). Экспериментально описанные кластеры локализируются в динамических районах хромосом, с высоким содержанием транспозонов и высокой частотой рекомбинации (Field et al., 2011). Предполагается, что кластеры генов вторичного метаболизма не были унаследованы от прокариот, а формировались *de novo* из существующего в геноме растений материала, преимущественно генов первичного метаболизма (Osbourn, 2010). Элементы кластеров возникали в результате тандемных локальных дупликаций отдельных генов и, возможно, их дальнейшей случайной сборки (Schlöpfer et al., 2017). Совместное наследование группы генов, отвечающей за синтез защитных веществ, дает селективное преимущество и закрепляется эволюционно. Высокая частота рекомбинации и активные перестройки хромосомного района локализации кластера способствуют формированию новых выгодных комбинаций генов и пополнению кластеров новыми элементами. Расшировка геномов позволила провести поиск и предсказание кластеров генов путей вторичного метаболизма у многих растений. Она показала, что до половины метаболических генов собраны в кластеры, и формирование кластеров происходит в эволюционно краткие сроки (Schlöpfer et al., 2017; Torpfer et al., 2017). К настоящему времени биосинтетические кластеры варьируются по длине от десятков до сотен тысяч пар оснований и состоят из трех-десяти генов (Nützmann, Osbourn, 2014).

2. Особенности эволюции геномов семейства пасленовых

Эволюция геномов растений семейства пасленовые характеризуется участием большого количества транспозонов (Qin et al., 2014; Bombarely et al., 2016; Xu et al., 2017), а также генов PI-2, кодирующих ингибиторы протеиназ семейства I20, которые способны ингибировать действие сериновых протеиназ, таких как субтилизин, химотрипсин, эластазу, трипсин и оризин (Beekwilder et al., 2000). Кроме того, эволюционные процессы данного семейства многократно формировали такой сложный феномен, как самонесовместимость – редкий пример межвидового отбора, когда невозможность самоопыления исключает инбредную депрессию вида. (Markova et al., 2017). Особенностью метаболизма пасленовых является синтез алкалоидов и стероидных соединений, несвойственных большинству растений. В числе метаболитов пасленовых –

никотин и родственные ему алкалоиды, стероидные гликоалкалоиды и витанолиды, названные так в честь лекарственного индийского растения витания снотворная.

Формирование биосинтетических путей накопления алкалоидов у растений семейства пасленовых происходило в результате дупликаций генов, кодирующих ферменты первичного метаболизма, приводящих к неофункционализации гена, либо вовлечением ферментов первичного метаболизма во вторичный (субфункционализация) и последующей организацией кластеров (Ober, 2005). В последние годы секвенированы геномы дикого картофеля (Li et al., 2018), петунии (Bombarely et al., 2016), перца (Qin et al., 2014), витании (Knoch et al., 2018) с аннотированием генов, реализующих вторичный метаболизм (Aversano et al., 2015; Xu et al., 2017). Геномные данные позволяют проводить филогенетический анализ генов вторичного метаболизма и выявлять события дупликации генов и последующей нео- либо суб- функционализации, либо псевдогенизации и потери функций (D'Amelia et al., 2018; Nagy et al., 2005; Zhang et al., 2015).

Ряд работ, посвященных эволюции пасленовых, свидетельствует о нескольких событиях полногеномной дупликации в этом семействе, имеющем множество полиплоидных видов (Schranz et al., 2012), а также полногеномной трипликации семейства (The Tomato Genome Consortium, 2012).

3. Филогенетическая связь путей биосинтеза холестерина, витанолидов и СГА в метаболизме растений семейства пасленовых

Важной чертой метаболизма пасленовых является накопление холестерина, несвойственное большинству растений. Синтез холестерина у томата и картофеля идет по мевалонатному пути (рис. 1) и относится к первичному метаболизму. Дальнейшие превращения холестерина приводят к синтезу и накоплению вторичных метаболитов – стероидных гликоалкалоидов (Sonawane et al., 2016). Синтез холестерина осуществляется ферментами, привлеченными из конститутивного биосинтетического пути фитостеринов. Часть из них имеет низкую субстратную специфичность, доминирующую в пользу фитостеринов, и обслуживает оба пути, а другая часть генов, возникших в результате дупликации и последующей неофункционализации генов синтеза фитостеринов, принимает участие уже только лишь в синтезе холестерина (см. рис. 1). Упомянутая выше низкая специфичность ферментов позволяет регулировать уровень конститутивных фитостеринов за счет повышения синтеза СГА и не затрагивать работу ферментов первичного метаболизма (Sonawane et al., 2016). Холестерин является ключевым предшественником для многих биоактивных растительных метаболитов растений рода *Solanum* L. В растениях томата и картофеля холестерин является предшественником СГА, синтез которых регулируется семейством *GAME*-генов (от *GlykoAlkaloid MEtabolism*). Большинство генов этого семейства формируют кластеры и коэкспрессируются. Различия биосинтетических путей СГА у томата и картофеля выявляются на финальных стадиях синтеза индивидуальных алкалоидов (Zhu et al., 2018, Hardigan et al., 2017). Гены ферментов биосинтеза СГА присутствуют не только у ядовитых растений,

но и у культурных сортов картофеля и томата, в которых не накапливаются токсичные вещества. Это объясняется тем, что метаболические пути сложны, порой зациклены и имеют множественную регуляцию (Иванова и др., 2018). Решающую роль в регуляции пути накопления алкалоидов играет ген *GAME9*, жасмонат-зависимый транскрипционный фактор группы *AP2/ERF*. Было показано, что данный ген связан с процессом доместикации. Предполагается, что снижение содержания различных токсичных соединений в культурных формах пасленовых обусловлено отбором по гену *GAME9* (Cárdenas et al., 2016).

В метаболизме фитостероидов и холестерина томата и картофеля участвуют 2 гомологичных гена, кодирующих ферменты *SSR1* (редуктаза боковой цепи стерола 1) и *SSR2* (редуктаза боковой цепи стерола 2) (см. рис. 1). *SSR1* участвует в синтезе фитостероидов, *SSR2* – в биосинтезе холестерина (Sonawane et al., 2016). Синтез витонолидов также связан с биосинтетическим путем фитостероидов. Недавно у растений *W. somnifera* был найден ключевой фермент этого синтеза – стерол- Δ^{24} -изомераза (24ISO), также являющийся гомологом *SSR1* и *SSR2*. Ген, кодирующий 24ISO, может считаться геном доместикации витанины, поскольку витонолиды являются классом разнообразных ядовитых соединений, которые традиционно рассматриваются как лекарственные вещества (Knoch et al., 2018). Считается, что витонолиды обладают противовоспалительным и антиканцерогенным действием (Mishra et al., 2000). Почти у всех растений пасленовых, синтезирующих алкалоиды, накапливаются только либо СГА, либо витонолиды. Существует предположение, что синтез витонолидов появляется в течение эволюции у тех пасленовых, вредители которых приобрели резистентность к СГА (Knoch et al., 2018).

4. Происхождение путей биосинтеза алкалоидов табака

Культивируемый табак *Nicotiana tabacum* является аллотетраплоидным растением, образовавшимся, скорее всего, в результате гибридизации двух диплоидных предков *N. sylvestris* Spreg. & Comes и *N. tomentosiformis* L. (Kajikawa et al., 2017). Биосинтез никотина и подобных ему алкалоидов в табаке не связан с мевалонатным путем синтеза холестерина, как у растений томата и картофеля, и имеет ряд уникальных особенностей. Молекула никотина состоит из пиридинового и пирролидинового циклов, которые синтезируются независимо друг от друга и далее объединяются в одну молекулу. Набор структурных генов, кодирующих ферменты путей синтеза двух предшественников молекулы никотина, располагается в разных локусах, но формирует единый регулон, строго контролирующийся жасмонат-опосредованной системой, и регуляторными генами, находящимися в локусе *NICOTINE2* (*NIC2*). Гены ферментов, участвующих в синтезе никотина, являются дублированными паралогами генов первичного метаболизма *NAD* и полиаминов (рис. 2), последовательно встроенными в этот регулон путем субфункционализации и неофункционализации (Kajikawa et al., 2017). Однако время и способ дублирования этих двух путей различаются. Дублирование пути биосинтеза полиаминов (синтез пирролидинового кольца никотина) про-

изошло эволюционно раньше, в результате полногеномной трипликации, а пиридиновая ветвь образовалась позже как результат череды отдельных событий дубликации генов биосинтеза *NAD* (Xu et al., 2017).

Ключевым геном, определяющим этап синтеза пирролидинового кольца, считается ген путресцин-N-метилтрансферазы (*PMT*) (Hibi et al., 1994; Riechers and Timko 1999), произошедший от гена спермидинсинтазы (*SPDS*) и получивший новые свойства после дубликации, то есть в результате неофункционализации (рис. 2). Следующим ферментом этого пути является N-метилпутресцин оксидаза (*MPO*), ген которой произошел от гена диаминооксидазы (*DAO*) во время полногеномной мультипликации. Оба этих гена присутствуют в геномах родов *Nicotiana*, *Solanum* и *Petunia*, что указывает на древность этой дубликации в *Solanaceae* (Xu et al., 2017; Heim et al., 2007; Shoji, Hashimoto, 2008).

Ключевым ферментом биосинтеза пиридинового кольца считается хинолилат фосфорибозилтрансфераза (*QPT2*), ген которой является локально дублированной копией аналогичного гена *QPT1*, принимающего участие в синтезе *NAD*. В отличие от относительно древнего происхождения биосинтеза пирролидинового кольца, удвоение генов пути *NAD*, кодирующих аспартат-оксидазу (*AO*) и фосфорибозилтрансферазу хинолиновой кислоты (*QPT*), ответственных за биосинтез пиридинового кольца, является специфичным для *Nicotiana* (Xu et al., 2017). Ферментами, принимающими участие в объединении колец, предположительно, являются изофлавоноид редуктаза-подобный белок *A622* и фермент *BBL* (berberine bridge enzyme-like) (Kajikawa et al., 2011).

5. Опыт модификации метаболизма алкалоидов табака

Определенный опыт в метаболической инженерии пасленовых накоплен в ряде работ по модификации системы биосинтеза никотина в растениях табака. В таблице представлен список экспериментов по манипуляции экспрессией генов метаболизма алкалоидов *N. tabacum*. Для модификации активности ключевых ферментов биосинтеза никотина использовали феномен РНК-интерференции, который заключается в том, что трансгенная экспрессия антисмысловых или двухцепочечных РНК приводит к супрессии целевого гена и снижению содержания его продукта. Супрессии подвергались гены, кодирующие ключевые ферменты разных стадий синтеза никотина. Во всех экспериментах наблюдалось снижение уровня никотина, а также, в некоторых случаях, накопление минорных алкалоидов, синтезирующихся из общих предшественников (рис. 2). При подавлении генов семейства *PMT* наблюдался эффект нарушения роста и развития растений.

6. Жасмоновая регуляция метаболизма алкалоидов семейства пасленовые

Жасмоновая кислота и ее производные – жасмонаты, отвечают в растениях за регуляцию ответа на стресс, как абиотический, так и биотический. Известно, что каскады жасмоновой системы регуляции действуют через белок, принадлежащий F-box системе – *CORONATINE*

INSENSITIVE 1 (COI1), который формирует E3 убиквитин-лигазный комплекс, что приводит к протеолизу транскрипционных репрессоров, называемых JAZ (JAsmonate ZIM domain). Деградация JAZ приводит к активации транскрипционных факторов и их мишеней (Abdelkareem et al., 2017). Многочисленные последние исследования показывают, что регуляцию метаболизма алкалоидов пасленовых выполняют транскрипционные факторы, принадлежащие жасмоновой системе. Также было установлено, что гены, кодирующие эти транскрипционные факторы в метаболизме картофеля, томата и табака – гомологи, и тоже образуют кластеры. Эти гомологи являются транскрипционными факторами, принадлежащими к группе

APETALA2/ERF транскрипционных факторов подсемейства ERF IXa (Zhou and Memelink, 2016). В растениях картофеля и томата эту регуляторную функцию выполняет ген *GAME9* (см. рис. 1). В работе Yangping Li с соавторами (2018) показано высокое разнообразие аллелей *GAME9* у диких родственников картофеля, в то время как domestцированные формы обладают малым числом аллелей этого гена. Феномен локального снижения разнообразия является индикатором отбора по данному локусу и свидетельствует в пользу того, что ген *GAME9* является геном domestцикации, определяющим уровень токсичности. Ген *GAME9* вместе с другими подобными ему генами транскрипционных факторов локализован в пределах кластера, названного QTL1 (Cárdenas et al., 2016).

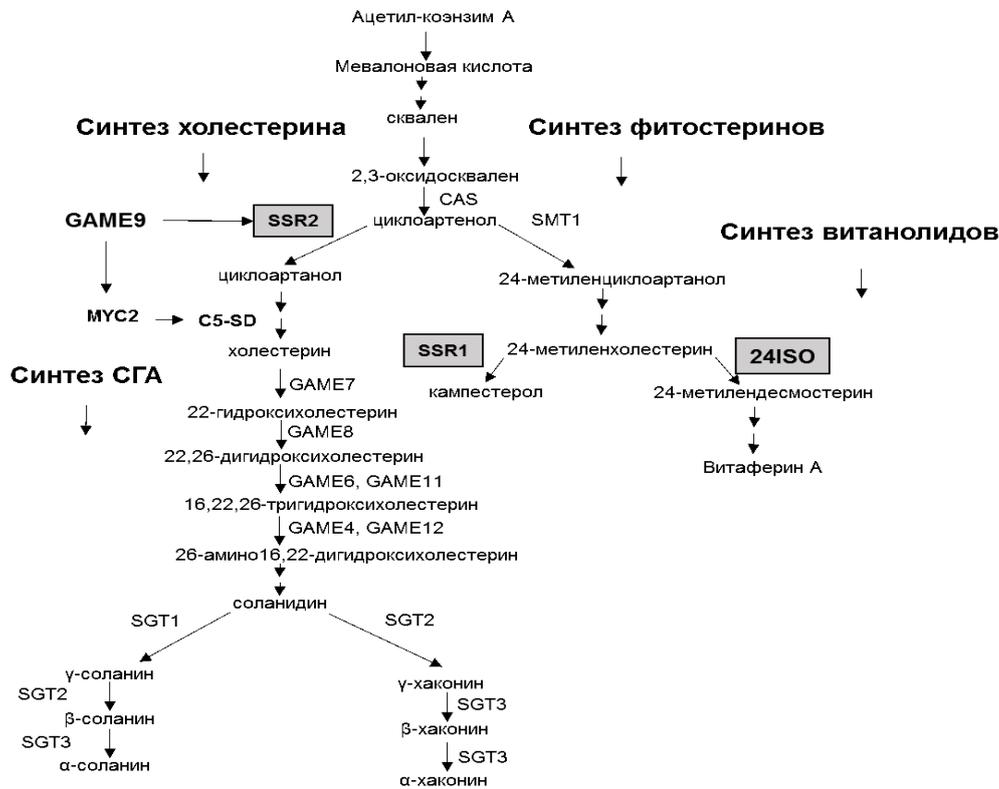


Рис. 1. Схема биосинтеза фитостероидов, холестерина, СГА и витанолидов.

GAME9 – транскрипционный фактор типа AP2/ERF; гомологи отмечены рамкой: 24ISO – стерол- Δ^{24} -изомераза; SSR1 – редуктаза боковой цепи стерола 1; SSR2 – редуктаза боковой цепи стерола 2; CAS – циклоартенол-синтаза, SMT1 – стерол C24-метилтрансфераза, C5-SD – стерол C-5 (6) десагураза, MYC2 – транскрипционный фактор, *GAME7* – C22-гидроксилаза, *GAME8* – C26-гидроксилаза, *GAME6* – C16-гидроксилаза, *GAME11* – 2-оксиглутаратзависимая диоксигеназа, *GAME4* – цитохром P450 88D, *GAME12* – трансаминаза, SGT1 – галактозилтрансфераза, SGT2 – глюкозилтрансфераза, SGT3 – рамнозилтрансфераза

Fig. 1. Scheme of the biosynthesis of phyosterols, cholesterol, SGAs (steroidal glycoalkaloids) and vitanolides.

GAME9 – AP2/ERF type transcription factor; homologs marked with frame: 24ISO –sterol- Δ^{24} -isomerase; SSR1 – side chain sterolreductase 1; SSR2 – side chain sterolreductase 2; CAS - cycloartenol synthase, SMT1 – sterol C24-methyltransferase, C5-SD – sterol C-5 (6) desaturase, MYC2 – transcription factor, *GAME7* – C22-hydroxylase, *GAME8* – C26-hydroxylase, *GAME6* – C16-hydroxylase, *GAME11* – 2-oxyglutarate dioxigenase, *GAME4* – cytochrome P450 88D, *GAME12* – transaminase, SGT1 – galactosyltransferase, SGT2 – glucosyltransferase, SGT3 – rhamnosyltransferase.

В растениях табака контроль синтеза никотина осуществляют гены, находящиеся в двух локусах – NICOTINE1 и NICOTINE2 (NIC1 и NIC2). Показано, что гены *ERF189* и *ERF199* находятся в локусе NIC2 вместе с семью подобными генами, они организованы в кластер и

являются гомологами *GAME9*. Транскрипционная регуляция посредством ERF и координирующее действие транскрипционных факторов MYC2 подтверждается частым появлением родственных цис-регуляторных элементов этих факторов в промоторных областях нижестоящих

структурных генов (Kajikawa et al., 2017). Подтверждением регуляторной роли генов *ERF189* и *ERF199* является

то, что в геноме линий табака с низким накоплением никотина и его производных присутствует делеция всего кластера генов *ERF* (Cárdenas et al., 2016).

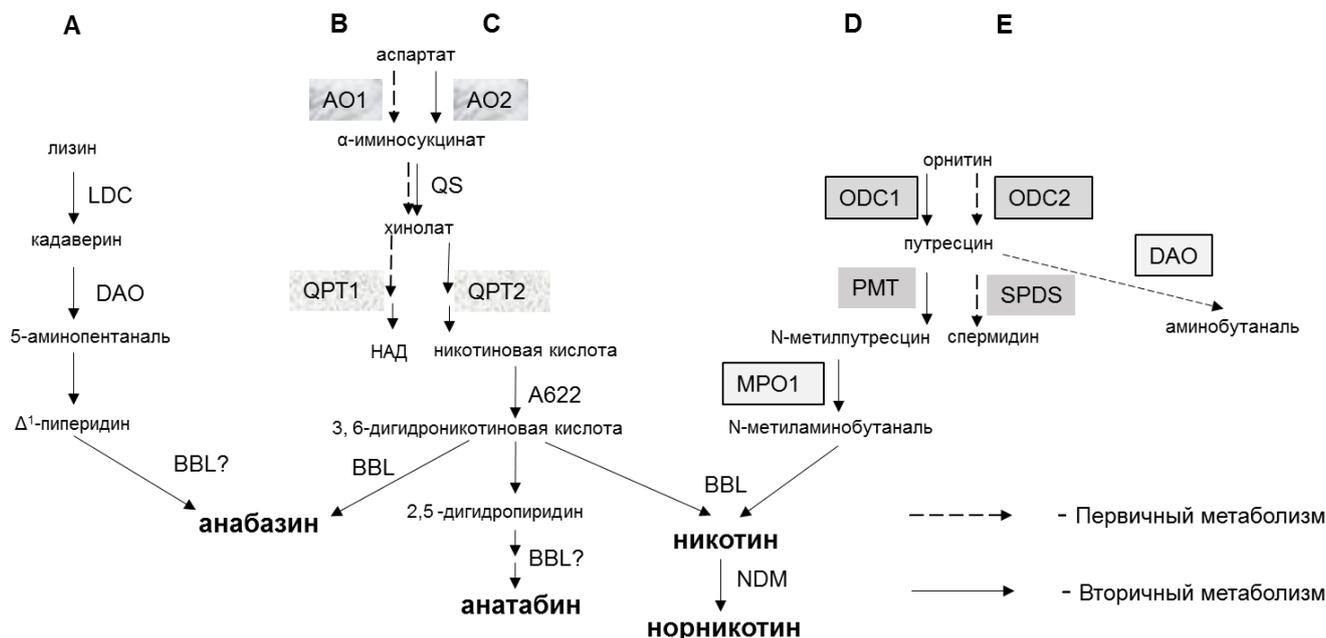


Рис. 2. Модель биосинтеза никотина, по Lewis et al., 2015.

A – предполагаемый синтез анабазина; B – синтез NAD; C – синтез пиридинового кольца никотина; D – синтез пирролидинового кольца никотина; E – синтез полиаминов. LDC – лизиндекарбоксилаза; DAO – диаминооксидаза; BBL – berberine bridge enzyme-like (нет аналога на русском); AO1 и AO2 – аспаргатаксидаза 1 и 2 (гомологи); QS – хинолатсинтаза; QPT1 и QPT2 – хинолилат фосфорибозилтрансфераза 1 и 2 (гомологи); A622 – изофлавоноредуктазоподобный белок; NDM – никотиндеметилаза; MPO1 – метилпуресцинооксидаза 1; PMT – путресцин метилтрансфераза; SPDS – спермидинсинтаза; ODC1 и ODC2 – орнитиндекарбоксилаза 1 и 2 (гомологи).

Fig. 2. Nicotine biosynthesis model, according to Lewis et al., 2015.

A – putative synthesis of anabasin; B – synthesis of NAD; C – synthesis of the pyridine ring of nicotine; 4 D – synthesis of the pyrrolidine ring of nicotine; E – polyamine synthesis. LDC-lysine decarboxylase; DAO – diamine oxidase; BBL-berberine bridge enzyme-like; AO1 and AO2 – aspartate oxidase 1 and 2 (homologues); QS – quinolate synthase; QPT1 and QPT2 – quinolinate phosphoribosyltransferase 1 and 2 (homologs); A622 – isoflavone reductase-like protein; NDM – nicotine demethylase; MPO1 – methylputrescine oxidase 1; PMT – putrescine methyltransferase; SPDS – spermidine synthase; ODC1 and ODC2 – ornithine decarboxylase 1 and 2 (homologs).

Возможные стратегии генетических модификаций для снижения токсичности пасленовых

Современные методы биотехнологии позволяют вносить направленные изменения в геном и манипулировать молекулярными процессами, происходящими в клетках растений. Быстрый прогресс в редактировании генома стал возможен благодаря открытию нуклеаз, которые создают двуниевые разрывы в целевых участках ДНК (Gerasimova et al., 2017). Система методов на основе РНК-направленных нуклеаз (CRISPR/Cas) в последние годы широко используется для улучшения отдельных свойств культурных растений (Korotkova et al., 2017). Применение этой системы для снижения токсичности растений семейства пасленовых может позволить достичь стойкого наследуемого эффекта и получить стабильные линии и сорта, которые далее могут быть использованы в селекции и производстве. Арсенал методов геномной инженерии включает в себя нокаут отдельных генов, редактирование регуляторных районов генов и изменение паттерна их экспрессии, точные

модификации кодирующей последовательности с изменением функций, большие делеции районов хромосом (Gerasimova et al., 2017). Весь этот арсенал можно использовать для метаболической инженерии семейства пасленовых. Нокаут генов отдельных ферментов метаболических путей может направить метаболизм растений по альтернативному пути или прервать цепочку химических превращений. В качестве генов-мишеней для снижения токсичности диких видов картофеля можно рассматривать гены гликозилаз *SGT* (McCue et al., 2006, 2007, 2009, 2017), находящиеся в конце пути синтеза СГА (см. рис. 1). При нокауте этих генов не будут затронуты жизненно важные синтетические пути. Понижение функции *GAME8* (*pga1*) и *GAME6* (*pga2*) (см. рис. 1) картофеля при помощи РНК-интерференции приводит к снижению содержания СГА более чем в 10 раз и повышению содержания субстратов этих ферментов. При их деактивации растения характеризовались нормальным вегетативным ростом и клубнеобразованием, но отличались стерильностью по мужскому типу. Кроме того, было показано, что клубни трансгенных растений не прорастали при хранении

на воздухе или в воде, но прорастали при хранении в почве, а также в питательной среде, что дает основания судить о плейотропном эффекте модификации этих генов (Umamoto et al., 2016). Схожую картину наблюдали при супрессии *GAME11* (*2ODG* – 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase), однако растения со сниженной функцией этого гена оставались фертильными, что дает основания рассматривать ген *GAME11* как кандидат для направленной модификации с целью снижения токсичности диких форм картофеля. Для снижения накопления никотина в листьях табака можно рассмотреть варианты нокаута ключевых генов синтеза никотина (*PMT*, *QPT*, *BBL*), а также генов транспортеров

никотина, поскольку в листьях никотин накапливается за счёт транспорта из корня, а не синтеза *in situ*. Однако, нацеливаясь на структурные гены вторичного метаболизма, можно столкнуться с проблемой нарушения первичного метаболизма и снижения жизнеспособности из-за индукции мутаций в гомологичных генах. Наиболее привлекательными мишенями для модификации метаболизма никотина являются гены *A622* и *BBL*, так как они участвуют в объединении пиридинового и пирролидинового колец и не затрагивают первичный метаболизм (Kajikawa et al., 2009, 2011).

Таблица. Модификации метаболизма алкалоидов табака при помощи супрессии отдельных структурных генов
Table. Modifications of the tobacco alkaloids metabolism via RNA-mediated gene suppression

Фермент Enzyme	Функция гена Gene Function	Результат Result	Источник Source
Путресцин N-метилтрансфераза (PMT)	Первая стадия синтеза пирролидинового кольца никотина	Снижение содержания никотина, аномалии листьев и соцветий; резкое увеличение уровней анатабина	Chintapakorn, Hamill, 2003; Wang et al., 2008; Wang et al., 2009
N-метилпутресциноксидаза (MPO)	Катализирует вторую стадию биосинтеза пирролидинового кольца, окислительное дезаминирование N-метилпутресцина с образованием 4-метиламинобутанала	Анатабин стал преобладающим алкалоидом за счет уменьшения содержания никотина	Shoji, Hashimoto, 2008
Хинолинат фосфорибозилтрансфераза (QPT)	Катализирует точку входа в путь биосинтеза никотинамидадениндинуклеотида (NAD), в котором никотиновая кислота является промежуточным продуктом	Снижение уровня никотина	Xie et al., 2004
Редуктаза (A622)	Участвует в поздних стадиях биосинтеза никотина	Уменьшение синтеза никотина, накопление b-N гликозида никотиновой кислоты	Deboer et al., 2009
Berberine bridge enzyme-like (BBL)	Флавиносодержащая оксидаза, предположительно участвующая в заключительной стадии окисления для синтеза никотина	Фенотип со сниженным содержанием никотина, накопление нового метаболита, идентифицированного как дигидрометанникотин (DMN) в корнях табака	Kajikawa et al., 2011

Перспективным подходом к снижению токсичности может быть индукция протяженной делеции всего кластера регуляторных генов синтеза алкалоидов. Для картофеля можно рассмотреть возможность делеции кластера, находящегося в QTL1 хромосомы 1, для табака – делеции кластера *NIC2*. Показано, что гены, локализованные в этих кластерах, играют ключевую роль в синтезе алкалоидов (Cárdenas et al., 2016).

Изменение регуляции всего пути синтеза токсических веществ может оказаться наиболее эффективным подходом, поскольку такая модификация в наименьшей степени нарушит сами структурные функции генов и ферментов и, как следствие, в наименьшей степени скажется на жизнеспособности и развитии растения. Предполагается, что снижение токсичности культурных форм картофеля и томата по сравнению с дикими формами было достигнуто за счет отбора растений с определенными аллелями основного регулятора этого пути – транскрипционного фактора типа AP2/ERF (*GAME9*). Модификация или нокаут транскрипционных факторов, регулирующих накопление токсичных веществ, может позволить расширить понимание

регуляции вторичного метаболизма и оказаться эффективным способом модификации уровня токсичности ценных растений.

Заключение

Возможности методов редактирования геномов позволяют ставить задачи, связанные с модификацией важнейших хозяйственных признаков растений и приданием растениям новых свойств, расширяющих область их применения. В случае модификации метаболизма возникает проблема сложной геномной организации его контроля, обилия гомологичных генов первичного метаболизма, а также дублированных копий генов, функции которых неизвестны или описаны только частично. Вмешательство в систему регуляции метаболизма может привести к непредсказуемым последствиям, однако именно геномное редактирование открывает пути к детальному исследованию функций каждого гена и разработки схем точной настройки метаболизма под конкретные задачи. Метаболизм пасленовых является одной из наиболее хорошо охарактеризованных биохимических систем растений, а

накопленные за последние годы данные о структуре геномов позволяют точно спланировать эксперимент по геномному редактированию и нацелиться на отдельные копии конкретных генов. Дополнительным преимуществом пасленовых как объекта для метаболической инженерии является их сравнительно простое культивирование *in vitro* и богатый опыт выращивания в сельском хозяйстве. Используя метаболизм пасленовых как модель, можно в обозримые сроки получить ряд ценных фундаментальных результатов, позволяющих реконструировать механизм

генетического контроля биосинтетических процессов растений и связи первичного метаболизма со вторичным. Модификация отдельных генов, регулирующих биосинтез алкалоидов у табака и картофеля, позволит создать новые линии растений, обладающие желаемыми свойствами, и предложить стратегии по модификации метаболизма у других ценных культур.

Благодарности: исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 18-416-543004.

References/Литература

- Abdelkareem A. *et al.* Jasmonate-induced biosynthesis of steroidal glycoalkaloids depends on COI1 proteins in tomato // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017. Vol. 489, № 2. P. 206–210.
- Aharoni A., Galili G. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface // *Current Opinion in Biotechnology*. 2011. Vol. 22, № 2. P. 239–244. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.11.004
- Aversano R. *et al.* The *Solanum commersonii* Genome Sequence Provides Insights into Adaptation to Stress Conditions and Genome Evolution of Wild Potato Relatives // *The Plant Cell*. 2015. Vol. 27, № 4. P. 954–968. DOI: 10.1105/tpc.114.135954
- Beekwilder J. *et al.* Characterization of potato proteinase inhibitor II reactive site mutants // *Eur. J. Biochem*. 2000. Vol. 267, № 7. P. 1975–1984.
- Boer K.D. *et al.* APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR and basic helix–loop–helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis // *The Plant Journal*. 2011. Vol. 66, № 6. P. 1053–1065. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04566.x
- Bombarely A. *et al.* Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida* // *Nature Plants*. 2016. Vol. 2, № 6. P. 16074. DOI: 10.1038/nplants.2016.74
- Cárdenas P.D. *et al.* GAME9 regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway // *Nat Commun*. 2016. Vol. 7. P. 10654. DOI: 10.1038/ncomms10654
- Chae L. *et al.* Genomic Signatures of Specialized Metabolism in Plants // *Science*. 2014. Vol. 344, № 6183. P. 510–513. DOI: 10.1126/science.1252076
- Chintapakorn Y., Hamill J.D. Antisense-mediated down-regulation of putrescine N-methyltransferase activity in transgenic *Nicotiana tabacum* L. can lead to elevated levels of anatabine at the expense of nicotine // *Plant Mol. Biol*. 2003. Vol. 53, № 1–2. P. 87–105. DOI: 10.1023/B:PLAN.0000009268.45851.95
- Chu H.Y., Wegel E., Osbourn A. From hormones to secondary metabolism: the emergence of metabolic gene clusters in plants // *The Plant Journal*. 2011. Vol. 66, № 1. P. 66–79. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04503.x
- D’Amelia V. *et al.* Subfunctionalization of duplicate MYB genes in *Solanum commersonii* generated the cold-induced ScAN2 and the anthocyanin regulator ScAN1 // *Plant Cell Environ*. 2018. Vol. 41, № 5. P. 1038–1051. DOI: 10.1111/pce.12966
- Deboer K.D. *et al.* The A622 gene in *Nicotiana glauca* (tree tobacco): evidence for a functional role in pyridine alkaloid synthesis // *Plant Mol. Biol*. 2009. Vol. 69, № 3. P. 299–312. DOI: 10.1007/s11103-008-9425-2
- Field B. *et al.* Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions // *PNAS*. 2011. Vol. 108, № 38. P. 16116–16121. DOI: 10.1073/pnas.1109273108
- Freeling M., Thomas B.C. Gene-balanced duplications, like tetraploidy, provide predictable drive to increase morphological complexity // *Genome Res*. 2006. Vol. 16, № 7. P. 805–814. DOI: 10.1101/gr.3681406
- Gerasimova S.V. *et al.* Genome editing system CRISPR/CAS9 and peculiarities of its application in monocots // *Russ J Plant Physiol*. 2017. Vol. 64, № 2. P. 141–155. DOI: 10.1134/S1021443717010071
- Goossens J. *et al.* Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses // *Plant Mol Biol*. 2016. Vol. 91, № 6. P. 673–689. DOI: 10.1007/s11103-016-0480-9
- Hardigan M.A. *et al.* Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato // *PNAS*. 2017. Vol. 114, № 46. P. E9999–E10008. DOI: 10.1073/pnas.1714380114
- Heim W.G. *et al.* Cloning and characterization of a *Nicotiana tabacum* methylputrescine oxidase transcript // *Phytochemistry*. 2007. Vol. 68, № 4. P. 454–463. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.11.003
- Hibi N. *et al.* Gene expression in tobacco low-nicotine mutants // *Plant Cell*. 1994. Vol. 6, № 5. P. 723–735. DOI: 10.1105/tpc.6.5.723
- Ivanova K.A., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. The Biosynthesis Regulation of Potato Steroidal Glycoalkaloids // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018. Vol. 22, № 1. P. 25–34. DOI: 10.18699/VJ18.328
- Kajikawa M. *et al.* Genomic Insights into the Evolution of the Nicotine Biosynthesis Pathway in Tobacco // *Plant Physiol*. 2017. Vol. 174, № 2. P. 999–1011. DOI: 10.18699/VJ18.328
- Kajikawa M. *et al.* Vacuole-Localized Berberine Bridge Enzyme-Like Proteins Are Required for a Late Step of Nicotine Biosynthesis in Tobacco1[C][W] // *Plant Physiol*. 2011. Vol. 155, № 4. P. 2010–2022. DOI: 10.1104/pp.110.170878
- Kajikawa M., Hirai N., Hashimoto T. A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids // *Plant Mol. Biol*. 2009. Vol. 69, № 3. P. 287–298. DOI: 10.1007/s11103-008-9424-3
- Knoch E. *et al.* Third DWF1 paralog in Solanaceae, sterol $\Delta 24$ -isomerase, branches withanolide biosynthesis from the general phytosterol pathway // *PNAS*. 2018. P. 201807482. DOI: 10.1073/pnas.1807482115
- Korotkova A.M. *et al.* Crop genes modified using the CRISPR/Cas system // *Russ J Genet Appl Res*. 2017. Vol. 7, № 8. P. 822–832. DOI: 10.1134/S2079059717050124
- Kumar A. *et al.* Lanosterol synthase-like is involved with differential accumulation of steroidal glycoalkaloids in potato // *Planta*. 2017. Vol. 246, № 6. P. 1189–1202. DOI: 10.1007/s00425-017-2763-z
- Lewis R.S. *et al.* Transgenic and Mutation-Based Suppression of a Berberine Bridge Enzyme-Like (BBL) Gene Family Reduces Alkaloid Content in Field-Grown Tobacco // *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10, № 2. P. e0117273. DOI:10.1371/journal.pone.0117273
- Li Y. *et al.* Genomic Analyses Yield Markers for Identifying Agronomically Important Genes in Potato // *Molecular Plant*. 2018. Vol. 11, № 3. P. 473–484. DOI: 10.1016/j.molp.2018.01.009
- Markova D.N. *et al.* Evolutionary history of two pollen self-incompatibility factors reveals alternate routes to self-compatibility within *Solanum* // *Am. J. Bot*. 2017. Vol. 104, № 12. P. 1904–1919. DOI: 10.3732/ajb.1700196
- Matsuura H.N., Fett-Neto A.G. Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action // *Plant Toxins*. – Springer, Dordrecht. 2017. – P. 243–261. DOI 10.1007/978-94-007-6728-7_2-1

- McCue K.F. et al.* Modification of potato steroidal glycoalkaloids with silencing RNA constructs // *Am. J. Potato Res.* 2018. Vol. 95, №1. P. 9-14. DOI: 10.1007/s12230-017-9609-x
- McCue K.F. et al.* Potato glycoalkaloid rhamnosyltransferase, the terminal step in triose side-chain biosynthesis // *Phytochemistry*. 2007. Vol. 68, № 3. P. 327–334. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.10.025
- McCue K.F. et al.* The primary in vivo steroidal alkaloid glucosyltransferase from potato // *Phytochemistry*. 2006. Vol. 67, № 15. P. 1590–1597. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.09.037
- McCue K.F.* Potato glycoalkaloids, past present and future. *Fruit Veget. Cereal Sci. Biotechn.* 2009. Vol. 3, №1. P. 65-71.
- Mishra L.C., Singh B.B., Dagenais S.* Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review // *Altern Med Rev.* 2000. Vol. 5, № 4. P. 334–346.
- Moghe G.D. et al.* Consequences of Whole-Genome Triplication as Revealed by Comparative Genomic Analyses of the Wild Radish *Raphanus raphanistrum* and Three Other Brassicaceae Species // *The Plant Cell*. 2014. Vol. 26, № 5. P. 1925–1937. DOI: 10.1105/tpc.114.124297
- Moghe G.D., Last R.L.* Something Old, Something New: Conserved Enzymes and the Evolution of Novelty in Plant Specialized Metabolism // *Plant Physiology*. 2015. Vol. 169, № 3. P. 1512–1523. DOI: 10.1104/pp.15.00994
- Nagy R. et al.* The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species // *Plant J.* 2005. Vol. 42, № 2. P. 236–250. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02364.x
- Nakayasu M. et al.* A Dioxygenase Catalyzes Steroid 16 α -Hydroxylation in Steroidal Glycoalkaloid Biosynthesis1 // *Plant Physiol.* 2017. Vol. 175, № 1. P. 120–133. DOI: 10.1104/pp.17.00501
- Nützmann H.-W., Osbourn A.* Gene clustering in plant specialized metabolism // *Current Opinion in Biotechnology*. 2014. Vol. 26. P. 91–99. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.10.009
- Ober D.* Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism // *Trends Plant Sci.* 2005. Vol. 10, № 9. P. 444–449. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.07.007
- Osborn A.* Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation // *Trends in Genetics*. 2010. Vol. 26, № 10. P. 449–457. DOI: 10.1016/j.tig.2010.07.001
- Patra B. et al.* Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. Vol. 1829, № 11. P. 1236–1247. DOI: 10.1016/j.bbagr.2013.09.006
- Qin C. et al.* Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into Capsicum domestication and specialization // *PNAS*. 2014. Vol. 111, № 14. P. 5135–5140. DOI: 10.1073/pnas.1400975111
- Riechers D.E., Timko M.P.* Structure and expression of the gene family encoding putrescine N-methyltransferase in *Nicotiana tabacum*: new clues to the evolutionary origin of cultivated tobacco // *Plant Mol. Biol.* 1999. Vol. 41, № 3. P. 387–401.
- Schläpfer P. et al.* Genome-Wide Prediction of Metabolic Enzymes, Pathways, and Gene Clusters in Plants // *Plant Physiol.* 2017. Vol. 173, № 4. P. 2041–2059. DOI: 10.1104/pp.16.01942
- Schranz M.E., Mohammadin S., Edger P.P.* Ancient whole genome duplications, novelty and diversification: the WGD Radiation Lag-Time Model // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012. Vol. 15, № 2. P. 147–153. DOI: 10.1016/j.pbi.2012.03.011
- Shoji T., Hashimoto T.* Tobacco MYC2 Regulates Jasmonate-Inducible Nicotine Biosynthesis Genes Directly and By Way of the NIC2-Locus ERF Genes // *Plant Cell Physiol.* 2011. Vol. 52, № 6. P. 1117–1130. DOI: 10.1093/pcp/pcr063
- Shoji T., Hashimoto T.* Why does anatabine, but not nicotine, accumulate in jasmonate-elicited cultured tobacco BY-2 cells? // *Plant Cell Physiol.* 2008. Vol. 49, № 8. P. 1209–1216. DOI: 10.1093/pcp/pcn096
- Sonawane P.D. et al.* Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism // *Nat Plants*. 2016. Vol. 3. P. 16205. DOI: 10.1038/nplants.2016.205
- The Tomato Genome Consortium.* The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution // *Nature*. 2012. Vol. 485, № 7400. P. 635–641. DOI: 10.1038/nature11119
- Töpfer N., Fuchs L.-M., Aharoni A.* The PhytoClust tool for metabolic gene clusters discovery in plant genomes // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 12. P. 7049–7063. DOI: 10.1093/nar/gkx404
- Umemoto N. et al.* Two Cytochrome P450 Monooxygenases Catalyze Early Hydroxylation Steps in the Potato Steroid Glycoalkaloid Biosynthetic Pathway // *Plant Physiol.* 2016. Vol. 171, № 4. P. 2458–2467. DOI 10.1104/pp.16.00137.
- Wang P. et al.* Generation of tobacco lines with widely different reduction in nicotine levels via RNA silencing approaches // *J. Biosci.* 2008. Vol. 33, № 2. P. 177–184.
- Wang P. et al.* Silencing of PMT expression caused a surge of anatabine accumulation in tobacco // *Mol. Biol. Rep.* 2009. Vol. 36, № 8. P. 2285–2289. DOI: 10.1007/s11033-009-9446-1
- Xie J. et al.* Biotechnology: A tool for reduced risk tobacco products - The nicotine experience from test tube to cigarette pack // *Rev Adv Tob Sci.* 2004. Vol. 30. P. 17–37.
- Xu S. et al.* Wild tobacco genomes reveal the evolution of nicotine biosynthesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. Vol. 114, № 23. P. 6133–6138. DOI: 10.1073/pnas.1700073114
- Zhang H.-B. et al.* Tobacco Transcription Factors NtMYC2a and NtMYC2b Form Nuclear Complexes with the NtJAZ1 Repressor and Regulate Multiple Jasmonate-Inducible Steps in Nicotine Biosynthesis // *Molecular Plant*. 2012. Vol. 5, № 1. P. 73–84. DOI: 10.1093/mp/ssr056
- Zhang S. et al.* Distinct subfunctionalization and neofunctionalization of the B-class MADS-box genes in *Physalis floridana* // *Planta*. 2015. Vol. 241, № 2. P. 387–402. DOI: 10.1007/s00425-014-2190-3
- Zhou M., Memelink J.* Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism // *Biotechnology Advances*. 2016. Vol. 34, № 4. P. 441–449. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.02.004
- Zhu G. et al.* Rewiring of the Fruit Metabolome in Tomato Breeding // *Cell*. 2018. Vol. 172, № 1–2. P. 249-261.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2017.12.019

ОБРАЗЦЫ ЯГОДНЫХ И ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР И ИХ ДИКОРАСТУЩИХ РОДИЧЕЙ В КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* ВИР

Дунаева С. Е., Орлова С. Ю., Тихонова О. А., Гавриленко Т. А.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42, 44 e-mail: dunaevase@mail.ru

IN VITRO COLLECTION OF BERRY AND FRUIT CROPS AND THEIR WILD RELATIVES AT VIR

Dunaeva S. E., Orlova S. Yu., Tikhonova O. A., Gavrilenko T. A.

N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42–44, Bolshaya Morskaya St., St. Petersburg, 190000, Russia; e-mail: dunaevase@mail.ru

Актуальность. Проблема сбора и сохранения *ex situ* генетических ресурсов растений (ГРР) приобретает особую актуальность в связи с сокращением генетического разнообразия. Образцы вегетативно размножаемых культурных растений обычно сохраняются в полевых генбанках. В качестве дублетных создаются коллекции защищенного грунта, *in vitro* коллекции среднесрочного хранения и криоколлекции длительного хранения образцов. Гарантированное *ex situ* сохранение генетических ресурсов вегетативно размножаемых растений обеспечивает наличие всех типов коллекций. Стратегия формирования *in vitro* коллекции ягодных и плодовых культур умеренного климата в ВИР заключается в сохранении отечественного селекционного материала, включающего сорта стародавней и народной селекции, современные сорта и гибриды, а также образцы дикорастущих родичей (включая эндемики), собранных в основном на территории РФ. Коллекция *in vitro* также включает зарубежные сорта – источники ценных признаков. В генетических банках других стран такой материал отсутствует или представлен фрагментарно. **Материалы и методы.** Для введения в культуру *in vitro* использовали образцы из полевой коллекции (УНУ, регистрационный USU_505851; Коллекции генетических ресурсов растений ВИР НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» и филиала Майкопская опытная станция ВИР), экспедиционных сборов ВИР и других учреждений. Все этапы работы по введению растительного материала в культуру *in vitro*, поддержанию образцов в коллекции активного роста и среднесрочного хранения микрорастений проводятся в соответствии с Методическими указаниями отдела биотехнологии ВИР (2017). **Результаты и заключение.** В настоящее время *in vitro* коллекция ягодных и плодовых культур ВИР включает 330 образцов малины, ежевики, жимолости, земляники, вишни, сливы, рябины, смородины черной; из них 236 сортов, 14 гибридных форм и 80 образцов дикорастущих родичей, из которых 68 собраны на территории РФ и ближнего зарубежья. В настоящее время *in vitro* коллекция ВИР является одной из наиболее крупных в системе европейских и азиатских генетических банков, сохраняющих образцы ягодных и плодовых культур умеренного климата. Образцы *in vitro* коллекции ВИР используются для дублетного сохранения образцов полевого генбанка, разработки методов оздоровления микрорастений от вирусных инфекций; генотипирования; изучения физиолого-биохимических процессов, происходящих в микрорастениях при среднесрочном хранении; для разработки методов криоконсервации и создания криоколлекций; в морфобиологическом изучении *ex vitro* растений.

Ключевые слова: генетические ресурсы растений, *in vitro* коллекции, ягодные и плодовые культуры, дикорастущие родичи.

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.
Конфликт интересов отсутствует

Дунаева С.Е., Орлова С.Ю., Тихонова О.А., Гавриленко Т.А. Образцы ягодных и плодовых культур и их дикорастущих родичей в коллекции *in vitro* ВИР. Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):43-51. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-43-51

Dunaeva S. E., Orlova S. Yu., Tikhonova O. A., Gavrilenko T. A. In vitro collection of berry and fruit crops and their wild relatives at VIR. Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):43-51. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-43-51

Background. The problem of *ex situ* conservation of plant genetic resources (PGR) is particularly relevant due to the decreasing of their genetic diversity. Accessions of vegetatively propagated crops are usually preserved in field genebanks. *In vitro* collections for medium-term storage and cryo collections for long-term storage are established as duplicate collections. Safe *ex situ* conservation of PGR is ensured by the existence of all three types of collections. The strategy of building up an *in vitro* collection of berry and fruit crops at VIR is based on the need to preserve domestic cultivars, local varieties and, primarily, landraces as well as accessions of crop wild relatives collected mainly in the Russian Federation and adjacent countries. Such genetic material is sparse or completely absent in the genebanks of other countries. **Materials and methods.** Accessions from the field genebanks maintained at VIR's experiment stations in Pavlovsk and Maikop, samples obtained by collecting teams launched by VIR and other institutions were used to initiate *in vitro* culture. All procedures to preserve various fruit and berry germplasm *in vitro* at VIR in the state of active growth and under medium-term storage conditions have been carried out according to the protocols presented in the Methodological Guidelines of VIR's Department of Biotechnology. **Results and conclusion.** Currently, the *in vitro* collection of berry and fruit crops at VIR holds 330 accessions of raspberry, blackberry, honeysuckle, strawberry, stone fruit plants (cherry, plum), mountain ash, and black currant, including 236 cultivars, 14 hybrids and 80 accessions of crop wild relatives, 68 of which were collected in the Russian Federation and neighboring countries. At present, VIR's *in vitro* collection is one of the largest in the network of European and Asian genebanks that preserve accessions of berry and fruit plants cultivated under temperate climate conditions. Germplasm from the *in vitro* collection is used for various purposes: to develop virus eradication techniques; for genotyping; to study physiological and biochemical processes occurring in micro-plants under medium term storage; for the development of cryopreservation methods and for establishment of cryo collections; in morphobiological studies of *ex vitro* plants, etc.

Key words: plant genetic resources, *in vitro* collections, berry and fruit crops, wild relatives.

УДК 634.2 634.7. 634.23:581.17
Поступила в редакцию 07.09.2018
Принята к публикации 08.11.2018

В генетических банках растений вегетативно размножаемые культуры сохраняются преимущественно в полевых коллекциях. В зависимости от требований конкретной культуры и климатической зоны для исходной коллекции могут использоваться парники, теплицы и защитные сооружения (screenhouses) (Jahn, Westwood, 1982). Программы сохранения биоразнообразия ягодных и плодовых культур в основном ориентируются на полевые генбанки – сады клонового растительного материала (Panis, Lambardi, 2005). Полевые коллекции позволяют изучать образцы в течение всего вегетационного периода, проводить с ними селекционную работу, оценивать и регулярно контролировать фенотипический ответ растений на действие биотических и абиотических стрессоров. Однако существуют проблемы, ограничивающие возможности сохранения генетических ресурсов растений (ГРР) в полевых коллекциях. К их числу относятся: необходимость значительных финансовых вложений в виде земли, труда, техники для создания и поддержки полевых генбанков, периодических фитосанитарных обработок растений и обновлений садов. Кроме того, существует вероятность потери образцов из-за воздействий патогенов, вредителей, экстремальных абиотических факторов (Engelmann, Engels, 2002). С целью дублирования образцов ягодных и плодовых культур и обеспечения их сохранности в контролируемых условиях среды создаются *in vitro* и криоколлекции.

В ведущих мировых генбанках в условиях *in vitro* сохраняются дублетные образцы *core* коллекций, а также образцы, подверженные повышенному риску потерь. Основные преимущества *in vitro* коллекций заключаются в их компактности, возможностях оздоровления микрорастений от вирусных инфекций, массового круглогодичного микроклонального размножения образцов и возможности передачи пробирочных растений в другие учреждения в соответствии с карантинными допусками (Reed et al., 2004; Gavrilenko et al., 2007; FAO, 2014, Cruz-Cruz et al., 2013).

Однако *in vitro* коллекции не являются идеальными для длительного хранения образцов, поскольку цикл микроклонального размножения необходимо периодически прерывать, а растения высаживать в грунт для контроля фенотипической и генотипической стабильности. Предпочтительным методом для длительного хранения образцов клоновых коллекций является криоконсервирование. Для криосохранения плодовых культур преимущественно используют метод программного (медленного) замораживания спящих почек растений полевых генбанков, а для большинства ягодных культур – в основном методы быстрого замораживания эксплантов *in vitro* растений (меристемы, вегетативные почки, апексы побегов). Необходимо отметить, что в настоящее время методы криоконсервации разработаны лишь для ограниченного числа культур. Каждая из перечисленных выше систем (полевые, *in vitro* и криогенбанки) имеет свои преимущества и ограничения, поэтому гарантированное сохранение коллекций может обеспечить только совместное использование всех трех систем (Reed et al., 2004, Gavrilenko et al., 2007; FAO, 2014)

В настоящее время сравнительно небольшое число генбанков содержат представительные *in vitro* и криоколлекции ягодных и плодовых культур умеренного климата

(Reed et al., 2004; Hao, Deng, 2003; Kovalchuk et al., 2009; Hanke, 2014; Höfer, Hanke, 2017). В частности, в NCGR Corvallis (National Clonal Germplasm Repository Corvallis – коллекция Национального репозитория США в Корваллисе) в *in vitro* системе сохраняется 222 образца рода *Fragaria*, 248 образцов рода *Rubus*, 25 образцов рода *Ribes* и 135 образцов рода *Sorbus* (Annual Report..., 2014). В NCGRP (National Center for Genetic Resources Preservation, Fort Collins, США) на длительном криохранении находятся: 2155 образцов рода *Malus* (спящие почки), 219 образцов рода *Pyrus* (спящие почки и апексы побегов *in vitro* растений), 280 образцов рода *Fragaria* (апексы побегов *in vitro* растений), 187 – рода *Rubus* (апексы побегов *in vitro* растений), 79 образцов рода *Ribes* (спящие почки и апексы побегов *in vitro* растений) и 42 образца рода *Vaccinium* (апексы побегов *in vitro* растений) (Jenderek, Reed, 2017).

Стратегия формирования *in vitro* коллекции ягодных и плодовых культур умеренного климата в ВИР заключается в сохранении отечественного селекционного материала, включающего сорта стародавней и народной селекции, современные сорта и гибриды, а также образцы дикорастущих родичей, собранных в основном на территории РФ. В генетических банках других стран такой материал отсутствует или представлен фрагментарно (Gavrilenko et al., 2007; Dunaeva, Gavrilenko, 2007). Коллекция *in vitro* также включает зарубежные сорта-источники ценных признаков.

В данной статье приведена информация о структуре и численности *in vitro* коллекции ягодных и плодовых культур умеренного климата, сохраняемой в ВИР, стратегии ее пополнения, методах поддержания и возможностях практического использования.

Материал и методы исследования

Для введения в культуру *in vitro* использовали образцы малины красной, смородины черной, жимолости, земляники, рябины, вишни и сливы из полевой коллекции научно-производственной базы (НПБ) «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР». В первую очередь отбирали стародавние сорта, а также доноры и источники селекционно важных признаков и образцы, находящиеся на грани гибели в полевой коллекции. Также в коллекцию *in vitro* были введены образцы дикорастущих видов ежевики из полевой коллекции филиала Майкопской опытной станции ВИР, экспедиционных сборов ВИР и других учреждений.

У образцов малины, жимолости и смородины черной верхушечные и пазушные почки вводили от индивидуальных растений полевых коллекций, изученных по минеральному и химическому составу ягод (Lefèvre et al., 2011) и генотипированных (у малины и жимолости) с использованием SSR- и ISSR-маркеров (Lamoureux et al., 2011).

Введение растительного материала в культуру *in vitro*, микроклональное размножение, укоренение микрорастений, поддержание образцов в состоянии активного и замедленного роста и мониторинг скрытых бактериальных инфекций в растительном материале проводили в соответствии с методическими указаниями ВИР (Dunaeva et al., 2017).

Результаты и обсуждение

В настоящее время *in vitro* коллекция ягодных и плодовых культур ВИР включает 330 образцов, из них 236 сортов – малины, ежевики, жимолости, земляники,

вишни, сливы, рябины, смородины черной (в том числе 14 гибридов); 80 образцов дикорастущих родичей, собранных экспедициями ВИР на территории России и ближнего зарубежья. Состав и численность *in vitro* коллекции ягодных и плодовых культур представлены на рисунке.

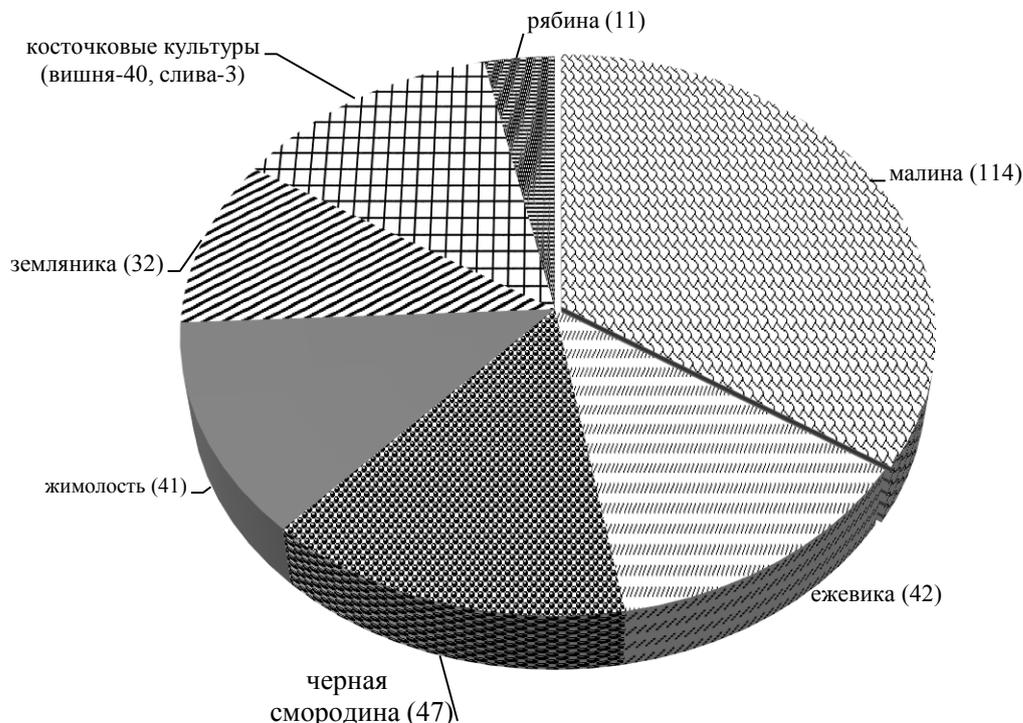


Рисунок. Состав и численность *in vitro* коллекции ягодных и плодовых культур

Примечание. В скобках указано общее число образцов.

Figure. Composition and size of the *in vitro* collections of berry and fruit crops

Note. The number of accessions is indicated in parentheses.

При формировании *in vitro* коллекции предпочтение отдается сортам российской селекции (табл. 1).

В коллекции *in vitro* ВИР сохраняются также образцы дикорастущих родичей малин, ежевик (включая эндемики), смородины, жимолости, собранные экспедициями ВИР на территории России и ближнего зарубежья (табл. 2).

При формировании и пополнении *in vitro* коллекции используются разные источники поступления растительного материала. Основным является полевой генбанк ВИР, образцы которого вводятся в культуру *in vitro* для создания дублетов. Из 330 образцов *in vitro* коллекции 146 (44%) являются дублетами образцов полевого генбанка ВИР (табл.3). Число дублетных образцов могло бы быть выше, однако следует отметить, что 64 сорта малины, 8 сортов вишни, 10 сортов земляники и 2 сорта черной смородины, введенные в разные годы в культуру *in vitro*, выпали из полевой коллекции НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР», и в настоящее время сохраняются

только в коллекции *in vitro*. В таблице 3 приведены источники поступления образцов в коллекцию *in vitro* ВИР.

Сорта и гибриды ягодных и плодовых культур в коллекции *in vitro*

Малина (*Rubus L.*)

In vitro коллекция включает 114 образцов, из них 83 сорта малины красной *Rubus idaeus L.* (из которых 60 сортов российской селекции), 4 сорта малины черной *R. occidentalis L.* и 27 образцов культивируемых и дикорастущих видов малин. Из 60 сортов малины российской селекции 35 входит в перечень Государственного реестра селекционных достижений, допущенных к использованию в 2017 г. Всего в Госреестре 2017 г. насчитывается 85 сортов малины (<http://reestr.gossort.com/reestr-1.html>).

В *in vitro* коллекции ВИР сохраняются сорта, представляющие широкое эколого-географическое разнообразие, созданные в различных селекционных учреждениях страны, расположенных в пяти из восьми округов РФ: в

Центральном (Москва, ВСТИСП; Брянская обл., Кокинский опорный пункт ВСТИСП), Северо-Западном (Ленинградская обл., ЛПООС; Вологодская обл., Никольский опорный пункт ВИР), Приволжском (Нижегород, Ботанический сад Нижегородского университета; Самара, Куйбышевская зональная опытная станция по садовод-

ству), Уральском (Свердловская опытная станция по садоводству) и Сибирском (Барнаул, НИИСС им. М. А. Лисавенко). В *in vitro* коллекции ВИР сохраняются сорта малины красной, созданные на протяжении более чем 100 лет, включая стародавние сорта конца XIX – первой половины XX вв.

Таблица 1. Доля (%) сортов российской селекции ягодных и плодовых культур в коллекции *in vitro* ВИР

Table 1. Proportion (%) of berry and fruit cultivars of Russian breeding in the *in vitro* collection at VIR

Культура	Число сортов	
	Всего, шт	в т. ч. российской селекции, шт. (%)
Малина	87	60 (70%)
Косточковые (вишня, слива)	43	37 (86%)
Смородина черная	28	16 (57%)
Ежевика	25	0 (0%)
Земляника садовая	28	23 (82%)
Жимолость синяя	18	18 (100%)
Рябина	7	7 (100%)
Всего	236	161 (68%)

В частности, сорта народной селекции с высокой зимостойкостью – ‘Малая Устюжная’ (в полевой коллекции ВИР с 1930 г.), ‘Шарташская’ (в коллекции ВИР с 1925 г.) и селекционные сорта В. В. Спирина – ‘Белая Спирина’, ‘Ранняя Сладкая’ (в коллекции ВИР с 1927–1930 гг.). К этому же периоду селекции относятся сорта малины ‘Советская’, ‘Щербатовка-1’ и сорта селекции И. В. Мичурина ‘Прогресс’ и ‘Продуктивная’. Из стародавних сортов малины красной зарубежной селекции можно отметить сорт ‘Phoenix’ (1896 год, США) – источник высокой морозостойкости, выносливости к ряду грибных заболеваний, микоплазменной болезни израстание (<http://selplod.ru/?pg=sortovedenie#top>), и белоплодный диетический и декоративный сорт ‘Cornuells Victoria’ (1940 год, Англия). Большинство сортов малины, сохраняемых в коллекции *in vitro*, созданы во второй половине XX века. В частности, в этот период были выведены 50 из 60-ти отечественных сортов, поддерживаемых в коллекции *in vitro*. Из них 27 сортов созданы в трех селекционных центрах: НИИСС им. М. А. Лисавенко (Барнаул) – 12 сортов; ВСТИСП (Москва) – 6 сортов селекции В. В. Кичины; Кокинском опорном пункте ВСТИСП (Брянск) – 9 сортов селекции В. И. Казакова.

Ежевика (*Rubus L.*)

In vitro коллекция включает 42 образца (25 сортов и 17 культивируемых и дикорастущих видов). Все сорта ежевики являются сортами зарубежной селекции (США, Англия, Бразилия, Австралия) разных лет, 6 из них созданы в 30-40 гг. XX века. Среди сортов ежевики 5 представлены селекционными клонами дикорастущих видов, 17 межвидовыми гибридами и 3 малинно-ежевичными гибридами. В коллекции *in vitro* имеются бесшипные сорта, а также толерантные к болезням. Из 17 видов ежевик 14 –

дублиеты образцов полевого генбанка филиала Майкопская опытная станция ВИР (Dobrenkov et al., 2008).

Смородина черная (*Ribes L.*)

Коллекция *in vitro* ВИР черной смородины представлена сортами различного генетического и эколого-географического происхождения, которые получены из селекционных учреждений Центрально-Черноземного региона (ВНИИСПК, г. Орел и «ФНЦ им. И. В. Мичурина», г. Мичуринск), Центрального региона (ВСТИСП, г. Москва), Северо-Западного (ВИР), Восточно-Сибирского и Западно-Сибирского (Южно-Уральский НИИПОК, г. Челябинск, Свердловская опытная селекционная станция садоводства, г. Екатеринбург) и других регионов России, а также стран ближнего (Беларусь, Литва) и дальнего (Польша, Германия) зарубежья.

По генетическому происхождению сорта и гибриды *in vitro* коллекции черной смородины относятся к 12 генетическим группам (табл. 4).

В состав первой, наиболее репрезентативной группы (28,6% образцов), вошли 4-геномные сорта ‘Багира’, ‘Болеро’, ‘Вологда’, ‘Зеленая дымка’, ‘Трилена’, ‘Чаровница’ и др., содержащие генетический материал двух подвидов смородины черной, смородины дикуши и скандинавского экотипа *Ribes nigrum*. Вторая по численности группа (23,8%) включает образцы, являющиеся производными европейского и сибирского подвидов *R. nigrum*. Среди них наибольший интерес представляют гибриды Н. М. Павловой, полученные путем скрещивания сорта ‘Нарядная’ с формами сибирского подвида смородины черной: форма № 2 (Туруханский р-н, Красноярский край) и форма № 4 (Горная Шория, Алтай). На протяжении длительного периода времени они проявляют высокую устойчивость к наиболее опасному вредителю черной смородины – почковому клещу (*Eriophyes ribis* Nal.) – и переносимому им

заболеванию – махровости. На долю третьей группы, включающей 3-геномные потомки смородины дикуши, приходится 19,0% от общего количества сортов.

Среди сохраняемых в коллекции *in vitro* сортов черной смородины присутствуют сорта ‘Tisel’ (Польша) и ‘Дабрадзя’ (Беларусь), созданные с участием *R. ussuriense* Jancz.

Таблица 2. Клоновая *in vitro* коллекция образцов дикорастущих видов, собранных из природных популяций экспедициями ВИР
Table 2. Clonal *in vitro* collection of the accessions of wild species collected from natural populations by VIR’s collecting missions

Род/подрод	Таксон	Собраны в РФ	Собраны в странах ближнего зарубежья	Получены из других источников	Общее число образцов
<i>Rubus</i> L./ <i>Idaeobatus</i> (Focke) Focke	<i>R. idaeus</i> L.	24	–	–	27
	<i>R. phoenicolasus</i> Maxim.	–	–	1	
	<i>R. parvifolius</i> L.	–	–	1	
	<i>R. illecebrosus</i> Focke	–	–	1	
<i>Rubus</i> L./ <i>Rubus</i>	<i>R. abnormis</i> (Sudre) Sudre	1	–	–	17
	<i>R. ulmifolius</i> Schott	1	–	–	
	<i>R. georgicus</i> Focke (aff.)	1	–	–	
	<i>R. ibericus</i> Juz.	1	–	–	
	<i>R. candicans</i> Weihe ex Rchb.	2	–	–	
	<i>R. caesius</i> L.	1	–	1	
	<i>R. discernendus</i> (Sudre) Sudre	1	–	–	
	<i>R. miszczenkoi</i> Juz.	1	–	–	
	<i>R. nessensis</i> Hall	1	–	–	
	<i>R. lloydianus</i> Genev.	1	–	–	
	<i>R. pyramidalis</i> Kaltenb.	–	–	1	
	<i>R. juzepczukii</i> Sanadze	–	1	–	
	<i>R. sangvineus</i> Friv.	–	1	–	
<i>R. kudagorensis</i> Sanadze	–	1	–		
<i>R. dolichocarpus</i> Juz.	–	1	–		
<i>Lonicera</i> L.	<i>L. caerulea</i> L.	6	–	–	23
	<i>L. caerulea</i> subsp. <i>kamtschatica</i> (Pojark.) Plekhanova	17	–	–	
<i>Ribes</i> L.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>europaeum</i> Jancz.	1	–	–	5
	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>sibiricum</i> E. Wolf	1	–	–	
	<i>R. pauciflorum</i> Turcz. ex Pojark.	2	–	–	
	<i>R. ussuriense</i> Jancz.	1	–	–	
<i>Fragaria</i> L.	<i>Fragaria vesca</i> L.	–	–	4	4
<i>Sorbus</i> L. s.l.*	<i>S. anglica</i> Hedl.	–	–	1	4
	<i>S. chamaemespilus</i> (L.) Crantz	–	–	1	
	<i>S. discolor</i> (Maxim.) Hedl.	–	–	1	
	<i>S. mougeotti</i> Soy.-Will. et Godr.	–	–	1	

Всего 80 образцов ягодных и плодовых культур (виды культурных растений и их дикорастущие родичи).

*В этой статье мы понимаем род *Sorbus* s. l. - в широком смысле.

Примечание. «–» отсутствие сборов или отсутствие образцов из других источников

Наряду с современными сортами в коллекции *in vitro* черной смородины поддерживается сорт ‘Длиннокистная поздняя’, привлеченный в полевую коллекцию в 1926 г. Определенный интерес представляют отдаленные межвидовые и межподродовые гибриды *R. hudsonianum* × *R. dikuscha* и 046 Petros 69, созданные в Литве А. И. Рилишкисом. Особенностью их является высокая устойчивость к почковому клещу и к наиболее вредоносной в условиях Северо-Западного региона России болезни – американской мучнистой росе (*Sphaerotheca mors-uvae* (Schw.) Berk. et Curt). Кроме того, гибридный образец *R. hudsonianum* × *R. dikuscha* имеет очень длинные, густые многоцветковые кисти, насчитывающие до 33 и более

цветков, в связи с чем, помимо перечисленных важных для селекции признаков, может использоваться в садоводстве в качестве декоративного кустарника. Достаточно декоративен во время цветения и гибрид 046 Petros 69 за счет необычной (ярко-розовой) окраски цветков.

Вишня (*Cerasus* Mill.)

В коллекции *in vitro* поддерживаются 40 образцов вишни в основном отечественной селекции (34 сорта) и 6 зарубежных (селекции Эстонии, Канады и Швеции). По таксономическому составу сорта вишни относятся к *Cerasus vulgaris* Mill. (вишня обыкновенная) и *C. fruticosa* Pall. (вишня степная). Кроме того, ряд сортов является отдаленными гибридами, полученными от скрещивания

сортов вишни обыкновенной с тетраплоидным видом *C. maackii* (Rupr.) Eremin et Simagin (вишня Маака) – сорта ‘Новелла’ и ‘Долгожданная’ (ВНИИСПК), ‘Русинка’ (ВСТИСП), ‘Харитоновская’ (ВНИИГиСПР), а также ‘Алмаз’ (ВНИИГиСПР), используемый в качестве донора

устойчивости к коккомикозу (*Coccomyces hiemalis* (Higg.). Гибрид «Степной родник» (подвой, ВНИИГиСПР), в геноме которого присутствует генетический материал вишни обыкновенной, вишни Маака и вишни степной, также является донором устойчивости к данной болезни.

Таблица 3. Источники поступления образцов в коллекцию *in vitro* (всего 330 образцов)
Table 3. Sources of germplasm placed into the *in vitro* collection (total of 330 accessions)

Источники поступления образцов	Число образцов
Полевой генбанк ВИР НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР»; Филиал Майкопская опытная станция ВИР	146 (дублиеты)
Полевой генбанк ВИР НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР»	84 сохраняются только в коллекции <i>in vitro</i> ; в полевой коллекции НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» эти образцы утеряны
Экспедиционные сборы ВИР	24
Другие генбанки и учреждения	76

Таблица 4. Распределение образцов черной смородины (*Ribes L.*) в коллекции *in vitro* по генетической принадлежности
Table 4. Distribution of black currant accessions (*Ribes L.*) in the *in vitro* collection according to their genetic affiliation

№№ групп	Генетические группы	Число образцов в группе
1.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>europaeum</i> × <i>R. nigrum</i> subsp. <i>sibiricum</i> × <i>R. dikuscha</i> × скандинавский экотип <i>R. nigrum</i>	12
2.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>europaeum</i> × <i>R. nigrum</i> subsp. <i>sibiricum</i>	10
3.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>europaeum</i> × <i>R. nigrum</i> subsp. <i>sibiricum</i> × <i>R. dikuscha</i>	8
4.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>europaeum</i> × <i>R. dikuscha</i>	3
5.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>europaeum</i> × <i>R. dikuscha</i> × скандинавский экотип <i>R. nigrum</i>	2
6.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>europaeum</i>	1
7.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>sibiricum</i>	1
8.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>europaeum</i> × скандинавский экотип <i>R. nigrum</i>	1
9.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>europaeum</i> × <i>R. nigrum</i> subsp. <i>sibiricum</i> × <i>R. ussuriense</i> × скандинавский экотип <i>R. nigrum</i>	1
10.	<i>R. nigrum</i> subsp. <i>europaeum</i> × <i>R. nigrum</i> subsp. <i>sibiricum</i> × <i>R. dikuscha</i> × <i>R. ussuriense</i> × скандинавский экотип <i>R. nigrum</i>	1
11.	<i>R. hudsonianum</i> × <i>R. dikuscha</i>	1
12.	<i>R. petraeum</i> × <i>R. procumbens</i>	1
	Всего	42

Большая часть образцов *in vitro* коллекции – 28 образцов (70%), относятся к вишне обыкновенной. Эти образцы были получены из различных регионов России – Северо-Западного (ВИР), Среднего Поволжья (Самарская опытная станция садоводства, ТАТНИСХ, г. Казань), Центрального (ВСТИСП, г. Москва, Московский помологический рассадник) и Центрально-Черноземного (ВНИИСПК, г. Орел; ВНИИГиСПР имени И. В. Мичурина, г. Мичуринск). В коллекции поддерживаются два сорта вишни обыкновенной – ‘Владимирская’ и ‘Коро-стынская’, сохраняющиеся в полевом генбанке с момента основания станции «Красный Пахарь» (1926 г.; ныне НПБ

«Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР»). Полученные из Уральского региона (Свердловская опытная станция садоводства, г. Екатеринбург) и из Западной Сибири (НИИСС имени М. А. Лисавенко, г. Барнаул) сорта вишни степной: ‘Щедрая’, ‘Элита рубиновая’, ‘Анюта Казанцева’, ‘Желанная’, ‘Касмалинка’, ‘Субботинская’, являются источниками высокой зимостойкости и низкорослости.

Жимолость (*Lonicera L.*)

Род жимолость включает 200 видов, но только небольшое число из них, преимущественно из подсекции голубых жимолостей (*Caeruleae*) имеет пригодные в пищу плоды. К числу таких видов относится полиморфный вид

жимолость синяя (*L. caeruleae* L.), некоторые из подвидов которого успешно domesticiрованы (Skvortsov, Kuklina, 2002). Центр современного распространения голубых жимолостей находится на Севере и Северо-Востоке Евразии, т. е. на территории России и сопредельных государств.

In vitro коллекция жимолости синей включает 41 образец, из них 18 сортов, среди которых 14 представлены селекцией НИИСС имени М. А. Лисавенко (г. Барнаул) и его опорного пункта (ныне ФГУП «Бачкарское», Томская область) и 4 сорта: ‘Первенец’ (1953), ‘Васильевская’ (1953), ‘Челночная’ (1962), ‘Ленинградский Великан’ (1979), выведенные в ВИР. Остальные 23 образца жимолости в коллекции *in vitro* являются отборами из семян дикорастущих образцов жимолости синей или элитными формами, полученными от свободного опыления. Большинство сортов (13 из 18-ти) и дикорастущих образцов (17 из 23-х) жимолости синей относятся к камчатскому подвиду (*L. caerulea* subsp. *kamtschatica* (Pojark.) Plekhanova (Plekhanova et al., 1995).

Рябина (*Sorbus* L.)

In vitro коллекция рябины включает 11 образцов (7 сортов и 4 представителя дикорастущих видов). Из 7 сортов рябины 4 сорта (‘Алая крупная’, ‘Титан’, ‘Гранатная’ и ‘Мичуринская десертная’) выведены И. В. Мичуриным в результате отдаленной гибридизации между представителями семейства *Rosaceae*. Образцы дикорастущих видов получены из ботанических садов Западной Европы.

Земляника (*Fragaria* L.)

In vitro коллекция земляники включает 32 образца, из которых 28 сортов (23 российской и 5 зарубежной селекции) и 4 индикаторных клона дикорастущего вида *Fragaria vesca* L. (FV-72, E12, ЕМК, ИС-2), полученных из ВСТИСП и используемых для диагностики вирусов земляники.

Методы поддержания образцов *in vitro* коллекции ягодных и плодовых культур и их дикорастущих родичей

Образцы *in vitro* коллекции ВИР ягодных и плодовых растений поддерживаются в состоянии активного роста и закладываются на среднесрочное хранение. Активный рост образцов всех культур, кроме косточковых, осуществляется на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) (Murashige, Skoog 1962) с половинным количеством макроэлементов без фитогормонов при периодическом клонировании микрорастений (Dunaeva et al., 2017). Для образцов косточковых культур (вишня, слива) используется питательная среда МС с добавлением 6-бензиламинопурина (6-БАП) различной концентрации (0,1 мг/л; 0,5 мг/л и 1,0 мг/л) в зависимости от генетического происхождения сортов. Этап укоренения вишни проводится на питательной среде МС с половинным содержанием минеральных солей и добавлением индолилмасляной кислоты (ИМК) 0,75 мг/л (Orlova, 2002). Активный рост микрорастений образцов ягодных и плодовых культур осуществляется

при температуре 20–25°C, освещенности 4–5 клк и фотопериоде 16 ч.

Образцы в коллекции среднесрочного *in vitro* хранения сохраняются на питательной среде МС с половинным составом минеральных солей без фитогормонов при пониженной положительной температуре 4°C, освещенности ~500 лк и фотопериоде 8 ч. У сохраняемых в *in vitro* культуре образцов сроки беспересадочного среднесрочного хранения различаются и варьируют в пределах одной культуры, например, у вишни и ежевики от 1 года до 3,5 лет, у земляники от 1 года до 1,5 лет, у малины от 0,5 до 1 года.

Использование образцов *in vitro* коллекции ВИР ягодных и плодовых культур

Образцы *in vitro* коллекции ВИР используются для дублетного сохранения образцов полевого генбанка, а также в следующих направлениях исследований:

Оздоровление образцов от вирусной инфекции. В отделе биотехнологии ВИР был модифицирован метод комплексной антивирусной терапии для оздоровления микрорастений малины красной от вируса RBDV (Antonova et al., 2015). Антивирусная терапия была проведена в 4-х вариантах, включающих два варианта химиотерапии (рибавирин или РНКазы) и два варианта комплексной терапии, совмещающих термотерапию с разными условиями химиотерапии. Согласно результатам ИФА анализа модифицированный вариант комплексной термотерапии (воздействие повышенной температуры 35°C на микрорастения, растущие на питательной среде с 30 мг/л рибавирина) оказался наиболее эффективным – получено 60% оздоровленных микрорастений; Варианты использования только химиотерапии (Antonova et al., 2015) и только криотерапии (Ukhatova, 2017) были не результативными.

Изучение морфофизиологических и биохимических показателей микрорастений при среднесрочном *in vitro* хранении образцов. В результате проведения морфометрических и биохимических исследований микрорастений ежевики, сохраняемых в условиях низких положительных температур, установлено, что условия среднесрочного *in vitro* хранения при 4°C являются стрессовыми, о чем свидетельствует повышение содержания пролина и снижение содержания аскорбиновой кислоты у *in vitro* растений. Для оценки жизнеспособности микрорастений в условиях среднесрочного *in vitro* хранения в качестве экспресс-теста предложено использовать мониторинг уровня пероксида водорода в пробирочных растениях (Samatova et al., 2009).

Генотипирование образцов. Для идентификации образцов рода *Rubus* из 12 исследованных ферментных систем были отобраны три: эстеразы, пероксидазы и лейциламинопептидазы. На основании анализа компонентов спектров этих изоферментных систем изучаемые образцы рода *Rubus* распределились на два кластера, в основном, соответствующие таксономическому разделению образцов на два подрода – *Idaeobatus* Focke (малина) и *Rubus*

(ежевика). Индивидуальные изозимные спектры эстеразы позволили идентифицировать 44 образца малины и ежевики (Dunaeva et al., 2005).

Индивидуальные растения образцов малины и жимолости из полевого генбанка, послужившие донорами почек для введения в культуру *in vitro*, были генотипированы с использованием SSR- и ISSR-маркеров (Lamougeux et al., 2011).

Генетическая трансформация. Модифицирован состав фитогормонов в питательной среде для получения адвентивных регенерантов у сортов малины красной и ежевики. Отобраны генотипы с наиболее высоким уровнем адвентивной регенерации для проведения экспериментов по агробактериальной генетической трансформации и получены трансформанты сорта ежевики 'Young' с генами *nptII*, *IFN6* (Lupysheva et al., 2008).

Модификация метода криоконсервирования и криосохранение образцов. Изучена способность к посткриогенной регенерации у 13 сортов малины красной и предложен оптимизированный протокол «DV-biotech» для криоконсервации апексов побегов микрорастений, позволяющий достигать высоких показателей посткриогенного восстановления эксплантов (Ukhatova et al., 2017).

Изучение адаптации пробирочных растений к условиям *ex vitro*. Микрорастения 11 сортов ежевики были высажены в почву после длительного сохранения в культуре *in vitro*; изучены приживаемость, показатели роста и развития *ex vitro* растений, а также фенотипы развития, элементы урожайности, засухоустойчивость и восприимчивость к грибным патогенам. Выявлены сортовые различия по адаптивности *ex vitro* растений ежевики к стрессорам предгорной зоны Республики Адыгея (Dobrenkov et al., 2017).

Заключение

In vitro коллекция ягодных и плодовых культур в ВИР включает 330 образцов малины, ежевики, жимолости, смородины черной, земляники, косточковых культур (вишня, слива), рябины. Эта коллекция является одной из наиболее крупных в системе европейских и азиатских генетических банков, сохраняющих образцы ягодных и плодовых культур умеренного климата. Основную часть *in vitro* коллекции ягодных и плодовых культур в ВИР составляют сорта российской селекции, фрагментарно представленные или отсутствующие в клонных генбанках других стран. Кроме того, в коллекции *in vitro* сохраняется небольшое число образцов дикорастущих родичей, собранных экспедициями ВИР на территории России и стран ближнего зарубежья, а также межвидовые гибриды черной смородины.

Образцы *in vitro* коллекции используются для разработки методов оздоровления микрорастений от вирусных инфекций; для выявления условий, позволяющих отбирать генотипы с высоким уровнем адвентивной регенерации в качестве объектов для генетической трансформации; для генотипирования образцов; для изучения физиолого-биохимических процессов, происходящих в микро-

растениях при среднесрочном *in vitro* хранении; в разработке методов криоконсервации и создании криоколлекций; в морфо-биологическом изучении *ex vitro* растений.

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания тематическому плану ВИР по теме № 0662-2018-0003 «Сохранение генетических ресурсов растений в живом виде на популяционно-видовом, организменном уровне, на уровне органов и частей растений, геномных ДНК в условиях *ex situ*, а также сохранение гербарных коллекций», номер государственной регистрации ЕГИСУ НИОКР: АААА-А17-117030910078-3. Авторы выражают благодарность Л. С. Красовской (Ботанический институт им. В. Л. Комарова) и И. Г. Чухиной (Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР)) за ценные замечания при составлении таблицы 2.

References/Литература

- Annual Report for Calendar Year 2014 Usda Ars NCGR, Corvallis // <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/20721500/AnnualReports/CorvallisAnnualReport2014.pdf>
- Antonova O. Yu., Dunaeva S. Ye., Ukhatova Yu. V., Kamylnina N. Yu., Dolganova N. A., Lisitsyna O. V., Gavrilenko T. A. Sanitation of raspberry from bush dwarf virus (RBDV) by complex therapy in culture *in vitro* // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2015, vol. 29, no. 7, pp. 61–64 [in Russian] (Антонова О. Ю., Дунаева С. Е., Ухатова Ю. В., Камылина Н. Ю., Долганова Н. А., Лисицына О. В., Гавриленко Т. А. Оздоровление малины от вируса карликовости (RBDV) методом комплексной терапии в культуре *in vitro* // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т. 29, № 7. С. 61–64).
- Cruz-Cruz C. A., González-Arno M. T., Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // Resources, 2013, 2, pp. 73–95. DOI:10.3390/resources2020073.
- Dobrenkov E. A., Semenova L. G., Dunaeva S. E., Ukhatova Y. V. Adaptation of *in vitro* blackberry plants to field environments // Proceedings on applied botany, genetics and breeding, St. Petersburg: VIR, 2017, vol. 178, iss. 1, pp. 25–30 [in Russian] (Добренков Е. А., Семенова Л. Г., Дунаева С. Е., Ухатова Ю. В. Адаптация пробирочных растений ежевики к полевым условиям среды // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. СПб., 2017, Т. 178. Вып. 1. С. 24–30).
- Dobrenkov E. A., Semenova L. G. et al. Raspberries and blackberries (the Response of plants to adverse environmental factors, chemical composition of fruits in conditions of a foothill zone of Republic Adygea): Catalogue of VIR world collection. (Malina i ezhevika (Reakcija rastenij na neblagoprijatnye faktory sredy, himicheskij sostav plodov v uslovijax predgornoj zony Respubliki Adygeja): Katalog mirovoj kollekcii VIR). St. Petersburg: VIR, 2008, vol. 790, 19 p. [in Russian] (Добренков Е. А., Семенова Л. Г. и др. Малина и ежевика (Реакция растений на неблагоприятные факторы среды, химический состав плодов в условиях предгорной зоны Республики Адыгея): Каталог мировой коллекции ВИР. СПб.: ВИР, 2008. Вып. 790. 19 с.).
- Dunaeva S. E., Kudryakova N. V., Malyshev L. L., Lupysheva Yu. V., Gavrilenko T. A. *In vitro* collection of raspberries and blackberries and identification of samples by isoenzyme spectra // Agrar'naya Rossiya 2005, no. 2, pp. 49–55 [in Russian] (Дунаева С. Е., Кудрякова Н. В., Мальшев Л. Л., Лупышева Ю. В., Гавриленко Т. А. *In vitro* коллекция малин и ежевик и идентификация образцов по изоферментным спектрам // Аграрная Россия. 2005. № 2. С. 49–55).
- Dunaeva S. E., Gavrilenko T. A. Collections of fruit and berry cultures *in vitro*: a strategy for the creation and storage // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding, 2007, vol. 161, pp. 10–19 [in Russian] (Дунаева С. Е., Гавриленко Т. А. Коллекции плодовых и ягодных культур *in vitro*: стратегия создания и хранения // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 2007. Т. 161. С. 10–19).

- Dunaeva S. E., Pendinen G. I., Antonova O. Yu., Shvachko N. A., Ukhatova Yu. V., Shuvalova L. E., Volkova N. N., Gavrilenko T. A. Preservation of vegetatively propagated crops in *in vitro* and cryo collections. 2nd edition Methodical Guidelines (Soxranenie vegetativno razmnozhaemykh kul'tur v *in vitro* i kriokollekciyax. Metodicheskie ukazaniya). St Petersburg : VIR, 2017, 71 p. [in Russian] (Дунаева С. Е., Пендинен Г. И., Антонова О. Ю., Швачко Н. А., Ухатова Ю. В., Шувалова Л. Е., Волкова Н. Н., Гавриленко Т. А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и крио коллекциях. Методические указания / под ред. Т. А. Гавриленко. СПб. : ВИР, 2017. 71 с.).
- Engelmann F., Engels J. M. M. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In: Managing plant genetic diversity / eds. J. M. M. Engels, V. R. Rao, A. H. D Brown, M. T Jackson. IPGRI, Rome, 2003, pp. 89–104.
- FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture // Rev. ed. Rome. 2014. 167 p.
- Gavrilenko T. A., Dunaeva S. E., Truskinov E. V., Antonova O. Yu., Pendinen G. I., Lupysheva Yu. V., Rogovaya V. V., Shvachko N. A. The strategy of long-term conservation of the gene pool of vegetatively propagated agricultural plants under controlled environmental conditions // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding, 2007, vol. 164, pp. 273–283 [in Russian] (Гавриленко Т. А., Дунаева С. Е., Трускинов Э. В., Антонова О. Ю., Пендинен Г. И., Лупышева Ю. В., Роговая В. В., Швачко Н. А. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 2007. Т. 164. С. 273–283).
- Hanke M. V., Höfer M., Flachowsky H., Peil A. Fruit genetic resources management: collection, conservation, evaluation and utilization in Germany // Acta Hort. 2014, vol. 1032, pp. 231–234.
- Hao Y. J., Deng X. X. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2003, vol. 72, pp. 253–260.
- Höfer M., Hanke M. V. Cryopreservation of fruit germplasm // In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant, 2017, vol. 53, no 4, pp. 372–381. <http://selplod.ru/?pg=sortovedenie#top> (Дата обращения 25.06.2018).
- Jahn O. L., Westwood M. N. Maintenance of clonal germplasm // Hortscience, 1982, vol.17, p. 122.
- Jenderek M. M., Reed B. M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plants, 2017, vol. 53, no 4, pp 299–308. DOI:10.1007/s11627-017-9828-3.
- Kovalchuk I., Lyudvikova Y., Volgina M., Reed B. M. Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm // Plant Cell Tissue Organ Cult., 2009, vol. 96, pp. 127–136.
- Lamoureux D., Sorokin A., Lefevre I., Alexanian S., Eyzaguirre P., Hausman J.-F. Investigation of genetic diversity in Russian collections of raspberry and blue honeysuckle // Plant Genet Resources, 2011, vol. 9, pp. 202–205.
- Lefevre I., Ziebel J., Guignard C., Sorokin A., Tikhonova O., Dolganova N., Hoffmann L., Eyzaguirre P., Hausman J.-F. Evaluation and comparison of nutritional quality and bioactive compounds of berry fruits from *Lonicera caerulea*, *Ribes* L. species and *Rubus idaeus* grown in Russia // Journal Berry Res., 2011, vol. 1, pp. 159–167.
- Lupysheva Yu. V., Dunaeva S. E., Pendinen G. I., Novikova L. Yu., Savelyeva N. V., Lutova L. A., Gavrilenko T. A. Regeneration and transformation of raspberry and blackberry varieties in *in vitro* culture // Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta 2008. Ser. 3. iss. 2, pp. 28–35 [in Russian] (Лупышева Ю. В., Дунаева С. Е., Пендинен Г. И., Новикова Л. Ю., Савельева Н. В., Лутова Л. А., Гавриленко Т. А. Регенерация и трансформация сортов малины и ежевики в культуре *in vitro* // Вестник Санкт-Петербургского ун-та. 2008. Сер. 3. Вып. 2. С. 28–35).
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant., 1962, vol. 15, pp. 473–497.
- Orlova S. Y. Biological features and selection value of cherry varieties in the conditions of the North-West of Russia : PhD Diss. Abstract, St. Petersburg, 2002, 20 p. [in Russian] (Орлова С. Ю. Биологические особенности и селекционная ценность сортов вишни в условиях Северо-Запада России : автореф. дисс. ... канд. биол. наук, Л., 2002, 20 с.).
- Panis B., Lambardi M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: The role of biotechnology. Villa Gualino, 5-7 March, Turin, Italy 2005, pp. 43–54.
- Plekhanova M. N., Kondrikova A. V., Khayrova L. N. Varieties and species of honeysuckle (*Lonicera* subsect. *Caeruleae*) – sources and donors of economically valuable traits for breeding. Catalog of the world collection of VIR. (Sorta i vidy zhimolosti (*Lonicera* subsect. *Caeruleae*) – istochniki i donory hozyajstvenno-tsennyykh priznakov dlya selektsii. Katalog mirovoj kollekcii VIR). St. Petersburg, 1995. Iss. 665. 61 p. [in Russian] (Плеханова М. Н., Кондрикова А. В., Хайрова Л. Н. Сорта и виды жимолости (*Lonicera* subsect. *Caeruleae*) – источники и доноры хозяйственно-ценных признаков для селекции. Каталог мировой коллекции ВИР. СПб., 1995. Вып. 665. 61 с.).
- Reed B. M., Engelmann F., Dullo E., Engels J. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections // IPGRI, Italy, 2004, 105 p.
- Samatova I. S., Dunaeva S. E., Sharova E. I., Shchiparev S. M., Medvedev S. S., Gavrilenko T. A. Peculiarities of micropropagation and dynamics of morphophysiological indices of some representatives of the genera *Rubus* and *Fragaria* (Rosaceae) during *in vitro* storage // Rastitel'nye resursy. 2009, vol. 45, no. 4, pp. 1–12 [in Russian] (Саматова И. С., Дунаева С. Е., Шарова Е. И., Щипарев С. М., Медведев С. С., Гавриленко Т. А. Особенности микроразмножения и динамика морфофизиологических показателей некоторых представителей родов *Rubus* и *Fragaria* (Rosaceae) при хранении *in vitro* // Растительные ресурсы. 2009. Т. 45, № 4. С. 1–12).
- Skvortsov A. K., Kuklina A G. Blue honeysuckle (Golubye zhimolosti). Moscow, 2002, 144 p. [in Russian] (Скворцов А. К., Куклина А. Г. Голубые жимолости. М., 2002. 144 с.).
- The state register of selection achievements (Gosudarstvennyy reestr selektsionnykh dostizhenij, dopushchennykh k ispol'zovaniyu (na 7 fevralya 2017 g.) [in Russian] (Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (на 7 февраля 2017 г.): <http://reestr.gossort.com/reestr-1.html> (Дата обращения 08.04.2018).
- Ukhatova Y. V., Dunaeva S. E., Antonova O. Y., Apalikova O. V., Pozdniakova K. S., Novikova L. Y., Shuvalova L. E., Gavrilenko T. A. Cryopreservation of red raspberry cultivars from the VIR *in vitro* collection using a modified droplet vitrification method // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant 2017, vol. 53, pp. 394–401. DOI: 10.1007/s11627-017-9860-3.
- Ukhatova Y. V. Improvement of methods of cryopreservation and recovery from viral diseases of samples of vegetatively propagated crops. PhD Diss. Abstract, St. Petersburg, 2017, 22 p. [in Russian] (Ухатова Ю. В. Совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов вегетативно размножаемых культур // Автореф. дис. ... канд. биол. наук, Санкт-Петербург, 2017, 22 с.).

МЕТОДЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖАЕМЫХ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

Ухатова Ю. В.¹, Гавриленко Т. А.^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР), 190000, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42, 44,

²Санкт-Петербургский государственный университет, 199004, Россия Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9
e-mail: tatjana9972@yandex.ru

Данная статья представляет собой обзор методов криоконсервации, используемых для создания криоколлекций генетических ресурсов растений. Методы криоконсервации для долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых культурных растений стали использоваться относительно недавно. Около 60 лет назад были разработаны первые методы программного (медленного) замораживания растительных объектов, к более современным относятся методы быстрого замораживания: инкапсуляции-дегидратации, витрификации, инкапсуляции-витрификации, дроплет-метод, дроплет-витрификации. Все эти методы применяются для криоконсервации образцов полевых генбанков и образцов из *in vitro* коллекций. В обзоре рассмотрены основные факторы, определяющие жизнеспособность и регенерационную способность эксплантов после замораживания-оттаивания. Наибольшее влияние на эффективность посткриогенного восстановления эксплантов оказывают способ предобработки исходных микрорастений, тип экспланта, тип криопротекторов, длительность обработки эксплантов криопротекторами, состав питательной среды для посткриогенного восстановления, а также генотипические особенности образцов. В обзоре обсуждаются регламенты формирования и пополнения коллекций в криобанках. Приведены данные о наиболее крупных криоколлекциях образцов вегетативно размножаемых культурных растений.

Ключевые слова: криоконсервация, генетические ресурсы растений, криоколлекции.

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.
Конфликт интересов отсутствует

Ухатова Ю.В., Гавриленко Т.А. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений. Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):52-63. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63

Ukhatova Y. V., Gavrilenko T. A. Cryoconservation methods for vegetatively propagated crops (review). Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):52-63. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63

CRYOCONSERVATION METHODS FOR VEGETATIVELY PROPAGATED CROPS (REVIEW)

Ukhatova Y. V.¹, Gavrilenko T. A.^{1,2}

¹ N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42-44, Bolshaya Morskaya St., St. Petersburg, 190000, Russia

² St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya naberezhnaya, St. Petersburg, 199034, Russia
e-mail: tatjana9972@yandex.ru

This article presents a review of cryopreservation methods used to create cryocollections of plant genetic resources. The application of cryopreservation methods for the long-term conservation of the vegetatively propagated crops started relatively recently. About 60 years ago, the first methods of programmable (slow) freezing of plant objects were developed. The modern methods include such fast freezing techniques as encapsulation-dehydration, vitrification, encapsulation-vitrification, droplet-method, and droplet-vitrification. These methods are used for cryopreservation of accessions from the field genbanks and samples from *in vitro* collections. The review considers the main factors determining the viability and regeneration rates of explants after freezing-re-warming. The greatest impact on the efficiency of post-cryogenic explants recovery is provided by such factors as the method of the initial microplants pre-treatment, explant and cryoprotectant type, duration of the explant treatment with cryoprotectants, the composition of the nutrient medium for the post-cryogenic recovery, and the accession genotypic characteristics. The review discusses the rules for the collections formation and cryobanking development. The data on the largest cryocollections of cultivated plant species are presented.

УДК: 635.21:57.043

Поступила в редакцию 07.09.2018

Принята к публикации 08.11.2018

Криоконсервация растений представляет собой процесс подготовки клеток, тканей и органов к погружению в жидкий азот, замораживание эксплантов, сохранение растительного материала при сверхнизких температурах без потерь жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов и размораживание растительного материала.

В настоящее время для криоконсервации растений используется жидкий азот (-196°C) и его пары ($-183 \dots -185^{\circ}\text{C}$) (Verzhuk et al., 2009). Известны единичные работы по использованию температур -200°C , -250°C , $-272,9^{\circ}\text{C}$ (Tumanov et al., 1959), при этом растительный материал длительно сохраняется в криобанках при температуре не выше -135°C (Martinez-Montero, Harding, 2015).

Для оценки эффективности криоконсервации эксплантов наиболее часто используют два показателя:

– «жизнеспособность» (viability rate) или «выживаемость» (survival rate) (Kaczmarczyk et al., 2008, 2012; Panta et al., 2014);

– «регенерационная способность после оттаивания» (regeneration percentages after rewarming) (Kaczmarczyk et al., 2008) или «способность к посткриогенной регенерации побегов» (post-thawed recovery, recovery after cryopreservation) (Vysotskaya, Popov, 2005; Towill, Ellis, 2008; Panta et al., 2014).

Наиболее часто в криобиологии растений используются оба показателя одновременно. Все авторы отмечают положительную корреляцию между показателями жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов после оттаивания (Reed, 2008; Kaczmarczyk et al., 2008, 2011; Shvachko, 2012; Panta et al., 2014; Ukhatova et al., 2017a; Ukhatova et al., 2017b). Однако, несмотря на положительную корреляцию, учет только жизнеспособных эксплантов может сильно завышать реальную эффективность криоконсервации (Panta et al., 2014; Engelman, 2014). Число жизнеспособных эксплантов указывает на степень криоповреждений, возникших при криоконсервации. Тогда как регенерационная способность характеризует процесс восстановления роста и развития эксплантов после оттаивания.

Криоповреждения клеток обусловлены в основном двумя факторами: во-первых, формированием и ростом внутриклеточных кристаллов льда (при быстром замораживании) или образованием кристаллов льда в межклеточном пространстве (при медленном замораживании), во-вторых, процессами рекристаллизации при последующем оттаивании (Steponkus, 1984; Sakai et al., 1990; Belous, Grishchenko, 1994; Benson, 2004; Popov, 1993, 2008).

Для успешного замораживания растительных органов и тканей содержание свободной воды в клетках должно быть снижено до 20–30% (Panis, Lambardi, 2005), поскольку при этом повышается вязкость цитозоля, которая препятствует образованию кристаллов льда, способных вызывать необратимые повреждения внутриклеточных мембран (Steponkus, 1984; Sakai et al., 1990; Popov, 1993; Belous, Grishchenko, 1994).

Методы криоконсервации

Методы криоконсервации включают ряд последовательных этапов: (1) подготовка растительного материала, (2) изоляция эксплантов, (3) обработка эксплантов криопротекторами, (4) замораживание эксплантов в жидком азоте и криохранилище, (5) оттаивание и (6) учет жизнеспособности и регенерационной способности.

Выделяют три типа криопротекторов по проникающей способности и функциям (Sakai et al., 1990, 2008; Belous, Grishchenko, 1994; Benson, 2008):

– непроникающие через клеточную стенку (ПЭГ₆₀₀₀, ПВП, полисахариды и белки) – создают защиту от механических повреждений, поскольку концентрируются в межклеточном пространстве и снижают скорость роста кристаллов льда;

– проникающие только через клеточную стенку (олигосахариды, пролин, ПЭГ₁₀₀₀) – предотвращают повреждения мембраны растущими кристаллами льда и защищают цитоплазму от излишней дегидратации;

– проникающие через клеточную стенку и мембрану клетки (ДМСО, глицерол, этиленгликоль) – оказывают влияние на точку замерзания цитозоля, выравнивают осмотическое давление и таким образом оказывают стабилизирующее действие на клетки (Sakai et al., 1990; Belous, Grishchenko, 1994, 1994; Benson, 2008).

Отметим, что третий этап – обработка эксплантов криопротекторами – не используется для криоконсервации черенков плодовых и ягодных культур, криоконсервации пыльцы и ортодоксальных семян.

Медленное замораживание, которое иначе называют многоэтапным программным замораживанием (Sakai, 1960; Finkle, Ulrich, 1979; Reed, Lagerstedt, 1987), направлено на постепенное обезвоживание клеток при дегидратации путем медленного охлаждения материала до -40°C со скоростью $0,2-0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ с последующим замораживанием в жидком азоте (Forsline et al., 1999; Reed, 2008; Benson, 2008). При таком постепенном охлаждении клетки обезвоживаются, вследствие выхода воды по градиенту концентрации в межклеточное пространство, а в дальнейшем, когда там образуются кристаллы льда, происходит повреждение клеток этими кристаллами. В основополагающей работе Sakai (1960) было показано, что веточки шелковицы, предварительно охлажденные до -30°C и до -70°C , хорошо переносят замораживание в жидком азоте. Если температура предварительного охлаждения была выше -30°C , то процент выживания был невысок, причем он был тем ниже, чем выше была температура предварительного охлаждения. Эти эксперименты послужили основой для дальнейшей разработки разнообразных протоколов медленного замораживания различных объектов, в которых температура предварительного охлаждения никогда не превышает -30°C . В работах по криоконсервации методом медленного замораживания наиболее часто применяли смесь криопротекторов, в состав которой входят 10% полиэтиленгликоль (ПЭГ), 10% глюкоза и 10% ДМСО, растворенные в жидкой среде МС (Finkle, Ulrich, 1979).

Метод медленного замораживания был разработан первым и до сих пор используется при криоконсервации спящих почек древесных культур (Forsline et al., 1999; Towill et al., 2004; Towill, Ellis, 2008; Filipenko, 2007; Verzhuk et al., 2015, 2016). Следует отметить, что медленное замораживание в ряде случаев дает очень хорошие результаты. Отказ от него в пользу методов быстрого замораживания зачастую связан с тем, что трудно набрать большое число черенков в хорошем состоянии, необходимое для надежного криосохранения определенного образца.

Методы быстрого замораживания подразумевают прямое погружение биологического материала в жидкий азот (-196°C) без предварительного охлаждения. Они более просты, хорошо воспроизводятся, позволяют эффективно сохранять образцы разных видов, представленных древесными и травянистыми, тропическими и арктическими растениями, в виде различных типов эксплантов – почек, меристем, эмбрионов, пыльцы, каллусов и клеток (Reed, 2008, 2017; Feng et al., 2013; Wang et al., 2014). Большинство методов быстрого замораживания основано на явлении витрификации, при котором внутрисклеточная вода во время замораживания переходит в стекловидную (витрифицированную) фазу, минуя процесс кристаллизации; в результате чего клеточные органеллы остаются неповрежденными. Этот эффект достигается использованием криопротекторов (Sakai et al., 1990; Belous, Grishchenko, 1994).

Для эффективной защиты от криоповреждений рекомендуют использовать смесь криопротекторов разных типов. Наиболее часто применяют раствор PVS2 (Sakai et al., 1990), в состав которого входит несколько криопротекторов (30% глицерол, 15% ДМСО, 15% этиленгликоль, 0,4М сахараза), а также микро- и макроэлементы по прописи Мурасиге и Скуга (МС, Murashige, Skoog, 1962). Концентрация и длительность обработки криопротекторами должна определяться очень тщательно для каждого нового растительного объекта, чтобы сохранить жизнеспособность эксплантов (Arakawa et al., 1990; Sakai et al., 1990; Nishizawa et al., 1993; Reed, Chang, 1997; Panis et al., 2005).

Метод инкапсуляции-дегидратации включает инкапсуляцию эксплантов микрорастений в шарики альгината натрия с последующим высушиванием в потоке стерильного воздуха ламинара и погружением в жидкий азот. Данный метод, в основном, применяют для криоконсервации апексов микрорастений плодовых культур (Dereuddre et al., 1990; Wang et al., 2005; Gupta, Reed, 2006). Известны единичные примеры использования данного метода и для криоконсервации апексов картофеля (Fabre, Dereuddre, 1990; Vouafia et al., 1996).

Метод витрификации заключается в обработке эксплантов перед быстрым погружением в жидкий азот витрифицирующими растворами PVS2 (Sakai et al., 1990) и PVS3 (50% глицерола и 50% сахарозы; Nishizawa et al., 1993). Наиболее часто применяют раствор PVS2 (Golmirzaie, Panta, 2000). Метод получил широкое распространение для разных культур, поскольку он проще в исполнении, чем более ранние методы криоконсервации

(Romadanova et al., 2017). В ведущем генбанке картофеля СР (Перу) с использованием метода витрификации с 1995 по 2000 год были криоконсервированы 197 генотипов картофеля со средним уровнем регенерации 46%. Однако только около половины образцов имели относительно высокие показатели криорегенерации, около трети образцов регенерировали с частотой менее 15%, и у 15% образцов так и не удалось получить регенеранты (Golmirzaie, Panta, 2000). В настоящее время наиболее широко используют различные комбинации метода витрификации с другими методиками криоконсервации. Так, например, в случае **метода инкапсуляции-витрификации** (Tannoury et al., 1991) апексы или каллусы микрорастений сначала помещают в альгинатные шарики, после чего материал инкубируют в витрифицирующем растворе для дегидратации и витрификации. Данный метод более результативный и быстрый, чем метод инкапсуляции-дегидратации (Hirai, Sakai, 1999, 2000; Wang et al., 2005).

Дроplet-метод (дроplet-замораживание) был разработан в 1993 году в генбанке ИПК (Германия) для криоконсервации апексов микрорастений картофеля (Schäfer-Menuhr et al., 1994). Термин «дроplet» отражает специфику данного метода: в капли криопротектора (10% ДМСО), нанесенные на полоски алюминиевой фольги, помещают экспланты на 12 часов. После этого полоски фольги с эксплантами быстро замораживают в жидком азоте. Данный прием облегчает быстрое погружение эксплантов в жидкий азот и их извлечение из него. С помощью этого метода в ИПК создана криоколлекция картофеля, насчитывающая 1560 сортов, со средним уровнем регенерации после оттаивания 58% (Kaczmarczyk et al., 2008, 2011).

Дроplet-витрификация является комбинацией методов дроplet-замораживания и витрификации. Данная технология была разработана В. Panis с коллегами в 2005 году для криоконсервации *in vitro* коллекции банана, в том же году она была успешно применена для картофеля (Halmagyi et al., 2005), а впоследствии – для многих других видов растений (Panis et al., 2016). Дроplet-витрификация включает все этапы дроplet-метода, отличаясь от него использованием раствора PVS2, содержащим более высокое количество ДМСО (15%) и дополнительные криопротекторы, а также существенно более короткой продолжительностью инкубации эксплантов в этом растворе (30 минут вместо 12 часов). На сегодняшний день данный метод зарекомендовал себя наиболее простым в исполнении и надежным способом криоконсервации. Так, например, по сравнению с дроplet-методом при использовании метода дроplet-витрификации были получены достоверно более высокие показатели посткриогенного восстановления у образцов картофеля (Shvachko, 2012) и арабидопсиса (Stock et al., 2017). В настоящее время метод дроplet-витрификации получил широкое распространение и успешно используется для криоконсервации травянистых и древесных растений, относящихся к разным ботаническим семействам, включая тропические виды, например: банан (Panis et al., 2005, 2009, 2016), таро (Sant

et al., 2008), ананас (Souza et al., 2016) и растения умеренной зоны: лук и чеснок (Kim et al., 2006, 2009, 2012a, b), картофель (Panta et al., 2015; Shvachko, Gavrilenko, 2011; Ukhatova et al., 2017b; Gavrilenko et al., 2018), яблоня (Condello et al., 2011a), пеларгония (Gallard et al., 2008), роза (Halmagyi, Pinker, 2006; Pawłowska, Szewczyk-Taranek, 2013; Le Bras et al., 2014), зверобой (Coste et al., 2012). С использованием метода дроплет-витрификации

созданы криоколлекции многочисленных образцов следующих культур (табл. 1): банана в Бельгии (Panis et al., 2005, 2009); лука и чеснока в Южной Корее (Kim et al., 2006, 2009, 2012a) и Германии (Keller et al., 2016); картофеля в Перу (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016, 2017), США (Bamberg et al., 2016; Jenderek, Reed, 2017) и России (Shvachko, Gavrilenko, 2011; Ukhatova et al., 2017b; Gavrilenko et al., 2018); малины и ежевики в США (Reed, DeNoma, 2012; Jenderek, Reed, 2017).

Таблица 1. Наиболее крупные криоколлекции культурных растений
Table 1. The largest cryocollections of cultivated plants worldwide

Институт, страна	Экс-планты	Материал	Таксон – род (вид)	Число образцов in cryo	Метод крио	Ссылка
IRD, Франция	Семена	Сорта и гибриды кофе	<i>Coffea</i> L.	500	De	Niino, Valle Arizaga, 2015
NBPGR, Индия	Спящие почки	Сорта и гибриды шелковицы	<i>Morus</i> L.	329		Niino, Valle Arizaga, 2015
NIAS, Япония	Спящие почки	Сорта и гибриды шелковицы	<i>Morus</i> L.	1236	SF	Niino, Valle Arizaga, 2015
NCGRP, США	Спящие почки	Сорта и гибриды яблони	<i>Malus</i> Mill.	2200		Forsline et al., 1999
NCGRP/ NCGR, США	<i>In vitro</i> апексы	Сорта и гибриды сливы	<i>Pyrus</i> L.	100	SF	Niino, Valle Arizaga, 2015
NICS, RDA, Корея	Ростки лука-ковиц	Сорта лука и чеснока, гибриды	<i>Allium</i> L.	1158	DV	Kim et al., 2012a
INIBAP, Бельгия	<i>In vitro</i> апексы	Сорта и гибриды банана	<i>Musa</i> L.	1536	DV	van Hoeyveld, Bollen, 2017
GFG, Германия	<i>In vitro</i> апексы	Сорта и гибриды земляники	<i>Fragaria</i> L.	194	V	Höfer, Hanke, 2017
CIAT, Колумбия	<i>In vitro</i> апексы	Сорта маниока съедобного	<i>Manihot</i> Mill. (<i>M. esculenta</i> Crantz)	540	DV	Gonzalez-Arno et al., 2008
IPK, Германия	<i>In vitro</i> апексы	Сорта чеснока	<i>Allium</i> L. (<i>A. sativum</i>)	101	DV	Keller et al., 2016
IPK, Германия	<i>In vitro</i> апексы	Селекционные сорта картофеля	<i>Solanum</i> L.	1560	Dr	Börner, 2017, personal comm.
CIP, Перу	<i>In vitro</i> апексы	Аборигенные сорта картофеля	<i>Solanum</i> L.	1533	DV	Vollmer et al., 2017
USPG, США	<i>In vitro</i> апексы	Селекционные сорта картофеля	<i>Solanum</i> L.	332	DV	Jenderek, Reed, 2017
ВИР, Россия	<i>In vitro</i> апексы	Аборигенные и селекционные сорта картофеля	<i>Solanum</i> L.	216	DV	Gavrilenko et al., 2018
NAC, Корея	<i>In vitro</i> апексы	Селекционные сорта картофеля	<i>Solanum</i> L.	130	DV	Kim et al., 2006
CAES, Япония	<i>In vitro</i> апексы	Сорта и гибриды картофеля	<i>Solanum</i> L.	100	EV	Hirai, 2011
NLGRP, США	<i>In vitro</i> апексы	Сорта малины и ежевики, гибриды	<i>Rubus</i> L.	209	DV	Jenderek, 2017, personal comm.

Методы криоконсервации: SF – медленное замораживание, De – дегидратация, V – витрификация, EV – инкапсуляция-витрификация, Dr – дроплет-метод, DV – дроплет-витрификация. Генбанки: CIP – International Potato Center, Перу; IPK – Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Германия; CAES – Central Agricultural Experiment Station, Hokkaido Research Organization, Япония; USPG – US Potato Genebank, США; ВИР – Всероссийский институт генетических ресурсов растений, Россия; NCGR – National Clonal Germplasm Repository, США; NCGRP – National Center for Genetic Resources Preservation, США; NLGRP – National Laboratory for Genetic Resources Preservation, США; IRD – Institute de Recherche pour le Développement, Франция; NIAS – National Institute of Agrobiological Sciences, Япония; INIBAP – International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Бельгия; CIAT – International Center for Tropical Agriculture, Колумбия; NICS RDA – National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Корея; GFG – German Fruit Genebank, Германия.

Метод Cryo-plate, сочетающий приемы инкапсуляции-дегидратации и дроплет-витрификации, является самым новым (Yamamoto et al., 2011, 2012, 2015; Valle Arizaga et al., 2017). В этом методе апексы микропобегов *in vitro* растений прикрепляют тонким слоем альгината кальция к алюминиевым крио-пластинам, обрабатывают

их растворами LS и PVS, а затем быстро погружают крио-пластины в жидкий азот (Yamamoto et al., 2011).

Методы криоконсервации продолжают совершенствоваться в направлениях упрощения исполнения и повышения результативности показателей посткриогенного восстановления меристем.

Отметим, что технологии криоконсервации растений получили мощное развитие за последние 30–50 лет. Так, первые успешные опыты по криоконсервации были проведены в 1960 году Sakai для черенков тутовника с использованием метода медленного замораживания (Sakai, 1960). С тех пор технологии криоконсервации быстро развивались и в настоящее время широко используются для самых разных видов растений (Reed, 2008; Gonzalez-Arno et al., 2008, 2014; Cruz-Cruz et al., 2013; Wang et al., 2014; Panta et al., 2015; Panis et al., 2016). Однако крупных представительных криоколлекций в мире не так много (см. табл. 1).

Факторы, влияющие на показатели посткриогенной регенерации

Типы эксплантов, используемые для криоконсервации растений. В качестве эксплантов для криоконсервации используют различные органы *in vivo* и *in vitro* растений, а также клеточные и тканевые культуры. У *in vivo* растений криоконсервируют семена, пыльцу, черенки, спящие почки. Криоконсервацию пыльцы несложно проводить, поскольку нет необходимости в использовании криопротекторов, т. к. содержание свободной воды в пыльцевых зернах крайне мало. Препараты пыльцы могут быть возвращены из криобанков селекционерам (Ganeshan et al., 2008) в случае выпадения необходимого образца из *in vitro* или полевой коллекции. Однако подчеркнем, что при этом образец сохраняется в генбанке на стадии гаметофита.

Криоконсервация ортодоксальных семян дает хорошие результаты, поскольку естественное содержание влаги в таких семенах составляет 12–19%, и они легко переносят высушивание до 5–10% (Panis, Lambardi, 2005; Pоров, 2008). Отметим, что методы криоконсервации ортодоксальных семян целесообразно применять только для редких, исчезающих видов. Для длительного и среднесрочного хранения образцов ортодоксальных семян большинства видов растений наиболее эффективно использовать систему низкотемпературного хранения. Например, в ВИР коллекции образцов ортодоксальных семян разных видов сохраняются при +4... –10... –18°C. Для видов с рекальцитрантными семенами (ряд тропических древесных культур), которые часто имеют большие размеры, использование методов обезвоживания проблематично. Поэтому для криосохранения рекальцитрантных семян в качестве эксплантов выбирают изолированные зародыши или апикальные меристемы побега (FAO, 2014).

Криоконсервация спящих почек используется в основном для древесных плодовых культур умеренного климата, в частности, яблони (Forstline et al., 1999; Towill et al., 2004; Volk et al., 2008; Lambardi et al., 2009; Höfer, 2015). Однако для древесных тропических культур данный метод не подходит. В то же время, криоконсервация спящих почек предполагает два варианта посткриогенного восстановления: либо проведение прививки (окулировки) разможенной почки, либо введение ее в культуру *in vitro*. Следует отметить, что методы прививки адаптированы не для

всех культур, в основном – для древесных. При оттаивании спящих почек и введении их в культуру *in vitro* наблюдается большой выпад материала в связи с высоким уровнем контаминации эксплантов (Towill, Ellis, 2008).

Преимуществом криоконсервации образцов *in vitro* коллекций является возможность долгосрочного хранения при сверхнизких температурах эксплантов оздоровленных растений (Gavrilenko et al., 2007). В системе *in vitro* в качестве эксплантов для криоконсервации используют апикальные меристемы, вегетативные почки, апексы побегов микрорастений, зародыши (половые и соматические), каллусы, клеточные суспензии, протопласты (Benson et al., 1996; IPGRI, 2000; Gonzalez-Arno et al., 2014). Криоконсервацию каллусов и клеточных суспензий, протопластов проводят в основном для сохранения коллекций биопродуцентов, например, женьшеня (Pоров et al., 2006; Gonzalez-Arno et al., 2014).

Для криоконсервации большинства вегетативно размножаемых культур из *in vitro* коллекций используют как верхушечные (апикальные), так и пазушные (аксиллярные) почки микрорастений. Так, в оригинальном протоколе дроблет-витрификации в качестве эксплантов были использованы только верхушечные почки микрорастений банана размером 1 мм (Panis et al., 2005). Для криоконсервации образцов картофеля Panta с коллегами (2014, 2015) брали верхушечные почки микрорастений размером 1,8–2,5 мм, включая конус нарастания и 4–5 примордиев. Другие авторы (Schäfer-Menuhr et al., 1994; Kaczmarczyk et al., 2008) использовали экспланты практически такого же размера для криоконсервации картофеля дроблет-методом. Экспланты представляли собой верхушки побега микрорастений картофеля (shoot tip), включающие верхушечную почку с частью стебля (Schäfer-Menuhr et al., 1994; Kaczmarczyk, 2008).

Ряд авторов сообщал об отсутствии достоверных различий в уровнях регенерации после оттаивания верхушечных и пазушных почек (Hirai, Sakai, 1999; Lee et al., 2011; Ozudogru et al., 2011; Shvachko, Gavrilenko, 2011; Coste et al., 2012; Shvachko, 2012). Другие авторы (Halmagyi et al., 2005; Yoon et al., 2006) отмечают существенно более высокую способность к регенерации верхушечных почек (Schäfer-Menuhr, 1997; Ukhatoва et al., 2017b).

Различные способы предобработки исходных микрорастений – источников эксплантов для криоконсервации – также влияют на эффективность регенерации после оттаивания. В ряде работ отмечено положительное влияние на регенерацию: холодового закаливания (Reed, 1993; Kaczmarczyk et al., 2008), добавления в питательную среду повышенной концентрации сахарозы (sucrose preculture) (Panis et al., 2005; Nukari et al., 2011), витаминов – E, C и антиоксидантов (липоевой кислоты, глутатиона, глицина, бетаина) (Uchendu et al., 2010a, b). Folgado et al. (2015) изучали два варианта предобработки исходных *in vitro* растений – холодовое закаливание и ‘sucrose preculture’, и выявили накопление растворимых сахаров в растительном материале, изменения качественного и количественного

состава белков углеводного обмена, стрессовых белков и белков окислительного гомеостаза (Folgado et al., 2013, 2015), что обуславливало различия в криорезистентности изученных образцов.

В последнее время появляется все больше работ по криоконсервации разных видов растений, в которых достигнуты высокие показатели посткриогенной регенерации ции эксплантов без этапа холодового закаливания исходных микрорастений (Condello et al., 2011b; Vujović et al., 2011; Ružić, Vujović, 2012; Ružić et al., 2013; Souza et al., 2016; Ukhatova et al., 2017a).

Большое влияние на посткриогенную регенерацию оказывает **длительность обработки эксплантов криопротекторами** – витрифицирующими растворами PVS2 (Sakai et al., 1990) или PVS3 (Nishizava et al., 1993), причем PVS2 используется в большинстве работ. В зависимости от вида растения и размера экспланта необходима разная длительность обработки эксплантов раствором PVS2, которая сильно влияет на выживаемость после оттаивания (Sakai et al., 2008). Так, например, для меристем *in vitro* растений банана оптимальное время обработки раствором PVS2 при использовании метода капель-витрификации составляло 30–50 минут при 0°C (Panis et al., 2005). Для незакаленных пазушных почек микрорастений яблони наиболее высокий уровень регенерации после оттаивания был получен после применения 60-минутной инкубации почек в растворе PVS2 (Condello et al., 2011a). Для апексов микропобегов розы обработка PVS2 более 20 минут сильно повреждала ткани (Halmagyi, Pinker, 2006). В случае эксплантов малины криоконсервация методом витрификации со стадией 20-минутной экспозиции в растворе PVS2 при комнатной температуре позволила получить до 71% выживших эксплантов (Gupta, Reed, 2006). По данным Kim с соавторами (2006) выживаемость апексов микропобегов картофеля, криоконсервированных методом капель-витрификации, существенно снижалась после 20 минут обработки раствором PVS2. В то же время в более поздних публикациях сообщается об успешном применении метода капель-витрификации, включающем этап 50-минутной инкубации микропобегов картофеля в растворе PVS2 при 0°C (Panta et al., 2014, 2015). В ВИР используется модификация метода капель-витрификации DV-biotech с 30-минутной инкубацией эксплантов в растворе PVS2 при 0°C (Dunaeva et al., 2011; Schvachko, 2012; Ukhatova et al., 2017b).

В разных лабораториях для посткриогенной регенерации используют **питательные среды с разным составом фитогормонов**, в том числе для одних и тех же видов растений. Так, например, в случае картофеля использовали среду МС с кинетином и гибберелловой кислотой (ГК) (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016), либо среду МС с индолил-уксусной кислотой (ИУК), зеатином-рибозидом и ГК в разных концентрациях (Kim et al., 2006, 2012b; Wang et al., 2014). Однако при всех различиях в фитогормональном составе питательных сред на этапе подготовки

исходных микрорастений и этапе посткриогенной регенерации в качестве базовой среды всегда используется состав Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962).

Влияние межвидовых различий на эффективность регенерации эксплантов после оттаивания обсуждается в многих статьях, однако в большинстве работ сравнительное изучение проведено для единичных образцов разных видов. Ниже мы приведем данные, полученные для представительных выборок разных видов.

Не выявлены статистически достоверные различия по регенерационной способности образцов различных триплоидных видов банана, отличающихся геномным составом (AAA, AAB, ABB) (Panis et al., 2005). R. Vollmer с соавторами (2016) не обнаружили существенных различий в показателях регенерации после оттаивания образцов двух триплоидных культурных видов картофеля *S. chaucha* и *S. juzepczukii*, а также образцов трех диплоидных культурных видов – *S. ajanhuiri*, *S. stenotomum* и *S. phureja* (Vollmer et al., 2016). В этой же работе показано, что частота регенерации образцов аборигенного чилийского картофеля – *S. tuberosum* ($2n = 4x$) – существенно превышала соответствующие показатели у представителей близкого культурного вида *S. stenotomum* ($2n = 2x$). Bouafia et al. (1996) сообщают о существенных отличиях в уровне посткриогенной регенерации образцов двух видов – *S. tuberosum* ($2n = 4x$) и *S. phureja* ($2n = 2x$). Однако такое сравнение не совсем корректно, поскольку эти близкие культурные виды картофеля отличаются по уровню плоидности и эколого-географической приуроченности.

В ряде работ отмечены существенные различия в частотах выживаемости и регенерации после замораживания-оттаивания между разными генотипами одного и того же вида, отличающихся по уровню плоидности. Так, например, в опытах по криоконсервации гетероплоидных каллусов люцерны, размороженных после 27 лет хранения в жидком азоте, погибали в основном полиплоидные клетки; криорегенеранты были получены из диплоидных клеток (эу- и анеуплоидных, $2n = 2x \pm$); авторы полагают, что причиной гибели преимущественно полиплоидных клеток являлся осмотический стресс (Volkova et al., 2015).

Таким образом, вопрос о влиянии на показатели выживаемости и регенерации после замораживания-оттаивания видовых особенностей и/или уровня плоидности растений остается открытым. Отметим, что в перечисленных выше работах не объясняются причины возможных различий в криорезистентности диплоидных и полиплоидных растений (клеток). В этой связи приведем результаты работы Н. И. Ненько с соавторами (Nenko et al., 2015), в которой проведены физиолого-биохимические и анатомо-морфологические исследования листового аппарата диплоидных и триплоидных сортов яблони в жаркие и засушливые летние сезоны. Авторы отмечают, что у триплоидных сортов яблони выявлено повышенное содержание

связанной формы воды, пролина, катионов калия по сравнению с диплоидными. Биометрические параметры (толщина листовой пластинки, кутикулы и верхнего эпидермиса) у триплоидных сортов яблони также имели существенно более высокие значения соответствующих показателей по сравнению с диплоидными сортами. По мнению авторов, комплекс этих параметров и обеспечивает триплоидным сортам яблони большую экологическую пластичность по сравнению с диплоидными (Nenko et al., 2015). Возможно, что с этими факторами могут быть связаны и различия в криорезистентности полиплоидных и диплоидных растений (клеток) в экспериментах по криоконсервации. Кроме того, возможно, полиплоидные образцы имеют более высокие дозы генетических факторов (аллелей, QTLs), контролирующей устойчивость к абиотическим стрессорам. В любом случае этот вопрос требует дополнительного изучения.

Kaczmarczyk et al. (2008) и Vollmer et al. (2017) сообщают о существенных различиях в криорезистентности образцов разных видов **различного эколого-географического происхождения**. В других работах не выявлено достоверных различий в посткриогенной регенерации между образцами близких культурных видов картофеля, собранными в высокогорных областях и в прибрежных районах (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016). В подавляющем большинстве работ по криоконсервации больших выборок образцов одного и того же вида, одного и того же уровня плоидности и общего эколого-географического происхождения установлено существенное влияние **генотипических отличий** на способность к посткриогенному восстановлению (Kaczmarczyk et al., 2008; Gonzalez-Arno et al., 2014; Niino, Valle Arizaga, 2015; Bamberg et al., 2016).

Регламенты и стандарты для формирования криоколлекций

Вопросы о стандартах и регламенте закладки образцов растений на длительное криохранение активно обсуждаются в литературе (Dussert et al., 2003; Keller et al., 2011; Volk et al., 2016). Минимальные значения посткриогенной регенерации четко не регламентированы, однако они имеют большое значение для определения числа надежно сохраняемых *in situ* эксплантов каждого коллекционного образца. Ранее международная организация по сохранению биоразнообразия (IPGRI) рекомендовала криобанкам пополнять криоколлекции образцами, уровень посткриогенной регенерации которых составляет не менее 20% (IPGRI, 2000).

S. Dussert с коллегами (2003) опубликовали в журнале «Cryoletters» статью, в которой приведены статистические расчеты минимально допустимого уровня регенерации после оттаивания для обеспечения безопасности хранения криоконсервированных эксплантов, которые могут служить моделью при создании криоколлекций. Эти авторы рассчитали взаимосвязь между количеством сохраняемых эксплантов и величиной минимально допустимой частоты регенерации, и показали, что эта частота должна состав-

лять 39% от общего количества всех криоконсервированных эксплантов (Dussert et al., 2003). В этом случае вероятность получения как минимум одного регенеранта из каждой криопробирки составляет 0,95. Следует отметить, что 100 эксплантов каждого образца распределяются по 10 криопробиркам. Такой подход позволяет не только сохранить образец в криобанке, но и изымать по необходимости часть материала для мониторинга регенерационной способности данного образца после одного года, 10 и 25 лет криосохранения.

Подобные расчеты приведены и в работе Volk et al. (2016), в которой показано, что при исходной частоте регенерации 35% и выше из одной криопробирки с вероятностью 95% может регенерировать как минимум один эксплант (в каждой криопробирке сохраняется по 10 эксплантов). Авторы (Volk et al., 2016) приводят следующий пример: для получения после оттаивания 50 жизнеспособных эксплантов (с вероятностью 0,95) у определенного образца требуется заложить в криобанк как минимум 120, 150, 210 или 310 эксплантов, в зависимости от уровня их посткриогенной регенерации: 50, 40, 30 и 20%, соответственно (Volk et al., 2016).

Следуя этим расчетам, в генбанке ИРК сохраняют *in cryo* по 200 эксплантов каждого образца. Эту выборку разделяют на две равные части по 100 эксплантов (10 криопробирок по 10 эксплантов в каждой). Дополнительно 100 эксплантов (2×50) используют для контроля уровня регенерации (Keller et al., 2011). Итого для одного образца используют 300 эксплантов. Это позволяет обеспечить безопасное хранение всего материала, частота регенерации которого составляет не менее 10%. Для безопасного хранения растительного материала, уровень регенерации которого достигает 30% и выше, *in cryo* закладывают в два раза меньше эксплантов – по 100 на образец, и изучают уровень регенерации у 50 эксплантов (Keller et al., 2011).

По данным В. Panis с соавторами (2016), в Международном центре Bioversity International при пополнении криоколлекции банана соблюдают два условия: проведение трех независимых повторностей для криоконсервации каждого образца, в каждой из которых допустимый уровень регенерации эксплантов - не ниже 39%.

В ведущем генбанке картофеля CIP (Перу) криоконсервируют по 150 эксплантов на образец, 30 из которых используют для контроля частоты регенерации после оттаивания. О необходимости проведения криоконсервации дополнительных эксплантов судят по результатам первой повторности: если частота регенерации превышает 30%, то вторую повторность не делают. Если частота регенерации составляет 20–30% – выполняют вторую повторность, если ниже 20%, то для таких образцов подбирают более специфичный протокол (Vollmer et al., 2016, 2017).

Таким образом, разные генбанки используют различные регламенты и применяют разные подходы к логистике формирования криоколлекций. Общим остается принцип статистических подсчетов: за их основу берется уровень регенерации образца после оттаивания и допустимое число криосохраняемых эксплантов.

Регламенты закладки на длительное хранение в криобанк ВИР образцов из *in vitro* коллекции приведены в таблице 2. Криоконсервация апексов микрорастений из *in vitro* коллекции ВИР проводится с использованием оригинальной модификации метода дроблет-витрификации, разработанной в отделе биотехнологии ВИР (Shvachko, Gavrilenko, 2011; Dunaeva et al., 2011; Shvachko, 2012; Ukhatova et al., 2017 a, b). С использованием этого метода проводится криоконсервация апексов микрорастений из *in vitro*

коллекции ВИР. В настоящее время в криобанке ВИР сохраняется 220 образцов культурных видов картофеля и 17 образцов малины и ежевики, каждый образец представлен 90 эксплантами (в 9 криопробирках) с известным уровнем посткриогенной регенерации. Регламенты закладки на длительное хранение в криобанк ВИР апексов микрорастений образцов картофеля и малины приведены в таблице 2.

Таблица 2. Регламент закладки образцов в виде апексов микропобегов на длительное хранение в криобанке ВИР
Table 2. Regulations for the long-term cryopreservation of accessions in the form of microplant apices in the VIR cryobank

Для криоконсервации и криохранения одного коллекционного образца необходимо 180 эксплантов (апексов микрорастений)		
КОНТРОЛЬ: (без погружения эксплантов в азот)	КРАТКОСРОЧНАЯ КРИОКОНСЕРВАЦИЯ: (погружение эксплантов в жидкий азот на 1 час)	ДЛИТЕЛЬНАЯ КРИОКОНСЕРВАЦИЯ: (долгосрочное хранение эксплантов в криобанке)
30 эксплантов (10x3)	60 эксплантов (20x3)	90 эксплантов (30x3)
изучение регенерационной способности эксплантов без замораживания в трех повторностях по 10 эксплантов в каждой	изучение регенерационной способности после оттаивания в трех повторностях по 20 эксплантов в каждой	пополнение криоколлекции ВИР: в трех повторностях по 30 эксплантов (3 криопробирки по 10 эксплантов) в каждой

Исходя из вышесказанного, образцы картофеля в криоколлекции ВИР были дифференцированы на три группы:

А) образцы с высоким уровнем регенерационной способности – выше 40%;

Б) образцы, уровень регенерации которых составил 21–39%;

В) образцы, регенерационная способность которых была ниже 20%.

В группу А вошли 77,3% криоконсервированных образцов, в группу Б – 19% образцов, в группу В – 3,7% образцов криоколлекции картофеля.

Отметим, что помимо криоколлекций картофеля и малины, создаваемых с использованием метода дроблет-витрификации апексов микрорастений, в криобанке ВИР сохраняются образцы различных плодовых и ягодных культур, криоконсервация которых проведена на основе метода медленного (многоэтапного программного замораживания) черенков и почек растений из полевого генбанка ВИР, а также образцы пыльцы (Verzhuk et al., 2012). Регламенты для формирования этих криоколлекций в криобанке ВИР находятся на стадии разработки.

Можно заключить, что несмотря на большое число разработанных к настоящему времени методов криоконсервации и их модификаций для разных видов растений,

задача создания больших криоколлекций с высоким уровнем посткриогенной регенерации образцов, представляющих меж- и внутривидовое разнообразие культивируемых видов растений, остается актуальной и пока труднодостижимой для многих культур.

Благодарности: авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику лаборатории длительного хранения семян кадн. с.-х. Филипенко Г. И. за ценные замечания. Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме № 0662-2018-0004 «Совершенствование стратегии, теории, методов и технологий *ex situ* хранения генетических ресурсов растений без потери их жизнеспособности», номер государственной регистрации ЕГИСУ НИОКР: АААА-А16-116040710363-2.

References/Литература

- Arakawa T., Carpenter J. F., Kita Y. A., Crowe J. H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // *Cryobiology*. 1990, vol. 27, pp. 405–415.
- Belous A. M., Grishchenko V. I. *Cryobiology* // Kiev, 1994, 432 pp. [in Russian] (Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология // Киев, 1994. 432 с.)
- Bamberg J. B., Martin M. W., Abad J., Jenderek M. M., Tanner J., Donnelly D. J., Nassar M. K., Veilleux R. E., Novy R. G. *In vitro* technology at the US Potato Genebank // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* –

- Plant. 2016, vol. 52, no. 3, pp. 213–225. DOI 10.1007/s11627-016-9753-x.
- Benson E. E. Cryoconserving algal and plant diversity: historical perspectives and future challenges // In: Fuller B, Lane N, Benson EE (eds.) Life in the frozen state. London : CRC Press, 2004, pp. 299–328.
- Benson E. E. Cryopreservation theory // In: Reed B. M. (ed.) Plant cryopreservation: a practical guide. New York : Springer, 2008, pp. 15–32.
- Benson E. E., Wilkinson M., Todd A., Ekuere U., Lyon J. Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips // CryoLetters. 1996, vol. 17, pp. 119–128.
- Bouafia S., Jelti N., Lairy G., Blanc A., Bonnel E., Dereuddre J. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration // Potato Research. 1996, vol. 39, pp. 69–78.
- Condello E., Caboni E., André E., Piette B., Druart P., Swennen R., Panis B. Cryopreservation of *in vitro* axillary buds of apple following the droplet-vitrification method // CryoLetters. 2011a, vol. 32, no. 2, pp. 175–185.
- Condello E., Ruzić D., Panis B., Caboni E. Raspberry cryopreservation by droplet vitrification technique // Acta Hort. 2011b, vol. 918, pp. 965–969. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.918.127.
- Coste A., Halmagyi A., Butiuc-Keul A. L., Deliu C., Coldea G., Hurdu B. *In vitro* propagation and cryopreservation of Romanian endemic and rare *Hypericum* species // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2012, vol. 110, pp. 213–226.
- Cruz-Cruz C. A., Gonzalez-Arnao M. T., Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity // Resources. 2013, vol. 2, pp. 73–95.
- Dereuddre J., Scottez C., Arnaud Y., Duron M. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: effects of previous cold hardening // Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 1990, vol. 310, série III, pp. 317–323.
- Dunaeva S. E., Pendinen G. I., Antonova O. Ju., Shvachko N. A., Volkova N. N., Gavrilenko T. A. Preservation vegetatively propagated crops in the *in vitro* and cryocollection. Guidelines ed. by Gavrilenko T. A. (Sohranenie vegetativno rozmnozhaemykh kul'tur v *in vitro* i kriokollekcijah. Pod red. Gavrilenko T. A. Metodicheskie ukazaniya). GNU VIR Rossel'hozokademii Publ. St Petersburg : VIR, 2011, 64 p. [in Russian] (Дунаева С. Е., Пендинен Г. И., Антонова О. Ю., Швачко Н. А., Волкова Н. Н., Гавриленко Т. А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях: методические указания / Под редакцией Т. А. Гавриленко. СПб. : ГНУ ВИР Россельхозакадемии, 2011. 64 с.)
- Dussert S., Engelmann F., Noirot M. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections // CryoLetters. 2003, vol. 24, no. 3, pp. 149–160.
- Engelmann F. Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters // Acta Hort. 2014, vol. 1039, pp. 31–39.
- Fabre J., Dereuddre J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoots tips // CryoLetters. 1990, vol. 11, pp. 413–426.
- FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome. 2014, 182 p.
- Feng C., Wang R., Li J., Wang B., Yin Z., Cui Z., Li B., Bi W., Zhang Z., Li M., Wang Q. C. Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of *in vitro*-grown shoot tips // In: Lombardi M., Ozudogru E. A., Jain S. M. (eds.) Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology. New York : Spinger, 2013, vol. 994, pp. 463–482.
- Filipenko G. I. Development of the system of low-temperature storage and cryopreservation of plant genetic resources at VIR // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2007, vol. 164, pp. 263–272 [in Russian] (Филипенко Г. И. Развитие системы низкотемпературного хранения и криоконсервации генофонда растений в ВИР имени Н. И. Вавилова // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2007. Т. 164. С. 263–272).
- Finkle B. J., Ulrich J. H. Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells // Plant Physiol. 1979, vol. 63, pp. 598–604. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.63.4.598.
- Folgado R., Panis B., Sergeant K., Renaut J., Swennen R., Hausman J. F. Differential protein expression in response to abiotic stress in two potato species: *Solanum commersonii* Dun and *Solanum tuberosum* L. // Int. J. Mol. Sci. 2013, vol. 14, pp. 4912–4933.
- Folgado R., Panis B., Sergeant K., Renaut J., Swennen R., Hausman J. F. Unravelling the effect of sucrose and cold pretreatment on cryopreservation of potato through sugar analysis and proteomics // Cryobiology. 2015, vol. 71, pp. 432–441. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.09.006.
- Forsline P. L., McFerson J. R., Lamboy W. F., Towill L. E. Development of base and active collections of *Malus* germplasm with cryopreserved dormant buds // Acta Hort. 1999, vol. 484, pp. 75–78.
- Gallard A., Panis B., Dorion N., Swennen R., Grapin A. Cryopreservation of *Pelargonium* spices by droplet-vitrification // CryoLetters. 2008, vol. 29, no. 3, pp. 243–251.
- Ganeshan S., Rajasekharan P. E., Shashikumar S., Decruze W. Cryopreservation of pollen // In: Reed B. M. (ed.) Plant cryopreservation: a practical guide. New York : Springer, 2008, pp. 443–464.
- Gavrilenko T., Dunaeva S., Truskinov E., Antonova O., Pendinen G., Lupisheva J., Rogovaja V., Shvachko N. Strategy of long-term conservation of germplasm of vegetatively propagated crops under controlled conditions // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Plant Breeding. 2007, vol. 164, pp. 273–285 [in Russian] (Гавриленко Т., Дунаева С., Трускинов Э., Антонова О., Пендинен Г., Лупышева Ю., Роговая В., Швачко Н. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2007, Т. 164, С. 273–285).
- Gavrilenko T., Ukhatova Yu., Shvachko N., Antonova O., Volkova N., Klimenko N. Creation of potato cryocollection at VIR // Abstract Book 10th WPC–XXVIII ALAP 2018 Congress: biodiversity, food Security and business. Cusco, Peru. 27–31 of May 2018, p. 154.
- Golmirzaie A. M., Panta A. Advances in potato cryopreservation at CIP // In: Engelmann F., Takagi H. (eds.) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. 2000. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, pp. 250–254.
- Gonzalez-Arnao M. T., Martinez-Montero M. E., Cruz-Cruz C. A., Engelmann F. Advances in Cryogenic Techniques for the Long-Term Preservation of Plant Biodiversity // Chapter 8 in: Springer International Publishing Switzerland Ahuja M. R., Ramawat K. G. (eds.), Biotechnology and Biodiversity, Sustainable Development and Biodiversity. 2014, vol. 4, pp. 129–170. DOI 10.1007/978-3-319-09381-9_8.
- Gonzalez-Arnao M. T., Panta A., Roca W. M., Escobar R. H., Engelmann F. Development and large-scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008, vol. 92, pp. 1–13.
- Gupta S., Reed B. M. Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification // CryoLetters. 2006, vol. 27, no. 1, pp. 29–42.
- Halmagyi A., Pinker I. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2006, vol. 84 no. 2, pp. 100129–100137.
- Halmagyi A., Deliu C., Coste A. Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method // CryoLetters. 2005, vol. 26, no. 5, pp. 313–322.
- Hirai D., Sakai A. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation vitrification // Potato Research. 1999, vol. 42, pp. 153–160.
- Hirai D., Sakai A. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification // In: Engelmann F., Takagi H. (eds.) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application.

2000. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba
- Hirai D. Gelled droplet vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm // *CryoLetters*. 2011, vol. 32, no. 4, pp. 287–296.
- Höfer M. Cryopreservation of winter-dormant apple buds: establishment of a duplicate collection of *Malus* germplasm // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015, vol. 121, no. 3, pp. 647–656. DOI: 10.1007/s11240-015-0735-1.
- Höfer M., Hanke M.V. Cryopreservation of fruit germplasm // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2017, vol. 53, no. 4, pp. 372–381. DOI: 10.1007/s11627-017-9841-6.
- IPGRI. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and applications // *Engelmann F., Takagi H.* (eds.). 2000, 496 p.
- Jenderek M. M., B. M. Reed Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2017, vol. 53, no. 4, pp. 299–308. DOI: 10.1007/s11627-017-9828-3.
- Kaczmarczyk A., Funnekotter B., Menon A., Phang P. Y., Al-Hanbali A., Bunn E., Mancera R. L. Current issues in plant cryopreservation // In: *Katkov I. I.* (ed.) Current frontiers in cryobiology. InTech, Rijeka. 2012, pp. 417–438. DOI: 10.5772/32860. ISBN 978-953-51-0191-8.
- Kaczmarczyk A., Shvachko N., Lupysheva Y., Hajirezaei M.-R., Keller E. R. J. Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips // *Plant Cell Rep.* 2008, vol. 27, no. 9, pp. 1551–1558. DOI: 10.1007/s00299-008-0574-1.
- Kaczmarczyk A. Physiological, biochemical, histological and ultrastructural aspects of cryopreservation in meristematic tissue of potato shoot tips // *Dissertation*. 2008, 100 p.
- Kaczmarczyk A., Rokka V.-M., Keller E. R. J. Potato Shoot Tip Cryopreservation. A Review // *Potato Research*. 2011, pp. 45–79.
- Keller E. R. J., Senula A., Zanke Ch., Grübe M., Kaczmarczyk A. Cryopreservation and *In Vitro* Culture – State of the Art as Conservation Strategy for Genebanks // *Acta Hort.* 2011, vol. 918, pp. 99–111.
- Keller E. R. J., Grübe M., Hajirezaei M.-R., Melzer M., Mock H.-P., Rolletschek H., Senula A., Subbarayan K. Experience in large-scale cryopreservation and links to applied research for safe storage of plant germplasm // *Acta Hort.* 2016, vol. 1113, pp. 239–250. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1113.36.
- Kim H. H., Popova E., Shin D. J., Yi J. Y., Kim C. H., Lee J. S., Yoon M. K., Engelmann F. Cryobanking of Korean *Allium* germplasm collections: results from a 10 year's experience // *CryoLetters*. 2012a, vol. 33, no. 1, pp. 45–57.
- Kim H. H., Yoon J. W., Park Y. E., Cho E. G., Sohn J. K., Kim T. S., Engelmann F. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification // *CryoLetters*. 2006, vol. 27, no. 4, pp. 223–234.
- Kim H. H., Popova E., Shin D. J., Bae C. H., Baek H. J., Park S. U., Engelmann F. Development of a droplet-vitrification protocol for cryopreservation of *Rubia akane* (Nakai) hairy roots using a systematic approach // *CryoLetters*. 2012b, vol. 33, no. 6, pp. 506–517.
- Kim H. H., Lee Y. G., Park S. U., Lee S. C., Baek H. J., Gwag J. G., Cho E. G., Engelmann F. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures // *CryoLetters*. 2009, vol. 30, no. 4, pp. 291–299.
- Lambardi M., Benelli C., De Carlo D., Previati A. Advances in the cryopreservation of fruit plant germplasm at the CNRIVALSA Institute of Florence // *Acta Hort.* 2009, vol. 839, pp. 237–244.
- Le Bras C., Le Besnerais P. H., Hamama L., Grapin A. Cryopreservation of ex-vitro grown *Rosa chinensis* 'Old Blush' buds using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2014, vol. 116, pp. 235–242. DOI: 10.1007/s11240-013-0400-5.
- Lee Y. G., Popova E., Cui H. Y., Kim H. H., Park S. U., Bae C. H., Lee S. C., Engelmann F. Improved cryopreservation of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using droplet-vitrification // *CryoLetters*. 2011, vol. 32, no. 6, pp. 487–497.
- Martinez-Montero M. E., Harding K. Cryobionomics: evaluating the concept in plant cryopreservation // In: *D. Barh* et al. (eds.) *PlantOmics: the omics of plant science*, Springer India. 2015, pp. 655–682. DOI: 10.1007/978-81-322-2172-2_23.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plantarum*. 1962, vol. 15, pp. 473–497.
- Nenko N. I., Kiseleva G. K., Karavaeva A. V., Ulyanovskaya E. V. Specific features of the water regime of apple varieties of various ploidy in connection with adaptation to drought [Electronic resource] // *Fruit growing and viticulture of the South of Russia*. 2015, vol. 31 (1), pp. 107–118 (Osobennosti vodnogo rezhima sortov yabloni razlichnoy ploidnosti v svyazi s adaptatsiyey k zasukhe // *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii*) [in Russian] (Ненько Н. И., Киселева Г. К., Каравеева А. В., Ульяновская Е. В. Особенности водного режима сортов яблони различной плоидности в связи с адаптацией к засухе [Электронный ресурс] // *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2015. № 31 (1). С. 107–118. URL: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/01/11.pdf>. (дата обращения: 28.06.2018).
- Niino T., Valle Arizaga M. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources // *Breed. Sci.* 2015, vol. 65, no. 1, pp. 41–52. DOI: 10.1270/jsbbs.65.41.
- Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzawa T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification // *Plant Sci.* 1993, vol. 91, no. 1, pp. 67–73. DOI: 10.1016/0168-9452(93)90189-7.
- Nukari A., Uosukainen M., Laamanen J., Rantala S. Cryopreservation of horticultural plants at MTT // In: *Grapin A., Keller E. R. J., Lynch P. T., Panis B., Revilla Bahillo A., Engelmann F.* (eds.) *Proceeding of the final meeting COST Action 871 CryoPlanet "Cryopreservation of crop species in Europe"*. 2011, pp. 93–97.
- Ozudogru E. A., Kirdok E., Kaya E., Capuana M., Benelli C., Engelmann F. Cryopreservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) *in vitro* buds using vitrification-based techniques // *CryoLetters*. 2011. V. 32. No. 2. Pp. 99–110.
- Panis B., Van den Houwe I., Swennen R., Rhee J., Roux N. Securing plant genetic resources for perpetuity through cryopreservation // *Indian J Plant Genet Resour.* 2016, vol. 29, no. 3, pp. 300–302.
- Panis B. Cryopreservation of *Musa* germplasm: 2nd edition // *Technical Guidelines No. 9 / Engelmann F., Benson E.* eds. Bioersivity International, Montpellier, France. 2009. 51 p.
- Panis B., Piette B., Swennen R. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae* // *Plant Sci.* 2005. V. 168. Pp. 45–55.
- Panis B., Lambardi M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees) // *The role of biotechnology*. 2005, pp. 43–54.
- Panta A., Panis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W. Development of a PVS2 droplet vitrification method for potato cryopreservation // *CryoLetters*. 2014, vol. 35, no. 3, pp. 255–266.
- Panta A., Panis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W., Tay D., Ellis D. Improved cryopreservation method for the long-term conservation of the world potato germplasm collection // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015, vol. 120, pp. 117–125.
- Pawłowska B., Szcwzyk-Taranek B. Droplet-vitrification cryopreservation of *Rosa canina* and *Rosa rubiginosa* using shoot tips from *in situ* plants // *Sci Hortic.* 2013, vol. 168, pp. 151–156. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.12.016.
- Popov A. S. Cryopreservation of plants and their cells // *Veterinary pathology*, 2008, vol. 2, pp. 158–160 [in Russian] (Понов А. С. Криосохранение растений и их клеток // *Ветеринарная патология*. 2008. № 2. С. 158–160).
- Popov A. S. Some mechanisms of *in vitro* plant cells cryodamage and the features of their cryopreservation // *Russian Journal of Plant Physiology*. 1993, vol. 40, no. 3, pp. 485–496 [in Russian] (Понов А. С. Некоторые механизмы криповреждений клеток растений *in vitro* и особенности их криосохранения // *Физиология растений*. 1993. Т. 40. № 3. С. 485–496).

- Popov A. S., Popova E. V., Nikishina T. V., Vysotskaya O. N. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences // International Journal of Refrigeration. 2006, vol. 29, no 3, pp. 403–410.
- Reed B. M., Chang Y. Medium- and long-term storage of *in vitro* cultures of temperate fruit and nut crops // In: Conservation of plant genetic resources *in vitro* / Razdan M. K., Cocking E. C. eds. 1997, vol. 1, pp. 67–103.
- Reed B. M. Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems // CryoLetters. 1988, vol. 9, pp. 166–171.
- Reed B. M., Lagerstedt H. B. Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen // HortScience. 1987, vol. 22, no. 2, pp. 302–303.
- Reed B. M. Improved survival of *in vitro*-stored *Rubus* germplasm // J Amer Soc Hort Sci. 1993, vol. 11, pp. 890–895.
- Reed B. M. Plant cryopreservation: A practical guide // Springer, New York. 2008, 496 p.
- Reed B. M., DeNoma J. Tissue Culture and Cryopreservation // In: Hummer K. (ed.) Corvallis repository annual report for 2012. United States Department of Agriculture. P. 29.
- Reed B. M. Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2017, vol. 53, no. 4, pp. 285–288. DOI: 10.1007/s11627-017-9851-4.
- Romadanova N., Kushnarenko S., Karasholakova L. Development of a common PVS2 vitrification method for cryopreservation of several fruit and vegetable crops // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2017, vol. 53, no. 4, pp. 382–393. DOI: 10.1007/s11627-017-9849-y.
- Ružić D., Vujović T. Cryopreservation *in vitro* of Blackberry 'Čačanska Bestrna' shoot tips by encapsulation dehydration // ActaHort. 2012, vol. 946, pp. 5–60. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.946.5.
- Ružić D., Vujović T., Cerović R. *In vitro* conservation of two plant species (*Prunus cerasifera* Ehrh. and *Rubus fruticosus* L.) shoot tips by encapsulation dehydration // Genetika. 2013, vol. 45, no. 1, pp. 1–10.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification // Plant Cell Rep. 1990, vol. 9, no. 1, pp. 30–33. DOI: 10.1007/bf00232130.
- Sakai A., Hirai D., Takao N. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols // In: Reed B. M. (ed.) Plant cryopreservation: A practical guide. Springer, USA. 2008, pp. 33–51.
- Sakai A. Survival of the twig of woody plants at -196°C // Nature. 1960, vol. 185, pp. 393–394.
- Sant R., Panis B., Taylor M., Tyagi A. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008, vol. 92, pp. 107–111.
- Schäfer-Menuhr A., Schumacher H. M., Mix-Wagner G. Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch Kryokonservierung der Meristeme in flüssigem Stickstoff // Landbauforschung Völkenrode. 1994, vol. 44, pp. 301–313.
- Schäfer-Menuhr A., Schumacher H. M., Mix-Wagner G. Long-term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot-tips in liquid nitrogen // Plant Genetic Resources Newsletter. 1997, vol. 111, pp. 19–24.
- Shvachko N. A. Izucheniye geneticheskogo raznoobraziya sortov kartofelya otechestvennoy seleksii na osnove SSR-analiza i sovershenstvovaniye metodov ex situ sokhraneniya sortovogo genofonda v kontroliruyemykh usloviyakh: avtoref. dno. ... kand. biol. nauk. SPb. : VIR. 2012. 25 p. [in Russian] (Швачко Н. А. Изучение генетического разнообразия сортов картофеля отечественной селекции на основе SSR-анализа и совершенствование методов *ex situ* сохранения сортового генофонда в контролируемых условиях: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб. : ВИР. 2012, 25 с.)
- Shvachko N., Gavrilenko T. Cryopreservation of potato landraces using droplet-vitrification method // In: Proceeding of COST Action 871 Cryopreservation of crop species in Europe Final meeting. Grapin A., Keller J., Lynch P., Panis B., Revilla A., Engelmann F. (eds.). Angers. 2011, pp. 135–137.
- Souza F. V., Ergun K., Viera De Jesus L., De Souza E. H., Amorim V., Skogerboe D. M., Matsumoto T., Alves A. A., Ledo C., Jenderek M. M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2016, vol. 124, pp. 351–360. DOI: 10.1007/s11240-015-0899-8.
- Steponkus P. L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation // Annu Rev Plant Phys. 1984, vol. 35, no. 1, pp. 543–584. DOI: 10.1146/annurev.pp.35.060184.002551
- Stock J., Senola A., Nagel M., Mock H.-P., Keller E R. J. A simple method for cryopreservation of shoot tips of *Arabidopsis* genotypes // CryoLetters. 2017, vol. 38, no. 5, pp. 364–371.
- Tannoury M., Ralambosoa J., Kaminski M., Dereuddre J. Cryopreservation by vitrification of coated shoot-tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultured *in vitro* // Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Parno. 1991, vol. 313, série III, pp. 633–638.
- Towill L. E., Ellis D. D. Cryopreservation of dormant buds // In: Reed B. M. (ed.) Plant cryopreservation: A practical guide. Springer, USA. 2008, pp. 421–442.
- Towill L. E., Forsline P. L., Walters C., Waddell J. W., Laufmann M. J. Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions // CryoLetters. 2004, vol. 25, no. 5, pp. 323–334.
- Tumanov I. I., Krasavtsev O. A., Khvalin N. N. Increase of frost resistance of birch and black currant to -254°C by hardening // Reports of Acad. Sciences of the USSR. T. 127, no. 6, 1959, pp. 1301–1303 (Tumanov I. I., Krasavtsev O. A., Khvalin N. N. Povysheniye morozostoykosti berezy i chernoy smorodiny do -254°C putem zakalivaniya // Doklady Akad. Nauk SSSR. 1959, vol. 127, no. 6, pp. 1301–1303) [in Russian] (Туманов И. И., Красавцев О. А., Хвалин Н. Н. Повышение морозостойкости березы и черной смородины до -254°C путем закаливания // Доклады Акад. Наук СССР, 1959. Т. 127, № 6, С. 1301–1303).
- Uchendu E. E., Muminova M., Gupta S., Reed B. M. Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2010a, vol. 46, pp. 386–393. DOI: 10.1007/s11627-010-9292-9.
- Uchendu E. E., Leonard S. W., Traber M. G., Reed B. M. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation // Plant Cell Rep. 2010b, vol. 29, pp. 25–35.
- Ukhatova Y. V., Dunaeva S. E., Antonova O. Y., Apalikova O. V., Pozdniakova K. S., Novikova L. Y., Shuvalova L. E., Gavrilenko T. A. Cryopreservation of red raspberry cultivars from the VIR *in vitro* collection using a modified droplet-vitrification method // In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant. 2017a, vol. 53, no. 4, pp. 394–401. DOI: 10.1007/s11627-017-9860-3.
- Ukhatova Yu. V., Owes E. V., Volkova N. N., Gavrilenko T. A. Cryoconservation of potato breeding cultivars at VIR // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2017b, vol. 178, no. 3, pp. 13–20 [in Russian] (Ухатова Ю. В., Овес Е. В., Волкова Н. Н., Гавриленко Т. А. Криоконсервация селекционных сортов картофеля в ВИРе // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2017. Т. 178. № 3. С. 13–20). DOI: 10.30901/2227-8834-2017-3-13-20.
- Valle Arizaga M., Villalobos Navarro O. F., Castillo Martinez C. R., Cruz Gutiérrez E. J., López Delgado H. A., Yamamoto S., Watanabe K., Niino T. Improvement to the D cryo-plate protocol applied to practical cryopreservation of *in vitro* grown potato shoot tips // The Horticulture Journal Preview. 2017, vol. 86, pp. 222–228.
- Van Hoeyveld B., K. Bollen. World's largest banana gene bank celebrates 30th anniversary. <https://nieuws.kuleuven.be/en/content/2017/worlds-largest-banana-genebank-celebrates-30th-anniversary> (23-06-2018).
- Verzhuk V. G., Filipenko G. I., Pavlov A. V. Cryopreservation of vegetative buds of sweet and sour cherry using cryoprotectors // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2015, vol. 29, no. 7, pp. 65–67 [in Russian] (Вержук В. Г., Филипенко Г. И., Павлов А. В. Криоконсервация вегетативных почек черешни и

- вишни с использованием криопротекторов // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т. 29. № 7. С. 65–67).
- Verzhuk V. G., Filipenko G. I., Pavlov A. V., Porotnikov I. V., Bondaruk D. D. Effect of light and sucrose concentration in germination medium on germination of apple pollen // The way of science. 2016, no. 3, pp. 14–19 [in Russian] (Вержук В. Г., Филипенко Г. И., Павлов А. В., Поротников И. В., Бондарук Д. Д. Влияние света и концентрации сахарозы в среде проращивания на прорастание пыльцы яблони // Путь науки. 2016. № 3. С. 14–19).
- Verzhuk V. G., Filipenko G. I., Safina G. F., Pavlov A. V., Zhestkov A. S. Cryopreservation is an effective method of fruit crops genetic resources conservation // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2012, vol. 169, pp. 270–279 [in Russian] (Вержук В. Г., Филипенко Г. И., Сафина Г. Ф., Павлов А. В., Жестков А. С. Криоконсервация – эффективный метод сохранения генетических ресурсов плодовых и ягодных культур // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2012. Т. 169. С. 270–279).
- Verzhuk V. G., Filipenko G. I., Tikhonova N. G., Zhestkov A. S., Lupysheva Yu. V., Pupkova N. A., Mikhailova E. V., Savelyev N. I., Dorokhov D. S. Developing techniques for cryopreservation of fruit and berry genetic resources // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2009, vol. 166, pp. 353–357 [in Russian] (Вержук В. Г., Филипенко Г. И., Тихонова Н. Г., Жестков А. С., Лупышева Ю. В., Пупкова Н. А., Михайлова Е. В., Савельев Н. И., Дорохов Д. С. Разработка методов криосохранения генетических ресурсов растений плодовых и ягодных культур // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2009. Т. 166. С. 353–357).
- Volk G. M., Waddell J., Bonmart R., Towill L., Ellis D., Luffmann M. High viability of dormant *Malus* buds after 10 years of storage in liquid nitrogen vapor // CryoLetters. 2008, vol. 29, no. 2, pp. 89–94.
- Volk G. M., Henk A. D., Jenderek M. M., Richards C. M. Probabilistic viability calculations for cryopreserving vegetatively propagated collections in genebanks // Genet Resour Crop Ev. 2016, vol. 64, no. 7, pp. 1613–1622. DOI: 10.1007/s10722-016-0460-6.
- Volkova L. A., Urmantseva V. V., Burgutin A. B., Nosov A. M. Recovery of cytogenetic and physiological characteristics of a population of alfalfa cells after cryogenic storage // Russian Journal of Plant Physiology. 2015, vol. 62, no. 5, pp. 676–683.
- Vollmer R., Villagaray R., Egusquiza V., Espirilla J., Garcia M., Torres A., Rojas E., Panta A., Barkley N. A., Ellis D. The potato cryobank at the International Potato Center (CIP) : a model for long term conservation of clonal plant genetic resources collections of the future // CryoLetters. 2016, vol. 37, no. 5, pp. 318–329.
- Vollmer R., Villagaray R., Cárdenas J., Castro M., Chávez O., Anglin N. L., Ellis D. A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP) // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2017, vol. 53, no. 4, pp. 309–317. DOI: 10.1007/s11627-017-9846-1.
- Vujović T., Sylvestre I., Ružić D. J., Engelman F. Droplet vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh // Scientia Horticulturae. 2011, vol. 130, pp. 222–228.
- Vysotskaya O. N., Popov A. S. Method for cryogenic *in vitro* keeping of meristems isolated from red raspberry plants // Patent RF, no. 2248121. 2005 [in Russian] (Высоцкая О. Н., Попов А. С. Способ криосохранения меристем, изолированных из растений малины красной (*Rubus idaeus* L.) *in vitro* // Патент РФ, № 2248121. Бюлл. Изобретений. 2005. № 8. Ч. II. С. 338).
- Wang B., Wang R. R., Cui Z. H., Bi W. L., Li J. W., Li B. Q., Ozudogru E. A., Volk G. M., Wang Q. C. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication // Biotechnology Advances. 2014, vol. 32, pp. 583–595.
- Wang Q. C., Laamanen J., Uosukainen M., Valkonen J. P. T. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration // Plant Cell Rep. 2005, vol. 24, pp. 280–288.
- Yamamoto S., Rafique T., Priyantha W. S., Fukui K., Matsumoto T., Niino T. Development of a cryopreservation procedure using aluminum cryo-plates // CryoLetters. 2011, vol. 32, no. 3, pp. 256–265.
- Yamamoto S., Wunna T., Rafique M., Valle Arizaga K., Fukui E., Cruz Gutierrez C., Watanabe K., Niino T. The aluminum cryo-plate increases efficiency of cryopreservation protocols for potato shoot tips // Am. J. Potato Res. 2015. V. 92. Pp. 250–257.
- Yamamoto S., Rafique T., Fukui K., Sekizawa K., Niino T. V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation // CryoLetters. 2012, vol. 33, no. 1, pp. 12–23.
- Yoon J. W., Kim H. H., Ko H. C., Hwang H. S., Hong E. S., Cho E. G., Engelman F. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips // CryoLetters. 2006, vol. 27, no. 4, pp. 211–222.

Научный рецензируемый журнал

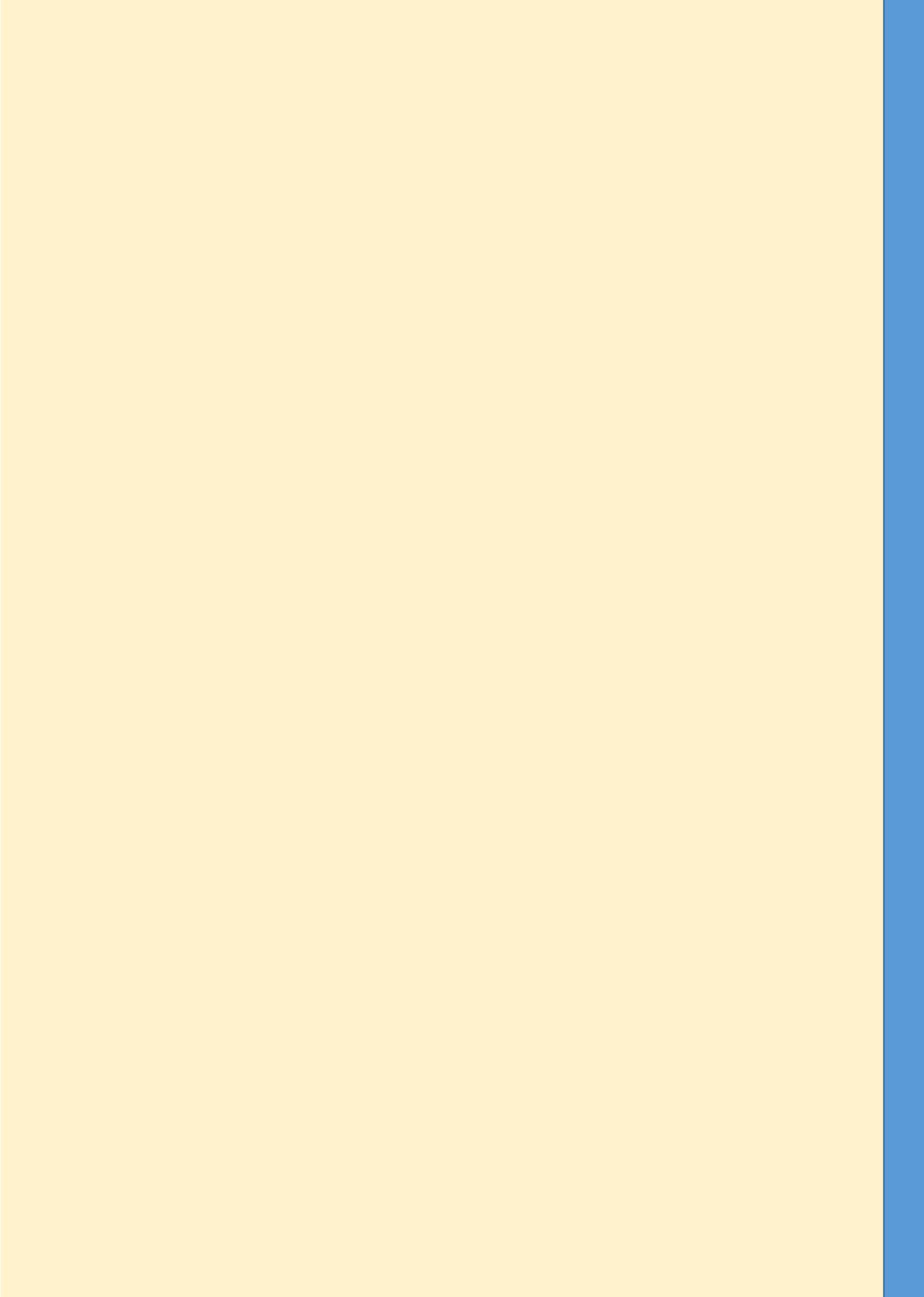
БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

Научные редакторы: И.Н. Анисимова, Е.А. Соколова
Компьютерная верстка: Л.Ю. Шипилина

Подписано в печать 20.11.2018 Формат бумаги 70×100 ¹/₈
Бумага офсетная. Печать офсетная
Печ. л. 8,0 Тираж 30 экз. Зак.2011/18

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

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



**БИОТЕХНОЛОГИЯ И
СЕЛЕКЦИЯ
РАСТЕНИЙ
2018 1(1)**