

ISSN 0016-6758

Том 60, Номер 2

Февраль 2024



ГЕНЕТИКА



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 2, 2024

Обзорные и теоретические статьи

Адаптивное значение и происхождение генов биосинтеза флавоноидов в зерновке культурных злаков

А. Н. Буланов, А. В. Войлоков

3

Генетика растений

Пути эволюции видов *Oxytropis* секции *Verticillares* в центре происхождения секции

А. Б. Холина, Е. В. Артюкова, Д. В. Санданов

21

Дифференциация *Juniperus deltoides* R.P. Adams в крымско-кавказском регионе по данным изменчивости микросателлитных ДНК-маркеров

Е. В. Хантемирова, Ц. Радукова

37

Генетика животных

Об исчезновении плейотропного эффекта гена *N* чешуйного покрова у карпа (*Cyprinus carpio* L.)

Е. В. Виноградов, В. В. Караваев, Д. А. Балашов, В. Н. Дементьев, В. М. Симонов, Л. А. Шарт, Е. Ю. Журенкова

44

Генетика человека

Изучение популяции карачаевцев на основе анализа десяти ДНК-маркеров

Н. В. Петрова, А. В. Марахонов, Н. В. Балинова, Т. А. Васильева, Г. И. Ельчинова, Е. К. Гинтер, Р. А. Зинченко

51

Изучение ассоциации VNTR-полиморфизма rs58335419 гена *MIR137* с риском развития шизофрении

Г. И. Коровайцева, И. В. Олейчик, Т. В. Лежейко, В. Е. Голимбет

63

Полиморфизм генов *FADS* и история формирования коренного населения Сибири

Б. А. Малярчук, М. В. Деренко, Г. А. Денисова, А. Н. Литвинов, И. К. Дамбуева

70

Роль молекулярно-генетических факторов в формировании клинического типа у пациентов с нейрофиброматозом 2-го типа

К. О. Карандашева, Е. С. Макашова, Ф. А. Агеева, К. И. Аношкин, П. А. Спарбер, А. О. Боровиков, П. А. Васильев, М. С. Пащенко, А. С. Танас, В. В. Стрельников

78

Методики

Разработка наборов для диагностики голштинских гаплотипов крупного рогатого скота (НН3, НН6, НН7) методом ПЦР в реальном времени

В. Д. Зубарева, М. В. Бытов, О. С. Зайцева, О. В. Соколова

89

Краткие сообщения

Поиск этноспецифических маркеров риска развития параноидной шизофрении у башкир по результатам полногеномного анализа ассоциации

А. Э. Гареева

94

Некролог

Памяти Ольги Леонидовны Курбатовой (20.04.1949–09.02.2024)

100

УДК 575.822

АДАПТИВНОЕ ЗНАЧЕНИЕ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ В ЗЕРНОВКЕ КУЛЬТУРНЫХ ЗЛАКОВ

© 2024 г. А. Н. Буланов^{1,2,*}, А. В. Войлоков^{2,**}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия

²Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991, Россия

*e-mail: an.bulanov20002014@gmail.com

**e-mail: av_voylokov@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2023 г.

После доработки 11.08.2023 г.

Принята к публикации 23.08.2023 г.

Большинство культурных злаков — кукуруза, рис, пшеница, ячмень, овес и рожь представлены многочисленными сортами без антоциановой окраски или со слабой окраской вегетативных органов и/или зерновок. Интенсивной окраской растений и/или зерна обладают редкие местные расы и дикорастущие родственные виды. Окраска зерновок связана с биосинтезом окрашенных флавоноидов в материнских (перикарп и теста) и гибридных (алейрон) тканях зерновки и контролируется доминантными аллелями регуляторных генов, кодирующих консервативные транскрипционные факторы семейств MYB, bHLH-MYC и WD40, составляющих белковый регуляторный комплекс MBW. Исследованиями последних лет доказано участие неокрашенных и окрашенных флавоноидов в реакции растений на биотические и абиотические стрессовые факторы, установлена их функциональная значимость в составе пищевых продуктов из цельного зерна. Однако многие вопросы по адаптивности и полезности антоцианов остаются без ответа или даже не ставятся. В частности, не ясны причины, по которым в ходе одомашнивания и селекции зерновых злаков не получили широкого распространения доминантные аллели регуляторных генов окраски перикарпа, несмотря на то, что именно этим генам уделяется особое внимание в связи с оздоровительным эффектом зернового питания. Настоящая статья посвящена рассмотрению сходства и специфики генетического контроля биосинтеза флавоноидов в зерновке у трех родственных культурных злаков — пшеницы, ячменя и ржи, их биологической роли в ходе развития зерновки и прорастания семян.

Ключевые слова: злаки, зерновка, флавоноиды, антоцианы, генетический контроль.

DOI: 10.31857/S0016675824020012 **EDN:** EDEEHR

В норме у злаков варьирующая по интенсивности антоциановая окраска растения проявляется на листовых пластинках и влагалищах, ушках, узлах и междоузлиях, осях и жилках цветковых чешуй. Для пшеницы и ржи, в отличие от ячменя, характерна окраска колеоптиля. Биосинтез антоцианов в вегетативных органах растений значительно активируется под влиянием биотических и абиотических стрессовых факторов. Антоцианы выступают в роли антиоксидантов, гасящих избыточные активные формы кислорода (АФК), образующиеся при нормальном функционировании клеток и в процессе развития стрессовых реакций [1,2]. Считается, что антоцианы в генеративных органах — цветках, плодах и семенах синтезируются конститутивно, привлекая животных — опылителей и распространителей семян. Однако эта функция окрашенных флавоноидов далеко не очевидна в случае злаков. Исследования, проведенные на кукурузе [3], позволили заключить, что прак-

тически любая ткань растения с нормальным генотипом способна к образованию антоцианов. Базовый антиокислительный потенциал растительных клеток обеспечивают фенольные соединения, присутствующие в окрашенных и неокрашенных тканях, антиоксиданты нефенольной природы (аскорбиновая кислота и глутатион), а также антиокислительные ферменты, нейтрализующие свободные радикалы (супероксиддисмутаза, каталаза, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза) [4].

Адаптивный ответ регистрируют на основании увеличения содержания антоцианов или активации транскрипции генов биосинтеза антоцианов в вегетативных органах растений [5]. Рассматривают разные механизмы адаптивного ответа, основанные на увеличении содержания антоцианов [5]. Первый связан с реакцией на холод, засоление и засуху. В этом случае накопление антоцианов восстанавливает нарушенный

осмотический баланс клеток. В реакции растений на соли тяжелых металлов на первый план выходят хелатирующие свойства антоцианов. Холод, засуха, засоление, а также ионы тяжелых металлов, дефицит азота или фосфора, высокая кислотность почвы, повреждение тканей, инфекция многими патогенами, интенсивное освещение, ультрафиолет ведут к избыточному образованию активных форм кислорода, нарушающих структуру белков, липидов и нуклеиновых кислот. Универсальный механизм адаптивного ответа может быть основан на высокой антиоксидантной способности антоцианов, синтез которых активируется в ходе реакции на стрессовые факторы. Многообразие вариантов регуляции биосинтеза антоцианов, как на уровне одного вида, так и на межвидовом уровне, подтверждает их возникновение в ходе адаптивной эволюции. Антоцианы являются одними из наиболее активных антиоксидантов среди флавоноидов и других соединений первичного и вторичного метаболизма [5]. Их роль в качестве антиоксидантов проявляется и в наружных тканях плода у злаков с окрашенными оболочками — перикарпе, тесте и алейроновом слое. В каждой из этих тканей функционирует эволюционно сложившийся механизм регуляции биосинтеза окрашенных флавоноидов, механизмы их транспорта и накопления в вакуолях. У пшеницы, ячменя и ржи с пурпурной (фиолетовой) окраской перикарпа конечными продуктами биосинтеза являются производные цианидина, с голубой окраской алейрона — производные дельфинидина. В семенной оболочке (тесте) у пшеницы и ржи накапливаются окрашенные, а у ячменя неокрашенные (неокисленные) проантоцианидины. У дикорастущих родственных видов существует генетическая изменчивость по регуляторным генам, контролирующим биосинтез флавоноидов в этих тканях. Как правило, предковые дикорастущие виды характеризуются окрашенным зерном, это относится и к предшественникам кукурузы, риса и сорго [6]. Однако для каждого из культурных злаков существует своя история потери и приобретения генов окраски зерна. Несмотря на функциональный консерватизм структурных и регуляторных генов биосинтеза флавоноидов, у разных видов однодольных и двудольных растений существует специфика в его организации, связанная с видовыми эколого-физиологическими особенностями. Особенности метаболизма характерны для таких хорошо изученных злаков, как кукуруза, рис, пшеница и ячмень. Пшеница и ячмень эволюционно наиболее близки, они относятся

к трибе пшеницевых (*Triticeae*). К этой трибе относится и рожь, исследования которой находятся в зачаточном состоянии. Секвенирование генома у ржи открывает новые перспективы в исследовании биосинтеза антоцианов у этого объекта в сравнительном плане и в первую очередь в отношении тканеспецифичного синтеза флавоноидов в зерне [7, 8]. Оболочки зерна играют важную роль в ходе развития и прорастания семян злаков. Перикарп выполняет защитную, фотосинтетическую и транспортную функции, алейрон обеспечивает накопление и утилизацию запасных веществ, семенная оболочка контролирует прорастание семян. Каждая из этих оболочек обладает собственной системой биосинтеза флавоноидов, которым отводится функция защиты от стрессовых факторов среды. Высококонсервативные элементы этой системы включают структурные гены биосинтеза, кодирующие ферменты фенилпропаноидного пути биосинтеза [9]. Работа структурных генов контролируется регуляторными генами, кодирующими транскрипционные факторы R2R3-MYB и bHLH-MYC, а также корегулятор WD40. Вместе они составляют так называемый MBW-комплекс, распознающий регуляторные элементы в промоторах структурных генов и активирующий их экспрессию [10].

ТРАНСПОРТ И НАКОПЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ВАКУОЛИ

Ферменты, участвующие в биосинтезе флавоноидов, могут формировать на поверхности эндоплазматического ретикула мультиферментный комплекс, состав и конечные продукты которого зависят от активности транскрипционных факторов, действующих в конкретной ткани [9, 10]. Гликозилирование, ацилирование и метилирование в определенных положениях атомов углеродного скелета придают стабильность и специфичность синтезируемым продуктам. Гликозилированные формы антоцианидинов (антоцианы), флавонолов, флавонов и предшественников проантоцианидинов транспортируются в центральную вакуоль, где модификация завершается, а в случае предшественников проантоцианидинов происходит их полимеризация. Центральная вакуоль в растительной клетке выполняет функции запасаания, детоксикации и деградации химических соединений в нормальных и стрессовых условиях. Установлено, что в вакуоли и цитоплазме действуют гликозилтрансферазы и ацилтрансферазы, принадлежащие к разным филогенетическим линиям [11].

Неокрашенные флавоноиды обнаружены также в ядре, хлоропластах и митохондриях, в этих органеллах они могут выполнять преимущественно защитную, а в ядре и регуляторную роль [5]. При цитологических исследованиях обнаружено два типа распределения антоцианов в клетках окрашенных тканей [12]. Антоцианы могут быть равномерно распределены в вакуоли или могут встречаться в виде компактных интенсивно окрашенных образований, получивших название согласно присутствию в цитозоле – пре-вакуолярных компартментов (pre-vacuole compartments, PVC) и в вакуоли – антоциановых вакуолярных включений (anthocyanic vacuolar inclusions, AVI). Морфология AVI зависит от вида растений и типа клеток, в которых происходит накопление (конденсация) антоцианов. Большинство AVI имеют строение пузырьков (везикул) с однородным содержимым, часть обладает округлой формой с гранулярным содержимым. У первых присутствует мембрана, формирующая везикулу, у вторых мембрана не обнаружена, что может служить характерным признаком везикул этого типа. Установлено, что “конденсации” и упаковке антоцианов в структуре AVI способствует их определенное строение. При этом ключевыми факторами являются гидроксилирование В-кольца, гликозилирование в 3-*O*-положении и ароматическое ацилирование [12]. Распределение антоцианов в клетке может быть связано с разными способами их доставки к месту локализации. Обсуждаются два основных механизма транспорта флавоноидов [11]. Согласно первому, транспортер глутатион-*S*-трансферазы (GST), локализованная в цитоплазме и ассоциированная с эндоплазматическим ретикуломом, связывает флавоноиды и доставляет их к тонопласту, где такие комплексы проникают в вакуоль с помощью АТФ-связывающих кассетных транспортеров (ATP-binding cassette transporters, ABC). GST выполняет транспортную и защитную функции до попадания в вакуоль. Такой опосредованный транспорт в везикулах может существовать параллельно с прямым транспортом, поскольку загрузка везикул может осуществляться путем прямого транспорта [11]. Предполагается, что загрузка флавоноидов в пространство эндоплазматического ретикула при образовании пре-вакуолей осуществляется, как и в случае транспорта через тонопласт, с участием мембранных транспортеров MATE (multidrug and toxic compound extrusion transporter) и лигандин (GST). Наиболее вероятно, что ABC-транспортеры играют главную роль в транспорте антоцианов, а MATE-транспортеры встречаются реже

[11]. Наличие нескольких изоформ MATE свидетельствует о их возможной специфичности по отношению к определенным флавоноидам или же их различной внутриклеточной локализации. Специфику взаимодействия с белками-транспортерами определяет и положение боковых метильных или ацильных групп в молекуле флавоноидов. Адресная доставка везикул и их слияние с мембранами других органелл обусловлены мембранными рецепторами [13].

Цитологические данные о транспортировке и накоплении антоцианов в перикарпе и других оболочках зерновки крайне малочисленны. По аналогии с модельными объектами у двудольных обсуждаются две модели транспорта антоцианов в вакуоль у черного риса [14]. Первая – это перемещение к тонопласту в везикулах с последующим попаданием в вакуоль по механизмам автофагии. Вторая модель предполагает участие белков-транспортеров как цитоплазматической локализации, так и встроенных в тонопласт. В ходе исследований был идентифицирован ген *OsMATE34* (*Os08g0562800*), кодирующий белок семейства MATE-транспортеров, локализованный в плазматической мембране и тонопласте и схожий с белками, участвующими в транспорте антоцианов у других растений [14]. При локализации в плазмолемме этот белок обеспечивает выход соединений из клетки в обмен на ион H^+ . При локализации в тонопласте он, напротив, способствует поглощению переносимых соединений благодаря градиенту pH, значения которого высоки (щелочная среда) в цитоплазме и низки (кислая среда) в вакуоли. Ген *OsMATE34* и ген глутатион-*S*-трансферазы *OsGSTU34* (*Os10g0395400*) дифференциально экспрессируются в зерновке черного риса наряду со структурными генами биосинтеза антоцианов *OsPAL*, *OsCHS*, *OsCHI*, *OsF3H*, *OsDFR*, *OsANS* и *OsUFGT/Os3GT*, что свидетельствует о единой регуляции этих генов со стороны MYB-bHLH-WD40 (MBW) комплекса [14]. Аналогичный вывод сделан авторами публикации и в отношении одного из генов, контролирующей устойчивость к засухе и окислительному стрессу. Этот ген принадлежит к семейству генов, контролирующей транскрипцию генов глутатионпероксидазы, что представляет несомненный интерес в связи с обсуждаемой антиоксидантной функцией антоцианов. Наиболее вероятно, что антоцианы в зерне черного риса поступают в вакуоль по механизму автофагии везикул, нагруженных антоцианами с участием транспортного белка MATE [14]. Антоцианы в перикарпе у риса появляются

на седьмой день от оплодотворения и несколько позже антоцианы обнаруживаются в тесте и алейроне. Гены биосинтеза антоцианов и гены белков-транспортеров *OsMATE34* и *OsGSTU34* в зерновках черного риса имеют одинаковый профиль транскрипции. В то же время в окрашенных листьях черного риса наряду с геном *OsGSTU34* действует ген *OsMRP15*, принадлежащий к семейству генов ABC-транспортеров. Предполагается, что этот ген участвует и в транспорте флавонолов в тканях неокрашенных рылец у тех же форм черного риса [15]. В протопластах, изолированных из пигментированных рылец у тех же форм черного риса, установлена флуоресценция антоцианов при облучении светом 552 нм. Это позволило выявить антоцианы, диффузно растворенные в вакуоли и антоцианы, сконцентрированные в виде интенсивно высвечивающих телец, расположенных в основном в цитоплазме, примыкающей к тонопласту, и частично локализованных в самой вакуоли. Размеры и форма телец, соответствующих ранее описанным [12] антоциановым вакуолярным включениям (AVI), значительно варьируют от клетки к клетке и в пределах клетки. Этот факт может указывать на динамику в организации и перемещении AVI в ходе накопления антоцианов в вакуоли. Авторы делают вывод о соответствии полученных данных ранее предложенным моделям синтеза и транспорта антоцианов у двудольных и о возможном переносе этой модели на биосинтез антоцианов в тканях риса [14].

Механизмы накопления антоцианов в тканях зерновки и других органов у растений характеризуются как консерватизмом, так и видовой, тканевой и онтогенетической спецификой. На микрофотографиях срезов незрелых зерновок у двух линий кукурузы с антоцианами только в алейроне или только в перикарпе живые клетки алейрона выглядят равномерно заполненными пигментами со множеством интенсивно окрашенных включений. Клетки перикарпа, прошедшие к моменту анализа через процессы клеточной гибели, спрессованы в узкую окрашенную полосу [16]. У злаков клетки алейрона содержат два типа вакуолей — литические вакуоли и вакуоли, запасрующие белки [17]. Оба типа вакуолей короткое время сосуществуют друг с другом в одной клетке и каждый доминирует на разных стадиях развития. Тонoplastы этих вакуолей схожи по наличию транспортных белков. В созревающих семенах литические вакуоли превращаются в вакуоли, накапливающие белки, при прорастании же происходит обратная трансформация.

Типы вакуолей различают при помощи маркерных белков. Оба типа вакуолей при прорастании семян сливаются, образуя центральную вакуоль [17]. При прорастании зерновок риса алейрон секретирует гидролитические ферменты в крахмалистый эндосперм, происходит слияние вакуолей с образованием центральной литической вакуоли с последующей гибелью клеток. Разрыв тонопласта и разрушение центральной вакуоли является морфологическим проявлением программируемой гибели клеток алейрона [18]. Можно предположить, что неокрашенные флавоноиды и антоцианы, освобождающиеся при разрушении тонопласта, выполняют защитные функции по отношению к чувствительным соединениям клеток, используемых проростком для роста и развития.

ФУНКЦИИ ОБОЛОЧЕК ЗЕРНОВКИ И АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ

Трехслойный перикарп (эндо-, мезо- и эпикарп) образуется из материнских тканей стенки завязи. В ходе раннего развития зерновки мезокарп подвергается программируемой клеточной гибели, а эндокарп превращается в фотосинтетически активную ткань, состоящую из слоев поперечных и трубчатых клеток [19]. Перикарп является местом фотосинтетической фиксации углерода и одновременно местом временного накопления продуктов фотосинтеза. Считается, что из-за малого количества устьиц на поверхности перикарпа основным источником углерода является не атмосферный углекислый газ, а углекислый газ, образованный в ходе дыхания [19, 20]. Фотосинтетическая активность эндокарпа зерновок может составлять до 42% от общей активности колоса [21]. Она сохраняется до поздних стадий развития зерновки, снабжая ткани кислородом и продуктами фотосинтеза, а также способствуя поглощению избыточной световой энергии в период налива зерна [22]. Программируемой гибели клеток перикарпа предшествует автофагия — перемещение компонентов клетки в вакуоль или лизосомы с последующей их деградацией [23]. У пшеницы оба процесса развиваются от основания колоса к его верхушке, определяя толщину перикарпа в зерновках разного уровня расположения. Установлено важное значение автофагии в реакции проростков пшеницы на биотические и абиотические стрессорные факторы, обычно обсуждаемые в связи с антиоксидантной ролью флавоноидов [23]. Участие перикарпа в развитии семени включает в себя синтез и накопление собственных продук-

тов фотосинтеза и других соединений первичного и вторичного метаболизма, иммобилизацию продуктов катаболизма в ходе программируемой гибели клеток, транспорт воды и питательных веществ [20]. Предполагается, что перикарп механически ограничивает размеры зерновки и ее способность к наливу зерна. Вклад фотосинтеза в этот процесс в различных частях колоса у пшеницы, в том числе в перикарпе, значительно возрастает на стадии налива зерна в условиях водного дефицита, который негативно отражается на фотосинтетическом потенциале флагового листа [22]. Ряд фактов указывает на специфические особенности фотосинтеза, протекающего в перикарпе [21].

Теста (семенная оболочка), являющаяся материнской по происхождению тканью, развивается из наружного покрова семязпочки. В зрелом зерне перикарп и теста представлены мертвыми клетками, включающими множество накопленных соединений вторичного метаболизма и продуктов катаболизма, а также ряд ферментов, сохраняющих активность в отмерших тканях [24]. Эти соединения включают окрашенные и неокрашенные флавоноиды, которые могут способствовать росту и устойчивости проростков на ранних этапах развития.

Алейрон — наружный слой триплоидного эндосперма, представленный у кукурузы, пшеницы и ржи одним слоем клеток, а у риса и ячменя — тремя-четырьмя. Роль эндосперма заключается в накоплении и транспорте питательных веществ. Модифицированные клетки алейрона входят в состав проводящей ткани, расположенной у пшеницевых в глубине бороздки. Эта проводящая система играет важную роль при наливе зерна. Клетки алейрона сохраняют жизнеспособность до прорастания семян и подвергаются программируемой клеточной гибели после секреции гидролитических ферментов в крахмалистый эндосперм и формирования центральной вакуоли. Разрушение центральной вакуоли совпадает с началом программируемой гибели клеток алейрона [18].

Способность неокрашенных и окрашенных флавоноидов (антоцианов и проантоцианидинов), синтезируемых в оболочках зерна, поглощать ультрафиолет и видимый свет широкого диапазона может предотвращать образование активных форм кислорода (фотопротекция) [1, 2]. Обсуждается участие в стрессовых реакциях на свет трихом — выростов эпидермальных клеток,

формирующих хохолок на поверхности зерновки, обращенной к солнцу [25]. У зерновок ржи, даже с неокрашенным перикарпом, этот участок зерновки приобретает преходящую антоциановую окраску. Имеются данные о том, что выполнявшие свою функцию хлоропласты поглощаются вакуолью в клетках перикарпа (хлорофагия) в результате стрессовой реакции на UV-B и интенсивный видимый свет [23]. Трихомы у многих растений содержат антоцианы. У арабидопсиса MBW-комплексы, формируемые bHLH-MYC транскрипционными факторами GL3 или EGL3 (GLABRA 3 или ENHANCER OF GLABRA 3) и WD40 белком TTG1 (TRANSPARENT TESTA GLABRA 1), активируют не только антоциановую пигментацию различных органов, но и формирование трихом [26–29]. Это свидетельствует о схожей адаптивной роли формирования трихом и накопления флавоноидных соединений. Следует отметить и наличие пигмента вдоль бороздки у зерновок ржи дикого типа. Возможно, что индуцированное накопление антоцианов в структурах зерновки имеет приспособительное значение в ходе налива зерна в условиях водного стресса и доступности перикарпа солнечной радиации у открытозерных форм.

Антоцианы и неокрашенные флавоноиды вовлечены в инактивацию избыточных активных форм кислорода. Колокализация источников АФК и флавоноидов имеет важное значение для выполнения их антиоксидантной функции [1, 2]. У ряда объектов для неокрашенных флавоноидов показана их локализация не только в вакуоли, но и в ядре, хлоропластах и митохондриях. Подчеркивается, что ядерная локализация флавоноидов способствует не только “гашению” АФК, но и связыванию ионов переходных металлов, ограничивая появление новой волны АФК, а также может играть роль в регуляции активности генов [1]. Однако подавляющее большинство неокрашенных и окрашенных флавоноидов в тканях зерновки, как и в клетках вегетативных тканей, накапливается в вакуоли. У злаков, принадлежащих к трибе пшеницевых, в окрашенном перикарпе накапливаются преимущественно производные цианидина, в окрашенном алейроне — производные дельфинидина, а в семенной оболочке (тесте) — олигомерные и полимерные проантоцианидины. В литературе в связи с их адаптивной ролью обсуждаются в основном проантоцианидины семенной оболочки [30].

У пшеницы и ячменя семенная оболочка содержит проантоцианидины, образующиеся в ре-

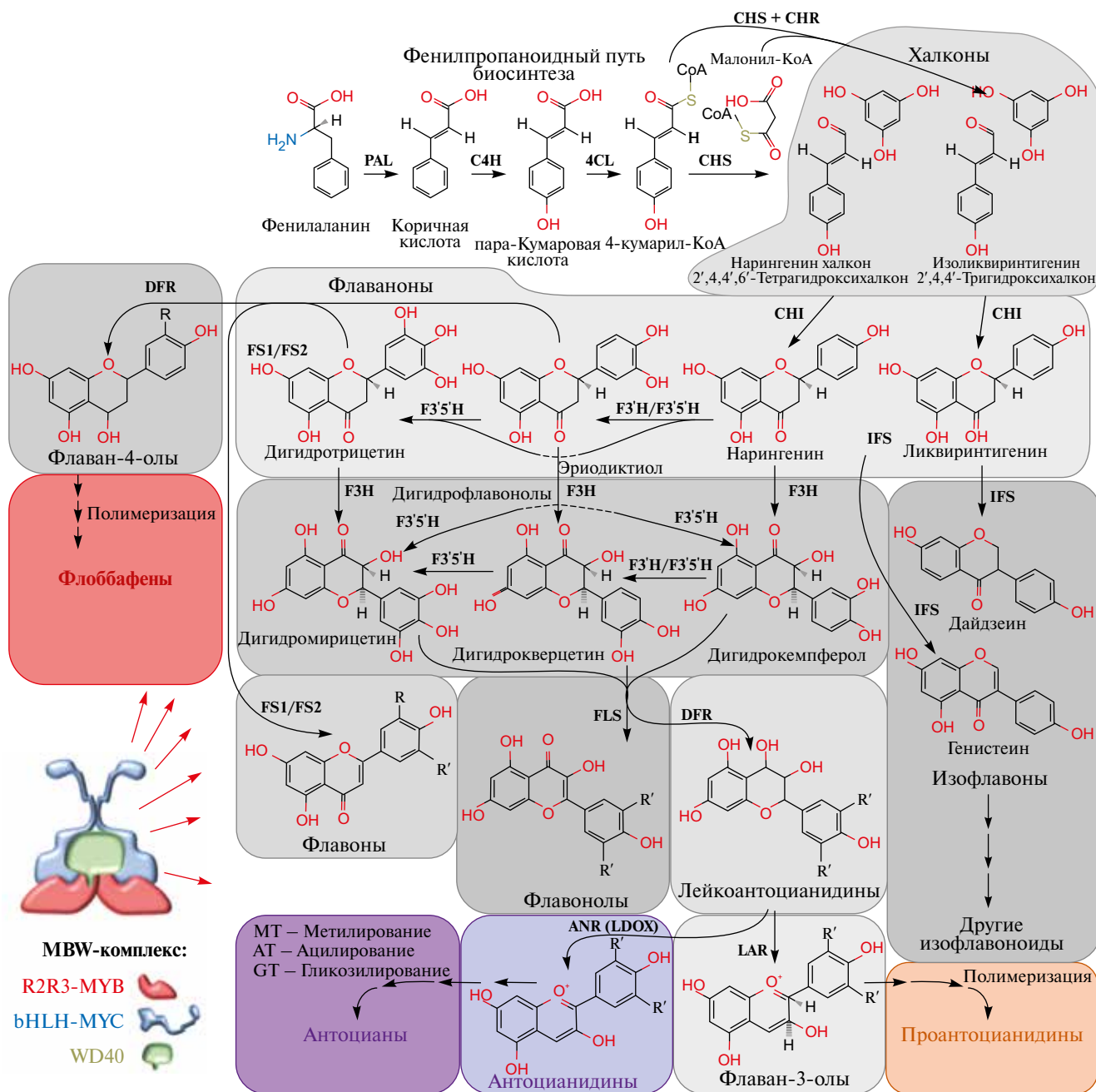


Рис. 1. Схема пути биосинтеза флавоноидов у растений. Классы неокрашенных флавоноидов выделены оттенками серого цвета, окрашенные флавоноиды (флобафены, проантоцианидины, антоцианидины и антоцианы) выделены цветами. Путь биосинтеза флавоноидов у растений начинается, как и у всех фенольных соединений, с последовательных превращений фенилаланина, катализируемых фенилаланинаммияклизой (PAL, phenylalanine ammonia-lyase), 4-гидроксилазой коричной кислоты (C4H, cinnamic acid 4-hydroxylase) и 4-кумарат-CoA-лигазой (4CL, 4-Coumarate-CoA ligase). Халконсинтаза (CHS, chalcone synthase) опосредует синтез нарингенин-халкона – предшественника большинства флавоноидов, а совместное действие халконсинтазы и халконредуктазы (CHR, chalcone reductase) обуславливает синтез халкона-предшественника изофлавоноидов изоликвиригенина. Халконы дают начало всем классам флавоноидов, что обуславливается работой следующих ферментов: халконизомеразы (CHI, chalcone isomerase), флавоносинтаз 1 и 2 (flavone synthase 1 and 2), изофлавоносинтазы (IFS, isoflavone synthase), флаванон-3-гидроксилазы (F3H, flavanone-3-hydroxylase), флавоноид-3'- и -3'5'-гидроксилазы (F3'H / F3'5'H, flavonoid-3' / 3'5'-hydroxylase), флавонолсинтазы (FLS, flavonol synthase), дигидрофлавонолредуктазы (DFR, dihydroflavonol reductase), лейкоантоцианидинредуктазы (LAR, leucoanthocyanidin reductase) и антоцианидинредуктазы/ лейкоантоцианидиндиоксигеназы (ANR, anthocyanidin reductase / LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase). Антоцианы синтезируются посредством модификации антоцианидинов посредством метилтранс-

фераз (MT, methyltransferase), ацилтрансфераз (AT, acyltransferase) и гликозилтрансфераз (GT, glycosyltransferase). Флаваноны и дигидрофлавонолы могут иметь разное количество гидроксильных групп, что опосредуется работой флавоноид-3'- и -3'5'-гидроксилаз и впоследствии приводит к синтезу различных флорафенов, флавонов, флавонолов, проантоцианидинов и антоцианидинов. Так, цианидин характеризуется наличием гидроксильной группы в 3'-положении, а дельфинидин — и в 3'-, и в 5'-положении. Экспрессия различных структурных генов биосинтеза флавоноидов напрямую активируется посредством связывания с их промоторами MBW-комплексов, состоящих из двух димеризованных молекул транскрипционного фактора bHLH-MYC, связанных каждая с одной молекулой транскрипционного фактора R2R3-MYB. Такой комплекс стабилизируется белком WD40.

в результате полимеризации флаван-3-олов (рис. 1), преимущественно катехина [31]. Окисленные проантоцианидины приобретают красно-коричневый цвет. Такой цвет характерен для краснозерной пшеницы, в зерне ячменя дикого типа проантоцианидины не окислены и бесцветны. У ячменя они присутствуют в высокой концентрации, придавая срезам семенной оболочки зернистую структуру [32]. Теста значительно толще у ячменя дикого типа чем у мутантов без проантоцианидинов. У краснозерной пшеницы не удалось обнаружить последовательности, ортологичные гену *AtTT10* (*TRANSPARENT TESTA 10*), кодирующему лакказу — фермент, участвующий в окислении проантоцианидинов у арабидопсиса [31]. В зрелой зерновке ржи семенная оболочка представлена тонким пигментным слоем коричневого цвета. Этот слой дает цветную реакцию на реагенты, выявляющие проантоцианидины [33]. В зерне у риса и просо проантоцианидины накапливаются в перикарпе. У просо в перикарпе, кроме проантоцианидинов, из флаван-4-олов могут синтезироваться аналогичные полимеры — флорафены (рис. 1) [34]. У кукурузы в перикарпе, кроме антоцианов, образуются исключительно флорафены. Проантоцианидины и флорафены широко распространены у высших растений, кроме плодов и семян они содержатся в коре, листьях и корнях. Биологическая функция этих полимеров неясна и может носить видоспецифический характер [34].

У пшеницы по мере развития зерновки происходит удлинение молекул проантоцианидинов, и в зрелом зерне остаются только высокомолекулярные неэкстрагируемые полимеры. Их нерастворимость может объясняться также образованием соединений с белками и полисахаридами. В зерне ячменя, кроме нерастворимых, обнаружены и растворимые олигомеры от димеров до гексамеров [34]. В селекции пивоваренного ячменя широко используются индуцированные мутанты с отсутствием или низким содержанием проантоцианидинов, которые, связываясь с белками, дают нежелательную взвесь. Известно десять генов, мутации в которых приводят к отсутствию проантоцианидинов в зерне [32]. Для

злаков давно обсуждается связь проантоцианидинов с преждевременным прорастанием (прорастанием на корню) и покоем семян. Краснозерная пшеница, в отличие от белозерной, менее склонна к прорастанию на корню [31]. Ячмень с его высоким содержанием проантоцианидинов характеризуется длительным периодом послеуборочного созревания. Рожь наиболее склонна к прорастанию на корню.

У ячменя мутации в гене *Ant28* (*Anthocyaninless 28*), кодирующем R2R3-MYB транскрипционный фактор, нарушают биосинтез проантоцианидинов, но не антоцианов. Ген *Ant28* обозначен *HvMyb10* согласно гомологии генам *TaMyb10* у пшеницы [35]. У мутантов по гену *HvAnt28/HvMyb10*, как и ожидалось, снижен период покоя семян. Однако связь между накоплением проантоцианидинов и периодом покоя не подтверждается для линий ячменя с нулевым аллелем гена флаванон-3-гидроксилазы *Ant17*. Мутанты по этому гену не синтезируют проантоцианидины в зерне и антоцианы в растении и не отличаются от нормы по периоду покоя семян [36]. К сожалению, потенциал коллекции мутантов ячменя по 28 генам биосинтеза флавоноидов [32] полностью не использован для выявления молекулярной функции этих генов [37]. Механизм возможного действия проантоцианидинов в контроле периода покоя семян не ясен. Обсуждают такие причины, как физическое препятствие увеличению объема семян, снижение проницаемости семенной оболочки для воды и/или кислорода, непосредственное влияние проантоцианидинов, их предшественников или метаболитов на покой и прорастание семян [31]. Хорошо известно, что повреждение наружных оболочек ускоряет прорастание семян. Из наблюдений за посевами пшеницы, ячменя и ржи следует, что птицы в первую очередь посещают пшеницу и ячмень, зерно ржи при таком выборе остается нетронутым. Горьковатый вкус многих плодов приписывают проантоцианидинам, и рассматривают его как признак, распознаваемый птицами. Зерно всех сортов ржи, в отличие от сортов белозерной пшеницы и пивоваренного

ячменя, имеет окрашенную семенную оболочку, содержащую проантоцианидины.

Считается, что сокращение периода покоя семян культурных растений произошло в ходе одомашнивания и последующей селекции [38]. Отбор на сокращение периода покоя мог привести к резкому снижению генетической изменчивости в отношении этого признака и преждевременному прорастанию семян культурных растений при избыточной влажности в период созревания. В изменчивости периода покоя проантоцианидины могли играть подчиненную роль. Сорнополевая рожь, предтеча культурной ржи, получила широкое распространение в качестве сорняка (*feral rye*) в посевах пшеницы в штате Северная Каролина [39]. Зерно этой ржи сохраняет жизнеспособность в почве от одного года до нескольких лет. Не известно, какую роль в этой изменчивости играет полиморфизм по содержанию проантоцианидинов. У риса показано, что основной вклад в устойчивость к прорастанию на корню вносит взаимодействие генов *SD6* (*Seed dormancy 6*) и *ICE2* (*Inducer of C-repeat binding factors expression 2*), кодирующих противоположно действующие транскрипционные факторы *bHLH-MYC*. Эффект взаимодействия аллелей этих генов зависит от температуры, он определяет содержание абсцизовой кислоты в зародыше и способность зерновок к прорастанию [40].

С использованием 10 мутантов ячменя по биосинтезу проантоцианидинов показано, что дикий тип не обладает большей устойчивостью к фузариозу зерна по сравнению с мутантами. Напротив, высокая устойчивость обнаружена у мутанта *ant18-159*, накапливающего незначительное количество дигидрокверцетина, как результат нонсенс-мутации в гене дигидрофлавонолредуктазы [41].

Особенности протекания фотосинтеза в колосе пшеницы могут быть связаны с развитием семян в условиях стресса, вызванного недостатком влаги и избыточным освещением, сопровождающим налив зерна у злаков [19, 21]. Неблагоприятные условия при формировании зерновок отрицательно влияют на плодовитость и выживаемость всходов. У дикорастущих предков современных злаков появление сложной антиоксидантной защиты в плодовой, семенной оболочках и алейроне могло быть связано с обеспечением выживаемости зародыша и проростков в неблагоприятных условиях развития. Эта

система может участвовать в антистрессовых реакциях при прорастании семян в условиях низких температур у озимых злаков и недостатке влаги у яровых форм. Можно предположить, что у северных злаков формирование специфического метаболизма антоцианов в алейроне шло под влиянием отбора в условиях высокогорного расселения. Для его формирования оказалось недостаточно мутационного изменения только в одном регуляторном гене, как в случае черного риса. Отбор затрагивал аминокислотную последовательность ключевого фермента биосинтеза дельфинидина — флавоноид-3'5'-гидроксилазы (F3'5'H), регуляторные последовательности генов двух транскрипционных факторов — R2R3-MYB и bHLH-MYC, и в итоге привел к кластерной организации трех генов, контролирующих биосинтез дельфинидина в алейроне у некоторых представителей видов подсемейства *Pooideae*, о чем пойдет речь в следующем разделе.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОВ ОКРАСКИ ЗЕРНОВКИ У КУЛЬТУРНЫХ ЗЛАКОВ

Происхождение и эволюцию биосинтеза флавоноидов связывают с выходом растений на сушу [42]. Многообразие контрастных условий новой среды явилось фактором отбора адаптивных мутаций. Такие мутации могли происходить в генах, контролирующих первичный метаболизм и представленных в геноме несколькими копиями, возникшими в результате дубликации отдельных последовательностей или всего генома. Филогенетический анализ показал, что гены двух первых ферментов биосинтеза флавоноидов — халконсинтазы (CHS) и халконизомеразы (CHI) произошли от генов, участвующих в метаболизме жирных кислот. Такие эволюционные связи прослеживаются для всех структурных и регуляторных генов, контролирующих не только биосинтез флавоноидов, но и вторичный метаболизм в целом [42]. Особенности молекулярной структуры флавоноидов обусловили их участие в адаптивной эволюции всех групп наземных растений на основе общих механизмов их действия [42]. Биосинтез флавоноидов регулирует универсальный для растений комплекс транскрипционных факторов, встроенный в общую систему регуляции метаболизма. В ходе эволюции растений на внутривидовом и межвидовом уровнях сложились различные варианты этого комплекса, регулируемые онтогенетически и в ответ на изменяющиеся условия среды.

Материалом эволюционных преобразований у культурных растений служит спонтанная генетическая изменчивость, которая поставляет материал для одомашнивания и селекции. Очевидно, что отбор на полезные для человека признаки не всегда вел к улучшению адаптивных свойств растений. Это несоответствие возникает как за счет плейотропии, так и эффекта сцепления генов с разными функциями. Окраску зерновки не относят к признакам, входящим в синдром одомашнивания [43]. Дикорастущие предки и культурные растения различаются частотой встречаемости активных и неактивных аллелей генов, контролирующих биосинтез флавоноидов в отдельных оболочках зерновки. Адаптивная роль окраски зерновки (сухого плода) строго не доказана, на нее ссылаются по аналогии с окраской генеративных органов у двудольных растений [10] или считают очевидной, исходя из общих представлений о функции антоцианов [1, 9]. При обсуждении адаптивной роли антоциановой окраски зерновки, а точнее роли окрашенных флавоноидов, надо принимать во внимание их эволюционное происхождение и существующие морфофизиологические и экологические различия между видами. Такие различия сложились между зерновыми южного происхождения (кукуруза, рис, просо) и северными злаками. У пшениц, ячменя и ржи есть яровые и озимые формы, северные злаки устойчивы к заморозкам, влаголюбивы, требуют длинного дня для развития и характеризуются еще целым комплексом отличительных признаков, которые могут быть связаны с биосинтезом флавоноидов в тканях зерновки и вегетативных органов.

Адаптивную роль флавоноидов устанавливают как изменение их концентрации или транскрипционной активности генов их биосинтеза в ответ на стрессовый фактор [5]. Этот подход можно назвать эколого-физиологическим. Другой подход основан на филогенетическом анализе генов и моделировании структуры и функции белков, кодируемых этими генами. Установленные различия между паралогами и/или ортологами объясняют действием факторов отбора, имеющих естественный или искусственный характер.

Эволюция структурных генов биосинтеза флавоноидов

Фенольные соединения у растений синтезируются преимущественно из фенилаланина посредством фенилпропаноидного пути био-

синтеза, одной из ветвей которого является биосинтез различных классов флавоноидов (рис. 1) [9]. Общей и ключевой реакцией для всех классов флавоноидов является синтез халконов посредством халконсинтазы (CHS) и их изомеризация под действием халкон-флаванонизомеразы (CHI) с образованием флаванонов. Работа дальнейших разнообразных ферментов обуславливает последовательные превращения с образованием многих классов флавоноидов, в том числе флавонолов, проантоцианидинов и антоцианидинов (рис. 1). Молекулы этих соединений подвергаются дополнительным модификациям сахарами, метильными группами и другими заместителями с участием множества дополнительных ферментов, что придает им различные свойства, имеющие значения как для адаптации растений, так и приносящие пользу человеку [9, 44, 45].

У злаков филогенетический анализ был проведен для структурных генов, кодирующих флавоноид-3'-гидроксилазу (F3'H) [46] и флавоноид-3',5'-гидроксилазу (F3'5'H) [47]. Эти ферменты участвуют в гидроксилировании В-кольца флаванонов и дигидрофлавонолов на начальных этапах биосинтеза антоцианидинов цианидина и дельфинидина соответственно. Выявлены две независимые линии эволюции генов флавоноид-3'-гидроксилазы, предположительно возникшие после дупликации исходной последовательности у общего предка однодольных растений и последующего удвоения, а затем и утраты ряда копий у отдельных таксонов [46]. Предполагается, что обнаруженные функциональные различия между ферментами, кодируемыми генами из разных филогенетических линий, вызваны положительным естественным отбором, повлиявшим на связывание субстрата активным центром. По мнению авторов, это может объяснить новую 5'-гидроксилазную активность ферментов одной из эволюционных линий у риса и других злаков по отношению к хризоеориолу. В результате этой реакции образуются флавоноиды селгин, а затем и трицин, выполняющий у злаков важные защитные и структурные функции [46]. Между паралогами, кодирующими F3'H, обнаружены транскрипционные различия, носящие видоспецифический характер. У ячменя один ген транскрибируется в алейроне, перикарпе и лемме/палее, а его копия — в вегетативных органах [48]. Один из генов флавоноид-3',5'-гидроксилазы активен в алейроне, а его копия транскрибируется во многих тканях [48].

Флавоноид-3',5'-гидроксилазы у злаков также можно разделить на два класса, названные Mo_F35H1 и Mo_F35H2 (Monocot F3'5'H) [47]. Предполагается, что гены ферментов разных классов возникли путем дупликации в геноме общего предка и дальнейшей дивергенции в ходе видообразования под влиянием отбора [47]. Последовательности, кодирующие Mo_F35H1, обнаружены у всех изученных видов семейства Poaceae, а последовательности Mo_F35H2 только у некоторых видов подсемейства Pooideae, к которым относятся пшеница, ячмень и рожь. Белки Mo_F35H2 обладают большим сходством с флавоноид-3',5'-гидроксилазами двудольных растений, чем с Mo_F35H1. По мнению авторов, это сходство указывает на конвергентную адаптивную эволюцию флавоноид-3',5'-гидроксилаз, специфичных для Pooideae, и флавоноид-3',5'-гидроксилаз двудольных на уровне аминокислотных замен [47].

Специфической эволюции у пшеницевых были подвержены и гены халконизомеразы (CHI) [49]. Однако в этом случае эволюция затрагивала не белок-кодирующую последовательность, а экзон-интронную структуру генов *Chi*. Было показано, что у предполагаемого предка злаков ген халконизомеразы содержал четыре экзона и три интрона. Такая структура сохранилась и по сей день у большинства злаков, включая кукурузу и рис, однако для всех представителей трибы Triticeae характерна утрата третьего интрона. У ржи *Secale cereale* дополнительно утрачен и второй интрон, вследствие чего ее ген халконизомеразы содержит лишь два экзона. Структура белка CHI консервативна и не имеет принципиальных различий у всех злаковых [49]. С чем связана утрата интронов в гене *Chi* у пшеницевых неизвестно, однако, такое явление наблюдается и в других группах растений [50], а также в некоторых других генных семействах [51, 52]. Предполагается, что делеция интронов может способствовать более быстрой транскрипции гена, что в случае халконизомеразы может свидетельствовать об адаптации к неблагоприятным условиям посредством быстрого накопления флавоноидных соединений [49, 53].

Эволюция регуляторных генов биосинтеза флавоноидов

Ключевыми регуляторами временной и пространственной специфичности биосинтеза флавоноидов являются белки семейств bHLH-MYC, R2R3-MYB и WD40, формирующие MBW-комплексы (рис. 1) [10]. С момента пер-

вых данных о совместной регуляции биосинтеза флавоноидов этими белками, полученными при изучении регуляторных генов *R* (*Red*), *C1* (*Colorless 1*) и *PAC1* (*Pale aleurone color 1*) у кукурузы [54–60], и генов *GL1*, *GL3* (*GLABRA*), *TT2*, *TT8* (*TRANSPARENT TESTA*) и *TTG1* (*TRANSPARENT TESTA GLABRA 1*) у арабидопсиса [61–65], у многих растений обнаружены MBW-комплексы, регулирующие биосинтез флавоноидов и, в частности, антоцианов. Разнообразие MYC- и MYB-генов определяет специфичность и интенсивность биосинтеза флавоноидов и может формировать сложные варианты пигментации растений [59, 63, 65–73].

У ячменя структурный ген *HvF35H* (*HvF3'5'H*) вместе с двумя регуляторными генами *HvMYB4H* (*HvMpc2*) и *HvMYC4H* (*HvMyc2*) входит в состав трехгенного кластера MbHF35 (MYB-bHLH-F3'5'H), локализованного в хромосоме 4H [47, 74]. Все три гена специфически экспрессируются в алейроне. Кластерная организация генов биосинтеза дельфинидина в алейроне, кроме ячменя, установлена еще для двух культурных злаков – пшеницы с локализацией кластера в хромосоме 4D и ржи с кластером в гомеологичном фрагменте хромосомы 7R. У *Aegilops tauschii* – донора генома D мягкой пшеницы сохраняется кластерная организация, однако гомолог *HvMYC4H* у *Aegilops tauschii* представлен нефункциональным аллелем или псевдогеном, что соответствует отсутствию окраски алейрона у изученных форм этого вида [47]. Гены, входящие в кластер, составляют отдельные филогенетические линии у видов Triticeae. Локализация в гомеологичных фрагментах хромосом у пшеницы и эгилопса (4D), ячменя (4H) и ржи (7R) указывает на происхождение кластера от общего предка и параллельную эволюцию генов, обеспечивающих биосинтез производных дельфинидина в алейроне. Установлено, что последовательность этих генов складывалась под влиянием естественного отбора. Идентифицировано 13 аминокислотных остатков в структуре белка HvF35H, которые могли появиться в результате естественного отбора на термостабильность белковой молекулы [46, 47]. Зерновка злаков подвержена интенсивному освещению и нагреву в критический период налива зерна. “Голубой” антоциан имеет более широкий спектр поглощения и является лучшим фотопротектором и антиоксидантом чем, “красный” антоциан [47]. Эти различия могли способствовать формированию эффективной системы защиты на основе производных дельфинидина у предковых видов ячменя, пше-

ницы и ржи, занимавших высокогорные участки с резкими колебаниями дневной температуры, интенсивным освещением и дефицитом влаги. Вероятно, что тесное сцепление генов, контролирующих биосинтез дельфинидина, необходимо для совместной регуляции их транскрипции и ускорения ответа на факторы стресса.

Все изученные формы дикорастущего ячменя *H. spontaneum* фиксированы по активным аллелям окраски алейрона в регуляторных генах *HvMYB4H* и *HvMYC4H*. У большинства из них зерно имеет голубую окраску. Местные голубозерные сорта *H. vulgare* также несут активные аллели окраски алейрона в генах *HvMYB4H* и *HvMYC4H*. У белозерных сортов ячменя один или оба гена представлены неактивными аллелями. Наиболее вероятно, что преобладание этих аллелей у культурного ячменя связано с его одомашниванием и последующей селекцией белозерных форм [47].

Голубой алейрон у мягкой пшеницы контролируется локусами, включенными в геном отдельных сортов при отдаленной гибридизации. Локусы голубозерности *Ba1* и *Ba2* (*Blue aleurone*) установлены у диплоидных видов пырея *Thinopyrum ponticum* (syn. *Agropyron elongatum*) и пшеницы однозернянки *Triticum monococcum*, окультуренной формы *T. boeoticum*, соответственно [75]. Ген *ThMYC4E* (локус *Ba1*) в составе целой хромосомы 4E или ее фрагментов обеспечивает синтез антоцианов в алейроне у пшеницы, полученной на основе гибридизации с *Thinopyrum ponticum* [76]. У голубозерной пшеницы найдены ортологи трех генов ячменя *HvMYC4H*, *HvMYB4H* и *Hv35H*. Эти гены в составе локуса *Ba1* обозначены как *TaMYC4D*, *TaMYB4D* и *TaF35H* соответственно [46]. Маркеры активного гена *ThMYC4E* не обнаружены у изученных образцов *T. urartu*, *T. monococcum*, *T. turgidum*, *Aegilops tauschii* и *T. aestivum* с неокрашенным алейроном [76]. Ген диплоидной пшеницы *T. monococcum* *TbMYC4A* (локус *Ba2*) является ортологом генов *ThMYC4E* и *HvMYC2/HvMYC4H*. Аллелеспецифичный маркер этого гена не найден у белозерных *T. urartu*, *Ae. tauschii*, *T. turgidum*, *T. araraticum*, *T. zhukovskyi* [77]. У ржи локализация генов, составляющих трехгенный кластер, проведена на основании сходства картированных контиг [78] с секвенированными генами ячменя [7, 8]. Очевидно, что вывод о наличии у ржи функционального кластера генов, контролирующих биосинтез дельфинидина в алейроне, требует экспериментального подтверждения.

Подавляющее большинство сортов мягкой пшеницы и ячменя представлены белозерными формами, не содержащими антоцианов в алейроне и, следовательно, несущими неактивные аллели по крайней мере в одном из генов окраски алейрона или генов, отвечающих за биосинтез антоцианов на всем растении. Преобладание неокрашенных генотипов у пшеницы и ячменя исторически связано с технологическими требованиями по переработке зерна на хлеб и пиво. Выход и белизна муки у пшеницы и низкое содержание проантоцианидинов в солоде ячменя стали одними из главных признаков, на которые был направлен отбор у хлебопекарной пшеницы и пивоваренного ячменя соответственно. У ржи благодаря ее аллогамной природе наблюдается внутрисортной полиморфизм по окраске алейрона. Остается невыясненным в каких сочетаниях присутствуют активные и неактивные аллели этих генов у современных пшениц, ячменя, ржи, а также родственных им дикорастущих видов *Triticeae*.

Роль антоциановой окраски зерна (наличия окрашенных флавоноидов) у культурных растений и их дикорастущих предков как адаптивного признака остается неясной. У большинства современных сортов злаков антоциановая окраска зерна отсутствует. Ее отсутствие связывают с фиксацией неактивных аллелей регуляторных генов, которые получили предпочтение в ходе одомашнивания и селекции кукурузы, риса, просо, пшеницы и ячменя [6]. В ходе эволюции и селекции кукурузы произошла реверсия от неокрашенного зерна у предкового вида теосинте через разнообразие окраски алейрона у примитивных южноамериканских форм кукурузы к неокрашенному зерну современных открыто опыляемых сортов и сортов-гибридов. Благодаря высокой активности транспозонов у местных форм возникли и вероятно благодаря эстетическому предпочтению закрепились доминантные мутации регуляторных генов *C1* (*Colorless 1*) R2R3-MYB-транскрипционного фактора и *R1* (*Red 1*) bHLH-MYC-транскрипционного фактора, приводящие к накоплению антоцианов в алейроне и появлению кукурузы с черным, голубым и красным зерном [79]. В ходе дальнейшей адаптации и селекции кукурузы в Европе и Америке число окрашенных форм снизилось, а после внедрения сортов-гибридов желтозерная кукуруза стала доминирующей [80]. При создании инбредных линий и гибридов предпочтение отдавалось более продуктивным формам кукурузы с неокрашен-

ным зерном. Красная окраска зерна присуща дикому рису *Oryza rufipogon*, имеющему общего предка с культурным белозерным рисом. Различия в окраске контролируют два гена: ген *Rc*, который кодирует транскрипционный фактор bHLH, и ген *Rd*, кодирующий дигидрофлавонол-4-редуктазу. Эти гены участвуют в биосинтезе проантоцианидинов, в результате окисления которых в перикарпе образуется красный пигмент. Рецессивные мутации в гене *Rc* ведут к отсутствию пигмента, одна из этих мутаций получила широкое распространение в процессе одомашнивания риса [81]. Большинство сортов мягкой пшеницы не окрашены или обладают красной окраской зерна благодаря присутствию в семенной оболочке проантоцианидинов. Их биосинтез контролируется гомеологичными генами *TaR-1 (Red-1)*: *Tamyb10-A1v3A*, *Tamyb10-B1v3B* и *Tamyb10-D1v3D* хромосомах пшеницы, кодирующими транскрипционные факторы MYB [82, 83]. Эти гены пшеницы являются ортологами гена *HvANT28/Hvmyb10* ячменя и эволюционно близки гену *AtTT2* арабидопсиса, каждый из которых также позитивно регулирует биосинтез проантоцианидинов [35, 82, 83].

Наиболее редки среди культурных злаков сорта с окрашенным перикарпом. Черная (пурпурная) окраска зерна не описана у дикого риса, она встречается только у местных сортов культурного риса, и появилась в ходе или после одомашнивания риса в Древнем Китае. Происхождение черного риса связывают с перестройками в промоторной области гена окраски растения *OsB2 (Booster 2/Os04g0557500)*, кодирующего транскрипционный фактор bHLH. Эктопическая экспрессия в перикарпе мутантного гена (аллеля гена *OsB2*), названного *Kala4* [84], ведет к биосинтезу антоцианов в присутствии доминантного аллеля гена *Kala3*, кодирующего транскрипционный фактор R2R3-MYB. Этот аллель у риса с антоцианом в перикарпе включает два tandemных повтора в промоторе вместо одного у неокрашенного риса [85]. В ходе одомашнивания зернового амаранта антоциановая окраска зерна была утрачена. Причем это произошло трижды на основе одного дикорастущего предкового вида и во всех случаях культурные виды включали мутации, независимо возникшие в локусе гена транскрипционного фактора MYB — ортолога гена *C1* кукурузы [86].

Пурпурная окраска перикарпа у гексаплоидной пшеницы связана с интрогрессией фрагментов хромосом 2A и 7D от фиолетовозерных

тетраплоидных пшениц из Эфиопии. У гексаплоидной пшеницы с окраской перикарпа идентифицированы доминантные комплементарные гены *Pp3 (Purple pericarp 3, хромосома 2A)* и *Pp1 (Purple pericarp 1, хромосома 7D)* [87–89]. Ген *Pp3/TaPpb1* кодирует транскрипционный фактор bHLH-MYC, а ген *Pp1/TaPpm1* — транскрипционный фактор MYB [90]. Показано, что аллель гена *Pp3/TaPpb1/TaMYC1* у белозерной пшеницы в проксимальном участке промотора содержит одну копию последовательности из 261 нуклеотида, а у пшеницы с окраской перикарпа — шесть копий, организованных в виде tandemных повторов [90, 91]. Кроме того, у белозерной пшеницы в кодирующей последовательности этого гена обнаружены три нефункциональных аллельных варианта [90].

Подавляющее большинство сортов ячменя имеют желтое зерно. Красная и пурпурная окраска зерна обнаружена у некоторых форм дикорастущего ячменя *Hordeum spontaneum* и отдельных форм культурного ячменя. Она контролируется доминантным аллелем *Pre2*, который предположительно является одним из аллелей гена антоциановой окраски вегетативных частей растения *Ant2*, кодирующего транскрипционный фактор bHLH-MYC, в комплексе с MYB-фактором Ant1 запускающий биосинтез антоцианов [92–94].

Многочисленные формы ржи *Secale cereale*, описанные в рамках 42 подвидов, имеют варьирующую по интенсивности антоциановую окраску отдельных органов: coleoptили, листьев, узлов, междоузлий, элементов колоса. У каждой из них отмечается полиморфизм по окраске зерна [95]. Подавляющее большинство растений *Secale cereale* имеют зерно желтой и зеленой окраски, значительно реже коричневой и очень редко красной или фиолетовой окраски. Среди изученных форм *Secale cereale* subsp. *cereale* красная и фиолетовая окраска зерна описана только у отдельных образцов сорнополевой ржи. Моногибридное расщепление по фиолетовой окраске зерна ржи установлено разными авторами на независимо полученном материале [96]. Есть основания полагать, что все фиолетовозерные формы, обнаруженные у ржи, несут доминантные аллели одного и того же гена фиолетовозерности *Vs (Violet seed)*. Ген *Vs* [96] авторами публикации был переведен на яровой автофертильный фон. С использованием этой формы и транслокационного анализа ген *Vs* был локализован в хромосоме 2R под символом *Ps (Purple seed)* [97]. Нами получены данные, указывающие на ортологию

гена *Vs/Ps* и генов транскрипционных факторов *bHLH-MYC* у риса, пшеницы и ячменя, контролирующих биосинтез антоцианов в перикарпе зерновки. Наиболее вероятно, что у ржи наличие антоцианов в перикарпе находится под контролем MBW-комплекса, включающего факторы транскрипции семейств *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC* и белок WD40.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Роль флавоноидов в зерновке злаков может заключаться в фотопротекции и гашении активных форм кислорода, образующихся при фотосинтезе в перикарпе, а также их защитном действии при прорастании семян. При набухании и прорастании семян активация дыхания в алейроне ведет к появлению активных форм кислорода, которые играют регуляторную роль, а при их избытке оказывают токсичное действие. Восстановлению окислительно-восстановительного баланса способствуют как флавоноиды, так и антиокислительные ферменты, сохраняющие свою активность в мертвых тканях зерновки [98]. Установлено, что в оболочках зерна и цветковых чешуях сотни белков могут сохранять активную форму десятилетиями, освобождаясь в окружающую среду при прорастании семян. Эти ферменты наряду с накопленными в оболочках антиоксидантами способствуют выживаемости и активному росту проростков [24]. Тканеспецифичный биосинтез дельфинидина в алейроне и проантоцианидинов в семенной оболочке можно считать более универсальной адаптацией, чем биосинтез производных цианидина в перикарпе. Окраска перикарпа обнаружена у ограниченного числа дикорастущих видов злаковых растений и не получила распространения при одомашнивании и селекции. Окраску перикарпа можно отнести к локальной адаптации [99], свойственной отдельным популяциям и обладающей простым генетическим контролем. В ее основе могут лежать доминантные мутационные изменения (*gain-of-function mutations*) в регуляторных элементах генов транскрипционных факторов *bHLH-MYC* и *R2R3-MYB*, приводящие к эктопической экспрессии этих генов. Однако этот вывод не подкреплён полученными в полевых исследованиях данными, сочетающими анализ частоты проявления окраски перикарпа, геолого-географическую и метеорологическую характеристики мест обитания с анализом функциональных маркеров генов *bHLH-MYC*. В настоящее время биологическая активность

флавоноидов изучена гораздо лучше с диетической и медицинской точек зрения, чем в отношении их значения для самих растений. Основное внимание уделяется созданию сортов злаков — кукурузы, риса, пшеницы и ячменя с высоким содержанием антоцианов [100, 101]. Генетические и биотехнологические исследования направлены также на создание форм растений с высоким содержанием промежуточных соединений биосинтеза антоцианов [102] или получение генотипов, сочетающих высокое содержание антоцианов и других соединений вторичного метаболизма [103]. В этом отношении особый интерес представляет рожь с ее особенностями вторичного метаболизма, во многом связанными с перекрестным опылением и вторичным характером одомашнивания, которое протекало как эволюция сорного растения в посевах ячменя и пшеницы. Самонесовместимость ржи обеспечивает высокий уровень гетерогенности открыто опыляемых популяций ржи, в том числе по генам, контролирующим вторичный метаболизм. Сохранившаяся и получившая распространение сорнополевая рожь позволяет использовать ее популяции в качестве дополнительного материала для решения эволюционно-генетических проблем вторичного метаболизма у культурных злаков. Секвенирование геномов у двух образцов ржи [7, 8] открывает новые возможности в проведении таких исследований.

Исследование проводилось при частичной поддержке НЦМУ “Агротехнологии будущего”, договор № 075-15-2022-322 от 22.04.2022.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agati G., Brunetti C., Fini A. et al. Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation // *Antioxidants*. 2020. V. 9. № 11. P. 1098. <https://doi.org/10.3390/antiox9111098>
2. Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful con-

- ditions // J. Botany. 2012. V. 2012. P. 681. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
3. Coe E.H., Neuffer M.G., Hoisington D.A. The genetics of corn // Corn and Corn Improvement. Madison: Am. Society of Agronomy, 1988. P. 81–259. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr18.3ed.c3>
 4. Huang H., Ullah F., Zhou D.X. et al. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses // Frontiers in Plant Science. 2019. V. 10. P. 440–478. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
 5. Yan W., Li J., Lin X. et al. Changes in plant anthocyanin levels in response to abiotic stresses: A meta-analysis // Plant Biotechnol. Reports. 2022. V. 16. № 5. P. 497–508. <https://doi.org/10.1007/S11816-022-00777-7>
 6. Paauw M., Koes R., Quattrocchio F.M. Alteration of flavonoid pigmentation patterns during domestication of food crops // J. Experim. Botany. 2019. V. 70. № 15. P. 3719–3735. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz141>
 7. Li G., Wang L., Yang J. et al. A high-quality genome assembly highlights rye genomic characteristics and agronomically important genes // Nature Genetics. 2021. V. 53. № 4. P. 574–580. <https://doi.org/10.1038/S41588-021-00808-Z>
 8. Rabanus-Wallace M.T., Hackauf B., Mascher M. et al. Chromosome-scale genome assembly provides insights into rye biology, evolution and agronomic potential // Nature Genetics. 2021. V. 53. № 4. P. 564–573. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00807-0>
 9. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology // Plant Physiology. 2001. V. 126. P. 485–493. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.485>
 10. Davies K.M., Albert N.W., Schwinn K.E. From landing lights to mimicry: The molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning // Funct. Plant Biology. 2012. V. 39. № 8. P. 619–638. <https://doi.org/10.1071/FP12195>
 11. Pucker B., Selmar D. Biochemistry and molecular basis of intracellular flavonoid transport in plants // Plants. 2022. V. 11. № 7. P. 963. <https://doi.org/10.3390/plants11070963/S1>
 12. Buhrman K., Aravena-Calvo J., Ross Zaulich C. et al. Anthocyanic vacuolar inclusions: From biosynthesis to storage and possible applications // Frontiers in Chemistry. 2022. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.913324>
 13. Petrusse E., Braidot E., Zancani M. et al. Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses // Intern. J. Mol. Sciences. 2013. V. 14. № 7. P. 14950–14973. <https://doi.org/10.3390/ijms140714950>
 14. Mackon E., Jeazet Dongho, Epse Mackon G.C., Ma Y. et al. Recent insights into anthocyanin pigmentation, synthesis, trafficking, and regulatory mechanisms in rice (*Oryza sativa* L.) caryopsis // Biomolecules. 2021. V. 11. № 3. <https://doi.org/10.3390/biom11030394>
 15. Zhu Q., Xie X., Xiang G. et al. In silico analysis of a MRP transporter gene reveals its possible role in anthocyanins or flavonoids transport in *Oryza sativa* // Am. J. Plant Sciences. 2013. V. 4. P. 555–560. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.43072>
 16. Li T., Zhang W., Yang H. et al. Comparative transcriptome analysis reveals differentially expressed genes related to the tissue-specific accumulation of anthocyanins in pericarp and aleurone layer for maize // Scientific Reports. 2019. V. 9. № 1. P. 6023. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37697-y>
 17. Tan X., Li K., Wang Z. et al. A review of plant vacuoles: formation, located proteins, and functions // Plants. 2019. V. 8. № 9. <https://doi.org/10.3390/plants8090327>
 18. Zheng Y., Zhang H., Deng X. et al. The relationship between vacuolation and initiation of PCD in rice (*Oryza sativa*) aleurone cells // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 1. <https://doi.org/10.1038/srep41245>
 19. Henry R.J., Furtado A., Rangan P. Pathways of photosynthesis in non-leaf tissues // Biology. 2020. V. 9. № 12. <https://doi.org/10.3390/biology9120438>
 20. Legland D., Le T.D.Q., Alvarado C. et al. New growth-related features of wheat grain pericarp revealed by synchrotron-based X-ray micro-tomography and 3D reconstruction // Plants. 2023. V. 12. № 5. <https://doi.org/10.3390/plants12051038>
 21. Simkin A.J., Faralli M., Ramamoorthy S. et al. Photosynthesis in non-foliar tissues: implications for yield // The Plant J. 2020. V. 101. № 4. P. 1001–1015. <https://doi.org/10.1111/tpj.14633>
 22. Kong L.A., Xie Y., Sun M.Z. et al. Comparison of the photosynthetic characteristics in the pericarp and flag leaves during wheat (*Triticum aestivum* L.) caryopsis development // Photosynthetica. 2016. V. 54. № 1. P. 40–46. <https://doi.org/10.1007/S11099-015-0153-y>
 23. Li Y.B., Yan M., Cui D.Z. et al. Programmed degradation of pericarp cells in wheat grains depends on autophagy // Frontiers in Genetics. 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.784545>
 24. Grafi G., Singiri J.R. Cereal husks: Versatile roles in grain quality and seedling performance // Agronomy. 2022. V. 12. № 1. P. 172. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010172>
 25. Karabourniotis G., Liakopoulos G., Nikolopoulos D., Bresta P. Protective and defensive roles of non-glandular trichomes against multiple stresses: structure–function coordination // J. Forestry Research. 2020. V. 31. № 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01034-4>
 26. Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C. et al. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein // Plant Cell. 1999. V. 11. № 7. P. 1337–1349. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.7.1337>
 27. Morohashi K., Grotewold E. A systems approach reveals regulatory circuitry for *Arabidopsis* trichome initiation by the GL3 and GL1 selectors // PLoS Genetics. 2009. V. 5. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000396>
 28. Morohashi K., Zhao M., Yang M. et al. Participation of the *Arabidopsis* bHLH factor GL3 in trichome initiation regulatory events // Plant Physiol. 2007. V. 145. № 3. P. 736–746. <https://doi.org/10.1104/pp.107.104521>
 29. Pesch M., Schultheiß I., Klopffleisch K. et al. TRANSPARENT TESTA GLABRA1 and GLABRA1 compete for binding to GLABRA3 in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2015. V. 168. № 2. P. 584–597. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00328>
 30. Khlestkina E. The adaptive role of flavonoids: Emphasis on cereals // Cereal Res. Communications. 2013. V. 41. № 2. P. 185–198. <https://doi.org/10.1556/crc.2013.0004>

31. Vaughan S.P., Baker J.M., Primavesi L.F. et al. Proanthocyanidin biosynthesis in the developing wheat seed coat investigated by chemical and RNA-Seq analysis // Plant Direct. 2022. V. 6. № 10. <https://doi.org/10.1002/pld3.453>
32. Jende-Strid B. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley // Hereditas. 1993. V. 119. № 2. P. 187–204. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1993.00187.x>
33. Zykin P.A., Andreeva E.A., Lykholay A.N. et al. Anthocyanin composition and content in rye plants with different grain color // Molecules. 2018. V. 23. № 4. <https://doi.org/10.3390/molecules23040948>
34. Dixon R.A., Sarnala S. Proanthocyanidin biosynthesis – a matter of protection // Plant Physiology. 2020. V. 184. № 2. P. 579–591. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00973>
35. Himi E., Yamashita Y., Haruyama N. et al. *Ant28* gene for proanthocyanidin synthesis encoding the R2R3-MYB domain protein (Hvmyb10) highly affects grain dormancy in barley // Euphytica. 2012. V. 188. № 1. P. 141–151. <https://doi.org/10.1007/S10681-011-0552-5>
36. Himi E., Taketa S. Barley *Ant17*, encoding flavanone 3-hydroxylase (F3H), is a promising target locus for attaining anthocyanin/proanthocyanidin-free plants without pleiotropic reduction of grain dormancy // Genome. 2015. V. 58. № 1. P. 43–53. <https://doi.org/10.1139/gen-2014-0189>
37. Шоева О.Ю., Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 3. С. 333–342. <https://doi.org/10.18699/VJ18.369>
38. Flint-Garcia S.A. Genetics and consequences of crop domestication // J. Agricultural and Food Chemistry. 2013. V. 61. № 35. P. 8267–8276. <https://doi.org/10.1021/jf305511d>
39. Sun M., Corke H. Population genetics of colonizing success of weedy rye in Northern California // Theoretical and Applied Genetics. 1992. V. 83. № 3. P. 321–329. <https://doi.org/10.1007/BF00224278>
40. Xu F., Tang J., Wang S. et al. Antagonistic control of seed dormancy in rice by two bHLH transcription factors // Nature Genetics. 2022. V. 54. № 12. P. 1972–1982. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01240-7>
41. Skadhauge B., Thomsen K.K., Von Wettstein D. The role of the barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections // Hereditas. 1997. V. 126. № 2. P. 147–160. <https://doi.org/10.1111/J.1601-5223.1997.00147.X>
42. Yonekura-Sakakibara K., Higashi Y., Nakabayashi R. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism // Frontiers in Plant Science. 2019. V. 10. P. 943. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00943>
43. Pankin A., von Korff M. Co-evolution of methods and thoughts in cereal domestication studies: a tale of barley (*Hordeum vulgare*) // Current Opinion in Plant Biology. 2017. V. 36. P. 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.12.001>
44. Alappat B., Alappat J. Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics // Molecules. 2020. V. 25. № 23. <https://doi.org/10.3390/molecules25235500>
45. Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits // Food and Nutrition Research. 2017. V. 61. № 1. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
46. Jia Y., Li B., Zhang Y. et al. Evolutionary dynamic analyses on monocot flavonoid 3'-hydroxylase gene family reveal evidence of plant-environment interaction // BMC Plant Biology. 2019. V. 19. № 1. P. 347. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1947-z>
47. Jia Y., Selva C., Zhang Y. et al. Uncovering the evolutionary origin of blue anthocyanins in cereal grains // Plant J. 2020. V. 101. № 5. P. 1057–1074. <https://doi.org/10.1111/tbj.14557>
48. Vikhorev A. V., Strygina K. V., Khlestkina E. K. Duplicated flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes in barley genome // PeerJ. 2019. V. 2019. № 1. <https://doi.org/10.7717/peerj.6266>
49. Khlestkina E.K., Shoeva O.Y. Intron loss in the chalcone-flavanone isomerase gene of rye // Mol. Breeding. 2014. V. 33. № 4. P. 953–959. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-0009-8>
50. van Tunen A.J., Koes R.E., Spelt C.E. et al. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes // EMBO J. 1988. V. 7. № 5. P. 1257–1263. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02939.x>
51. Häger K.P., Müller B., Wind C. et al. Evolution of legumin genes: Loss of an ancestral intron at the beginning of angiosperm diversification // FEBS Letters. 1996. V. 387. № 1. P. 94–98. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00477-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00477-2)
52. Trapp S.C., Croteau R.B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications // Genetics. 2001. V. 158. № 2. P. 811–832. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.2.811>
53. Jeffares D.C., Mourier T., Penny D. The biology of intron gain and loss // Trends in Genetics. 2006. V. 22. № 1. P. 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.10.006>
54. Ludwig S.R., Habera L.F., Dellaporta S.L., Wessler S.R. Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region // Proc. Nat. Acad. Sci. U S A. 1989. V. 86. № 18. P. 7092–7096. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.18.7092>
55. Paz-Ares J., Wienand U., Peterson P.A., Saedler H. Molecular cloning of the *c* locus of *Zea mays*: A locus regulating the anthocyanin pathway // EMBO J. 1986. V. 5. № 5. P. 829–833. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04291.x>
56. Goff S.A., Cone K.C., Fromm M.E. Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1: Comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins // Genes and Development. 1991. V. 5. № 2. P. 298–309. <https://doi.org/10.1101/gad.5.2.298>
57. Goff S.A., Cone K.C., Chandler V.L. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: Evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins // Genes and Development. 1992. V. 6. № 5. P. 864–875. <https://doi.org/10.1101/gad.6.5.864>
58. Roth B.A., Goff S.A., Klein T.M., Fromm M.E. C1- and

- R-dependent expression of the maize *Bz1* gene requires sequences with homology to mammalian myb and myc binding sites // *Plant Cell*. 1991. V. 3. № 3. P. 317–325. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.3.317>
59. Radicella J.P., Turks D., Chandler V.L. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding B-Peru, a regulatory protein of the anthocyanin pathway in maize // *Plant Mol. Biology*. 1991. V. 17. № 1. P. 127–130. <https://doi.org/10.1007/BF00036813>
 60. Selinger D.A., Chandler V.L. A mutation in the *pale aleurone color1* gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway // *Plant Cell*. 1999. V. 11. № 1. P. 5–14. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.1.5>
 61. Zhang F., Gonzalez A., Zhao M. et al. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis* // *Development*. 2003. V. 130. № 20. P. 4859–4869. <https://doi.org/10.1242/dev.00681>
 62. Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J.M., Lloyd A.M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings // *Plant J*. 2008. V. 53. № 5. P. 814–827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03373.x>
 63. Baudry A., Heim M.A., Dubreucq B. et al. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 2004. V. 39. № 3. P. 366–380. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02138.x>
 64. Payne C.T., Zhang F., Lloyd A.M. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1 // *Genetics*. 2000. V. 156. № 3. P. 1349–1362. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.3.1349>
 65. Baudry A., Caboche M., Lepiniec L. *TT8* controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 2006. V. 46. № 5. P. 768–779. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02733.x>
 66. Radicella J.P., Brown D., Tolar L.A., Chandler V.L. Allelic diversity of the maize *B* regulatory gene: Different leader and promoter sequences of two *B* alleles determine distinct tissue specificities of anthocyanin production // *Genes and Development*. 1992. V. 6. № 11. P. 2152–2164. <https://doi.org/10.1101/gad.6.11.2152>
 67. Albert N.W., Butelli E., Moss S.M.A. et al. Discrete bHLH transcription factors play functionally overlapping roles in pigmentation patterning in flowers of *Antirrhinum majus* // *New Phytologist*. 2021. V. 231. № 2. P. 849–863. <https://doi.org/10.1111/nph.17142>
 68. Walker E.L., Robbins T.P., Bureau T.E. et al. Transposon-mediated chromosomal rearrangements and gene duplications in the formation of the maize *R-r* complex // *EMBO J*. 1995. V. 14. № 10. P. 2350–2363. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07230.x>
 69. Kermicle J.L. Somatic and meiotic instability of *R-stippled*, an aleurone spotting factor in maize // *Genetics*. 1970. V. 64. № 2. P. 247–258. <https://doi.org/10.1093/genetics/64.2.247>
 70. Robbins T.P., Walker E.L., Kermicle J.L. et al. Meiotic instability of the *R-r* complex arising from displaced intragenic exchange and intrachromosomal rearrangement // *Genetics*. 1991. V. 129. № 1. P. 271–283. <https://doi.org/10.1093/genetics/129.1.271>
 71. Harris L.J., Currie K., Chandler V.L. Large tandem duplication associated with a *Mu2* insertion in *Zea mays B-Peru* gene // *Plant Molecular Biology*. 1994. V. 25. № 5. P. 817–828. <https://doi.org/10.1007/BF00028876>
 72. Selinger D.A., Chandler V.L. *B-Bolivia*, an allele of the maize *b1* gene with variable expression, contains a high copy retrotransposon-related sequence immediately upstream // *Plant Physiology*. 2001. V. 125. № 3. P. 1363–1379. <https://doi.org/10.1104/pp.125.3.1363>
 73. Zimmermann I.M., Heim M.A., Weisshaar B., Uhrig J.F. Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins // *Plant J*. 2004. V. 40. № 1. P. 22–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02183.x>
 74. Strygina K.V., Börner A., Khlestkina E.K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone // *BMC Plant Biology*. 2017. V. 17. Suppl 1. P. 184. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1122-3>
 75. Zeven A.C. Wheats with purple and blue grains: a review // *Euphytica*. 1991. V. 56. № 3. P. 243–258. <https://doi.org/10.1007/BF00042371>
 76. Li N., Li S., Zhang K. et al. *ThMYC4E*, candidate *Blue aleurone 1* gene controlling the associated trait in *Triticum aestivum* // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 7. P. 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181116>
 77. Liu X., Zhang M., Jiang X. et al. *TbMYC4A* is a candidate gene controlling the blue aleurone trait in a wheat – *Triticum boeoticum* substitution line // *Frontiers in Plant Science*. 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.762265>
 78. Martis M.M., Zhou R., Haseneyer G. et al. Reticulate evolution of the rye genome // *Plant Cell*. 2013. V. 25. № 10. P. 3685–3698. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114553>
 79. Hanson M.A., Gaut B.S., Stec A.O. et al. Evolution of anthocyanin biosynthesis in maize kernels: The role of regulatory and enzymatic loci // *Genetics*. 1996. V. 143. № 3. P. 1395–1407. <https://doi.org/10.1093/genetics/143.3.1395>
 80. Petroni K., Pisu R., Tonelli C. Anthocyanins in corn: A wealth of genes for human health // *Planta*. 2014. V. 240. № 5. P. 901–911. <https://doi.org/10.1007/S00425-014-2131-1>
 81. Sweeney M.T., Thomson M.J., Pfeil B.E., McCouch S. Caught red-handed: *Rc* encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice // *Plant Cell*. 2006. V. 18. № 2. P. 283–294. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038430>
 82. Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat // *Genome*. 2005. V. 48. № 4. P. 747–754. <https://doi.org/10.1139/G05-026>
 83. Himi E., Maekawa M., Miura H., Noda K. Development of PCR markers for *Tamby10* related to *R-1*, red grain color gene in wheat // *Theoretical and Applied Genetics*. 2011. V. 122. № 8. P. 1561–1576. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1555-2>
 84. Oikawa T., Maeda H., Oguchi T. et al. The birth of a black rice gene and its local spread by introgression // *Plant Cell*.

2015. V. 27. № 9. P. 2401–2414. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00310>
85. Kim D.H., Yang J.H., Ha S.H. et al. An OsKala3, R2R3 MYB TF, is a common key player for black rice pericarp as main partner of an OsKala4, bHLH TF // *Frontiers in Plant Science*. 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.765049>
 86. Stetter M.G., Vidal-Villarejo M., Schmid K.J. Parallel seed color adaptation during multiple domestication attempts of an ancient new world grain // *Mol. Biology and Evolution*. 2020. V. 37. № 5. P. 1407–1419. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz304/5682418>
 87. Tereshchenko O.Y., Arbutova V.S., Khlestkina E.K. Allelic state of the genes conferring purple pigmentation in different wheat organs predetermines transcriptional activity of the anthocyanin biosynthesis structural genes // *J. Cereal Science*. 2013. V. 57. № 1. P. 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.09.010>
 88. Tereshchenko O.Y., Gordeeva E.I., Arbutova V.S. et al. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat // *Cereal Res. Communications*. 2012. V. 40. № 3. P. 334–341. <https://doi.org/10.1556/crc.40.2012.3.2>
 89. Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. The regulation of anthocyanin synthesis in the wheat pericarp // *Molecules*. 2014. V. 19. № 12. P. 20266–20279. <https://doi.org/10.3390/molecules191220266>
 90. Jiang W., Liu T., Nan W. et al. Two transcription factors TaPpm1 and TaPpb1 co-regulate anthocyanin biosynthesis in purple pericarps of wheat // *J. Experimental Botany*. 2018. V. 69. № 10. P. 2555–2567. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery101>
 91. Zong Y., Xi X., Li S. et al. Allelic variation and transcriptional isoforms of wheat *TaMYC1* gene regulating anthocyanin synthesis in pericarp // *Frontiers in Plant Science*. 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01645>
 92. Shoeva O.Y., Mock H.P., Kukoeva T.V. et al. Regulation of the flavonoid biosynthesis pathway genes in purple and black grains of *Hordeum vulgare* // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163782>
 93. Cockram J., White J., Zuluaga D.L. et al. Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome // *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*. 2010. V. 107. № 50. P. 21611–21616. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010179107>
 94. Gordeeva E.I., Glagoleva A.Y., Kukoeva T.V. et al. Purple-grained barley (*Hordeum vulgare* L.): Marker-assisted development of NILs for investigating peculiarities of the anthocyanin biosynthesis regulatory network // *BMC Plant Biology*. 2019. V. 19. Suppl 1. P. 52. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1638-9>
 95. Антропов В.И., Антропов В.Ф. Рожь — *Secale* L. // Культурная флора СССР. Т. 2. Хлебные злаки. Л.: Гос. изд-во совхозной и колхозной лит-ры, 1936. С. 3–95.
 96. Смирнов В.Г., Соснихина С.П. Генетика ржи. Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1984. 264 с.
 97. de Vries J.N., Sybenga J. Chromosomal location of 17 monogenically inherited morphological markers in rye (*Secale cereale* L.) using the translocation tester set // *Pflanzenzücht*. 1984. V. 192. P. 177–139.
 98. Raviv B., Godwin J., Granot G., Grafi G. The dead can nurture: Novel insights into the function of dead organs enclosing embryos // *Internat. J. Mol. Sciences*. 2018. V. 19. № 8. <https://doi.org/10.3390/ijms19082455>
 99. Lascoux M., Glémin S., Savolainen O. Local adaptation in plants // *eLS*. 2016. P. 1–7. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0025270>
 100. Dwivedi S.L., Mattoo A.K., Garg M. et al. Developing germplasm and promoting consumption of anthocyanin-rich grains for health benefits // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2022. V. 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.867897>
 101. Gordeeva E., Shoeva O., Mursalimov S. et al. Fine points of marker-assisted pyramiding of anthocyanin biosynthesis regulatory genes for the creation of black-grained bread wheat (*Triticum aestivum* L.) Lines // *Agronomy*. 2022. V. 12. № 12. <https://doi.org/10.3390/agronomy12122934>
 102. Casas M.I., Duarte S., Doseff A.I., Grotewold E. Flavone-rich maize: An opportunity to improve the nutritional value of an important commodity crop // *Frontiers in Plant Science*. 2014. V. 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00440>
 103. Glagoleva A., Kukoeva T., Mursalimov S. et al. Effects of combining the genes controlling anthocyanin and melanin synthesis in the barley grain on pigment accumulation and plant development // *Agronomy*. 2022. V. 12. № 1. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010112>

ADAPTIVE SIGNIFICANCE AND ORIGIN OF FLAVONOID BIOSYNTHESIS GENES IN THE GRAIN OF CULTIVATED CEREALS

A. N. Bulanov^{1, *}, A. V. Voylokov^{2, **}

¹*Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034, Russia*

²*Vavilov Institute of General genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: an.bulanov20002014@gmail.com*

***e-mail: av_voylokov@mail.ru*

The majority of cultivated cereals including maize, rice, wheat, barley, oat and rye are consisted of numerous varieties lacking anthocyanin pigmentation or having weak coloration of vegetative organs and/or caryopses. Only rare local races and wild related species have intense coloration of plants and/or grains. The coloration of caryopses is associated with the biosynthesis of colored flavonoids in maternal (pericarp and testa) and hybrid (aleurone) caryopsis tissues. The trait is controlled by dominant alleles of regulatory genes encoding conserved transcription factors of the MYB, bHLH-MYC, and WD40 families forming the MBW protein complex. Recent studies have proven the participation of uncolored and colored flavonoids in the response of plants to biotic and abiotic stresses, and significance of their presence in the whole grain foods has been determined. However, many questions about the adaptive effects and health benefits of anthocyanins remain unanswered. In particular, the reasons why the dominant alleles of regulatory genes controlling pericarp coloration did not become widespread in the course of domestication and breeding of cereals are not clear, although these genes receive special attention in association with health-improving effects of grain nutrition. This article discusses the similarity and specificity of the genetic control of the biosynthesis of flavonoids in the caryopsis in three related cultivated cereals – wheat, barley and rye, and their biological role in the development of the caryopsis and seed germination.

Keywords: cereals, caryopsis, flavonoids, anthocyanins, genetic control.

УДК 575.22:582.736

ПУТИ ЭВОЛЮЦИИ ВИДОВ *Oxytropis* СЕКЦИИ *Verticillares* В ЦЕНТРЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ СЕКЦИИ

© 2024 г. А. Б. Холина^{1, *}, Е. В. Артюкова¹, Д. В. Санданов²

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

²Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, 670047 Россия

*e-mail: kholina@biosoil.ru

Поступила в редакцию 07.07.2023 г.

После доработки 23.08.2023 г.

Принята к публикации 28.08.2023 г.

На основе анализа нуклеотидного полиморфизма межгенных спейсеров *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хлоропластной ДНК проведено изучение генетического разнообразия и филогенетических связей видов рода *Oxytropis* секции *Verticillares* в центре происхождения секции (Байкальская Сибирь и прилегающие районы Южной Сибири, Монголии и Китая). Кроме того, впервые проведена реконструкция филогенетических связей видов секции *Verticillares* данной территории на основе анализа ITS ядерной рибосомальной ДНК. В статье обобщен новый материал по исследуемой теме, получены данные для ряда неизученных ранее видов и популяций. Для 84.4% популяций 11 видов гаплотипическое разнообразие было высоким (от 0.700 до 1.000). В большинстве популяций (71.9%) обнаружено сочетание высокого уровня гаплотипического и низкого уровня нуклеотидного разнообразия. Выявленные в генеалогической сети хлоротипов три гаплогруппы указывают, что существуют разные эволюционные пути входящих в эти группы видов: дивергенция генетически обособленных таксонов в зоне симпатрии предположительно на основе экологической специализации; неполное расхождение филетических линий с сохранением предкового полиморфизма в сочетании с гибридизацией слабо дивергировавших таксонов; аллопатрическая дивергенция и полиплоидизация. Данные анализа маркеров хлоропластного и ядерного геномов свидетельствуют о быстрой адаптивной радиации видов *Oxytropis* секции *Verticillares*.

Ключевые слова: Fabaceae, *Oxytropis*, *Verticillares*, генетическое разнообразие, дивергенция, филогенетические связи, хлоропластная ДНК, ITS.

DOI: 10.31857/S0016675824020022 EDN: ECUYUJ

Род *Oxytropis* DC. семейства Fabaceae включает от 310 [1] до 450 видов [2], произрастающих в основном на территории Азии. Предполагается, что род появился в ходе эволюции древних видов рода *Astragalus* L. на границе миоцена–плиоцена около 5.6 млн лет назад в горах Южной Сибири [3, 4]. В дальнейшем возникли вторичные центры видообразования, крупнейшим из которых стала Байкальская Сибирь, где на базе мигрантов из Западной Сибири сформировался комплекс новых видов [3].

Байкальская Сибирь расположена на юге Восточной Сибири, прилегает к оз. Байкал и охватывает Прибайкалье, Западное Забайкалье, восточную часть Восточного Саяна и Витимское плоскогорье [5]. Байкальский очаг видообразования характеризуется уникальностью и богатством видового состава флоры, что обусловлено орографией и особенностями климата данного

региона, а также его буферным положением между Северной и Центральной Азией [6, 7]. Именно Байкальская Сибирь с прилегающими к ней территориями Северной Монголии и Китая считается родиной видов *Oxytropis* секции *Verticillares* DC. (= *Baicalia* Bunge) [8] и основной ареной эволюции секции [9]. Существование двух наименований секции связано с тем, что вначале ботаники не употребляли термин “секция”, поэтому Декандоль в 1825 г. выделил виды с мутовчатым расположением листочков в особую группу (*Verticillares*) [10]. Монограф рода *Oxytropis* Александр Бунге [11] разделил группу *Verticillares* DC. на две естественные секции *Baicalia* Bunge, к которой были отнесены непахучие, лишенные железок растения, и *Polyadena* Bunge — пахучие растения с множеством железок. Ранг секции придал группе *Verticillares* М.Г. Попов [12], дав секции, ради исторической справедливости, название *Verticillares* DC. взамен *Baicalia* [10].

С учетом экологии и современного распространения видов секции было высказано предположение, что обособление ее относится к началу плейстоцена, т.е. около 2.5 млн лет назад [8].

Секция *Verticillares* содержит около 50 видов, в том числе 25 — в Азиатской России [13], 23 — в Сибири [14], 22 — в Монголии [15], 15 — в Китае [1]. Для видов этой секции характерно два основных центра распространения: 1) Южная Сибирь, Монголия и Северо-Восточный Китай; 2) Азиатская Арктика, ареалы арктических видов в большей степени разобщены [16]. Секция состоит из 17 подсекций, 10 из которых являются монотипными [9, 10, 17]. Большое количество подсекций для совокупности из 50 видов указывает на высокую филогенетическую дифференциацию [10]. Проведенный фенетический анализ видов на основе 54 диагностических морфологических признаков выявил частичное несоответствие распределению видов между подсекциями, а также ряд других противоречий [10].

В центре происхождения секции, в Байкальской Сибири, произрастает 13 видов: *Oxytropis bargusinensis* Peschkova, *O. heterotricha* Turcz., *O. interposita* Sipl., *O. lanata* (Pall.) DC., *O. lasiopoda* Bunge, *O. myriophylla* (Pall.) DC., *O. oxyphylla* (Pall.) DC., *O. oxyphyloides* M. Pop., *O. prostrata* (Pall.) DC., *O. selengensis* Bunge, *O. stukovii* Palibin, *O. tompudae* M. Pop., *O. turczaninovii* Jurtzev [7]. Из них *O. heterotricha* и *O. oxyphyloides* относятся к горному комплексу видов, *O. tompudae* — к лесному, *O. interposita* — к аazonальному, а все остальные — к степному [7]. Для 9 из 13 видов известны данные по числам хромосом [13, 18, 19]. Большая часть видов в месте происхождения секции имеют диплоидное число хромосом ($2n = 16$), как и родственные им виды секции *Verticillares* из прилегающих районов Южной Сибири, Монголии и Китая, тогда как арктические виды из подсекции *Inaequiseptatae* Jurtz. являются полиплоидами ($2n = 32, 48, 64$) (табл. 1), что косвенно указывает на большую древность видов Байкальской Сибири [13]. Для *O. turczaninovii* отмечен кариологический полиморфизм, в природных популяциях встречаются диплоидные и полиплоидные расы ($2n = 16, 32$) [13, 18].

Виды *O. stukovii* и *O. tompudae* являются редкими видами с узкой экологической приуроченностью и занесены в “Красную книгу Забайкальского края” (2017), последний вид, а также *O. bargusinensis* и *O. oxyphyloides* являют-

ся эндемиками Байкальской Сибири и занесены в “Красную книгу Иркутской области” (2020). *O. lanata* имеет довольно обширный, но дизъюнктивный ареал, вид экологически приурочен к песчаным местообитаниям, разрушение которых несет угрозу существованию популяций, поэтому он включен в “Красную книгу Забайкальского края” (2017).

Для изучения генетической изменчивости, популяционной структуры, дивергенции видов и филогенетических связей широко используют молекулярные маркеры ядерного и хлоропластного геномов. Реконструкция филогенетических отношений видов *Oxytropis*, среди которых были виды секции *Verticillares*, по данным секвенирования ITS региона (ITS1–5.8S рРНК–ITS2) рибосомного оперона ядерной ДНК (рДНК) [20, 21] и ITS рДНК + *trnL–trnF* хлоропластной ДНК (хпДНК) [4] показала, что взаимоотношения видов даже на уровне секций остались неразрешенными. Проведенные нами ранее исследования видов рода *Oxytropis* с использованием межгенных спейсеров (intergenic spacer, IGS) *psbA–trnH* + *trnL–trnF* + *trnS–trnG* хпДНК показали, что южно-сибирские виды секции *Verticillares* формируют в сети гаплотипов обособленную монофилетическую группу [22]. Для ряда видов секции *Verticillares* степной флоры Байкальской Сибири [23] получены данные о степени дивергенции их хлоропластных геномов. Кроме того, достаточно подробно изучены генетическое разнообразие и структура популяций лекарственных видов *O. lanata*, *O. myriophylla* и *O. oxyphylla* Байкальской Сибири [24].

Настоящее исследование посвящено изучению генетического разнообразия и уточнению филогенетических отношений видов секции *Verticillares* в целом. Для этого дополнительно собран большой материал для разных популяций и видов, произрастающих в Байкальской Сибири, также в анализ включены арктические виды секции из подсекций *Inaequiseptatae* Jurtz. и *Uniflorae* Jurtz. На основе ранее полученных данных [23, 25] из анализа исключен *O. interposita*, так как была показана существенная обособленность хлоропластного генома этого вида от видов секции *Verticillares* и генетическая близость *O. interposita* к видам секции *Polyadena* [25]. Цель настоящего исследования — изучить генетическое разнообразие видов *Oxytropis* секции *Verticillares* в центре происхождения секции и провести реконструкцию филогенетических связей на основе анализа нуклеотидного поли-

Таблица 1. Исследуемые популяции 19 видов *Oxytropis* секции *Verticillares*, место произрастания, размер выборки и коды

Вид, число хромосом (ссылка), место произрастания (число образцов)	Координаты с.ш.; в.д.	Код популяции
Виды Южной Сибири		
Подсекция <i>Oxyphylliformes</i> Jurtz.		
<i>O. bargusinensis</i> , 2n — нет данных		
1. Республика Бурятия, долина р. Алла (15)	54°43'12"; 110°40'48"	BARKUR
2. Республика Бурятия, окр. с. Уржил (15)	54°3'36"; 110°21'36"	BARBAR
<i>O. ochrantha</i> , 2n = 16 [65]		
1. Китай, Внутренняя Монголия, южнее г. Шилин-Хот (5)	43°30'0"; 116°6'36"	OCHR
<i>O. oxyphylla</i> , 2n = 16 [13]		
1. Забайкальский край, окр. оз. Ножий (5)	50°47'24"; 114°47'24"	OXY1
2. Республика Бурятия, окр. с. Новоселенгинск (16)	51°4'12"; 106°36'0"	OXY2
3. Республика Бурятия, окр. с. Комсомольское (8)	52°28'48"; 111°5'24"	OXY3
4. Монголия, Булганский аймак, окр. сомона Рашаант (5)	47°24'36"; 103°39'36"	OXY4
5. Республика Бурятия, окр. с. Малый Куналей (10)	50°36'36"; 107°49'48"	OXY5
6. Республика Бурятия, окр. с. Монды (10)	51°41'24"; 100°54'0"	OXY6
7. Забайкальский край, окр. с. Домна (11)	51°49'48"; 113°5'24"	OXY7
8. Иркутская обл., окр. с. Узуры (10)	53°49'48"; 107°5'24"	OXY8
<i>O. pumila</i> , 2n = 16 [13]		
1. Республика Алтай, Чуйская степь (1)	49°30'0"; 88°19'48"	PUM
<i>O. reverdattoi</i> , 2n = 16 [13]		
1. Республика Хакасия, окр. с. Весеннее (1)	54°34'48"; 90°40'48"	REVER1
2. Республика Хакасия, окр. с. Борец (1)	54°28'12"; 90°21'36"	REVER2
<i>O. selengensis</i> , 2n = 32 [13]		
1. Республика Бурятия, окр. с. Унэгэтэй (18)	52°10'12"; 108°36'0"	SEL
<i>O. tompudae</i> , 2n — нет данных		
1. Республика Бурятия, окр. с. Майск (8)	54°36'0"; 110°46'48"	TOMP
<i>O. turczaninovii</i> , 2n = 16, 32 [13, 18]		
1. Республика Бурятия, окр. с. Дырестуй (5)	50°38'24"; 106°0'36"	TURCZ1
2. Республика Бурятия, окр. с. Удинск (9)	52°7'12"; 109°9'0"	TURCZ2
Подсекция <i>Salinae</i> Jurtz.		
<i>O. mongolica</i> , 2n — нет данных		
1. Республика Тува, западный берег оз. Хадан (1)	51°19'12"; 94°28'48"	MONG
<i>O. prostrata</i> , 2n — нет данных		
1. Забайкальский край, окр. оз. Зун Торей (12)	50°7'48"; 115°42'36"	PROST1
2. Забайкальский край, окр. оз. Барун Торей (10)	50°0'0"; 115°43'12"	PROST2
3. Забайкальский край, окр. оз. Кункур (8)	50°42'36"; 114°53'24"	PROST3
<i>O. stukovii</i> , 2n = 16 [19]		
1. Забайкальский край, окр. оз. Ножий (4)	50°48'36"; 114°50'24"	STUK1
2. Забайкальский край, окр. оз. Кункур (10)	50°42'36"; 114°53'24"	STUK2
Подсекция <i>Lanatae</i> Jurtz.		
<i>O. lanata</i> , 2n = 16 [13]		
1. Республика Бурятия, окр. с. Унэгэтэй (20)	52°10'12"; 108°36'0"	LAN1
2. Республика Бурятия, окр. с. Уржил (15)	54°3'36"; 110°21'36"	LAN2
3. Монголия, Центральный аймак, окр. сомона Аргалант (5)	47°49'48"; 105°52'48"	LAN3
4. Иркутская область, о-в Ольхон, Нюргонская бухта (10)	53°16'48"; 107°34'48"	LAN4
5. Республика Бурятия, окр. с. Тунка (11)	51°44'24"; 102°27'36"	LAN5
Подсекция <i>Myriophyllae</i> Jurtz.		
<i>O. myriophylla</i> , 2n = 16 [13]		
1. Забайкальский край, окр. с. Цугол (5)	51°1'12"; 115°36'0"	MYR1

Таблица 1. Продолжение

Вид, число хромосом (ссылка), место произрастания (число образцов)	Координаты с.ш.; в.д.	Код популяции
2. Республика Бурятия, окр. с. Удинск (21)	52°7'12"; 109°9'0"	MYR2
3. Республика Бурятия, окр. с. Комсомольское (8)	52°28'48"; 11°5'24"	MYR3
4. Республика Бурятия, окр. с. Мухор-Кондуй (6)	52°29'24"; 113°17'24"	MYR4
5. Республика Бурятия, окр. с. Бичура (8)	50°37'48"; 107°40'12"	MYR5
6. Забайкальский край, окр. с. Соктуй-Милозан (6)	50°37'48"; 117°40'12"	MYR6
Подсекция <i>Gobicola</i> (Bunge) Malysch.		
<i>O. gracillima</i> , 2n = 16 [65]		
1. Монголия, Центральный аймак, окр. сомона Аргалант (5)	47°49'48"; 105°52'48"	GRAC
Арктические виды		
Подсекция <i>Inaequiseptatae</i> Jurtz.		
<i>O. scheludjakovae</i> , 2n = 16, 32, 48 [13]		
1. Магаданская обл., дорога на пос. Меренга. МНА* (1)	62°3'36"; 156°4'48"	SCHEL1
2. Магаданская обл., г. Замковая. MAG* (1)	63°21'0"; 152°37'48"	SCHEL2
3. Якутия, г. Якутск, Ботсад СВФУ (1)	62°0'36"; 129°42'0"	SCHEL3
<i>O. schmorgunoviae</i> , 2n = 48 [13]		
1. Магаданская обл., 70 км ниже Сеймчана, левый берег Колымы. MAG* (1)	62°37'48"; 151°7'48"	SCHMOR
<i>O. sverdrupii</i> , 2n = 48 [13]		
1. Западная Чукотка, о-в Айон, р. Утатгыр. LE* (1)	69°53'24"; 168°1'12"	SVERD
<i>O. wrangelii</i> , 2n = 64 [13]		
1. Магаданская область, окр. залива Крагина. MAG* (1)	69°47'24"; 174°46'12"	WRANG1
2. Чукотский автономный округ, о. Врангеля, бух. Сомнительная. MAG* (2)	71°6'0"; -179°37'12"	WRANG2
3. Чукотский автономный округ, о. Врангеля, р. Гусиная. MAG* (1)	70°56'24"; -179°37'12"	WRANG3
Подсекция <i>Uniflorae</i> Jurtz.		
<i>O. putoranica</i> , 2n = 16 [13]		
1. Юго-западный Таймыр, плато Путорана, окр. оз. Аян. MW* (1)	69°20'24"; 93°33'36"	PUTOR

Примечание. Жирным шрифтом выделены популяции, изученные в настоящем исследовании.* Акроним гербария: LE – Гербарий высших растений БИН РАН, Санкт-Петербург; MAG – Гербарий ИБПС ДВО РАН, Магадан; МНА – Гербарий ГБС РАН, Москва; MW – Гербарий МГУ, Москва.

морфизма IGS *psbA-trnH* + *trnL-trnF* + *trnS-trnG* хпДНК и ITS рДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом служили 327 растений из 45 природных местонахождений 19 видов семи подсемейств секции *Verticillares* (табл. 1, рис. 1). Виды Южной Сибири и прилегающих территорий: подсемейство *Oxyphylliformes* Jurtz. – *O. bargusinensis* (30 образцов), *O. ochrantha* (5), *O. oxyphylla* (75), *O. pumila* (1), *O. reverdattoi* (2), *O. selengensis* (18), *O. tompudae* (8), *O. turczaninowii* (14); подсемейство *Salinae* Jurtz. – *O. mongolica* (1), *O. prostrata* (30), *O. stukovii* (14); подсемейство *Lanatae* Jurtz. – *O. lanata* (61); подсемейство *Myriophyllae* Jurtz. – *O. myriophylla* (54); подсемейство *Gobicola* (Bunge) Malysch. – *O. gracillima* (5); арктические виды: подсемейство *Inaequiseptatae* Jurtz. – *O. scheludjakovae* (3), *O. schmorgunoviae* (1), *O. sverdrupii* (1), *O. wrangelii* (4); подсемейство

Uniflorae Jurtz. – *O. putoranica* (1). Ряд популяций некоторых видов были исследованы нами ранее [22, 23]. Названия видов и подсемейств приведены согласно обработке Л.И. Малышева [10].

Методы выделения ДНК, амплификации и секвенирования IGS *psbA-trnH*, *trnL-trnF* и *trnS-trnG* приведены в наших предыдущих работах [26, 27]. Регион ITS рДНК амплифицирован с праймерами ITS1 и ITS4 в реакционных условиях и температурном режиме, приведенных в работе [28]. Нуклеотидные последовательности прямых и обратных цепей определяли на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, USA) в ЦКП “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Последовательности ДНК каждого региона собирали и редактировали с помощью пакета программ Staden Package v1.5 [29], затем выравнивали в SeaView v4.7 [30] и объединя-



Рис. 1. Карта с указанием мест сбора растений видов *Oxytropis* секции *Verticillares* из 45 природных мест произрастания. Коды популяций см. в табл. 1. Ареалы исследованных видов приведены в [66].

ли в DnaSP v. 5.0 [31]. Матрицу объединенных последовательностей трех регионов хпДНК использовали для расчета числа гаплотипов, гаплотипического (h) и нуклеотидного (π) разнообразия (для популяций с числом образцов пять и более) в программе Arlequin v 3.5 [32]. Генеалогические сети гаплотипов строили в программе Network v5.0 [33] методом медианного соединения (Median-Joining, MJ), кодируя каждую делецию/вставку, независимо от ее размера, как одно мутационное событие. В качестве внешней группы использовали полученные нами ранее

для *O. glabra* (Lam.) DC. секции *Mesogaea* Bunge подрода *Phacoxytropis* Bunge [26, 34] нуклеотидные последовательности *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *trnS-trnG* хпДНК (номера доступа в GenBank LT856572, LT856585, LT856598 соответственно) и ITS рДНК (LR898464).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для 151 образца популяций видов *O. ochrantha* (OCHR), *O. oxyphylla* (OXY5–OXY8), *O. reverdattoi* (REVER1, REVER2), *O. turczaninowii* (TURCZ1,

TURCZ2), *O. prostrata* (PROST1–PROST3), *O. stukovii* (STUK2), *O. lanata* (LAN4, LAN5), *O. myriophylla* (MYR4–MYR6), *O. scheludjakovae* (SCHEL2, SCHEL3), *O. wrangelii* (WRANG1–WRANG3) и *O. putoranica* (PUTOR) получены нуклеотидные последовательности IGS *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хпДНК. В объединенную матрицу трех регионов были добавлены последовательности ранее выявленных гаплотипов (хлоротипов) видов секции *Verticillares* [22, 23]; длина объединенной матрицы после выравнивания составила 2546 сайтов. Обнаружено 46 полиморфных сайтов, из них 18 были информативны согласно методу максимальной экономии и 28 единичные. Выявлено 137 хлоротипов, из них 54 были новыми, последовательности которых депонированы в DDBJ/ENA/Genbank/INSDC (табл. 2). Из 19 исследуемых видов только три имеют видоспецифические нуклеотидные замены и вставки: *O. lanata* – А в позиции 1223 общей матрицы (IGS *trnL–trnF*) и С в позиции 2228 (*trnS–trnG*); *O. ochrantha* – вставка пяти нуклеотидов (GTATT) в позиции 418–422 (*psbA–trnH*); *O. wrangelii* – вставка девяти нуклеотидов (GAAGAAAAT) в позиции 349–357 (*psbA–trnH*).

В табл. 2 представлены данные о генетическом разнообразии 32 популяций 11 видов секции *Verticillares*. Высокие значения гаплотипического разнообразия (от 0.700 до 1.000) обнаружены в 27 популяциях (84.4%), а низкие значения нуклеотидного разнообразия (от 0.0003 до 0.0029) – в 28 популяциях (87.5%). Сочетание высокого гаплотипического разнообразия и среднего нуклеотидного разнообразия выявлено в популяциях OXY3, OXY4, OXY8, GRAC, а среднего гаплотипического и низкого нуклеотидного разнообразия в популяциях OXY6, SEL, TURCZ2, LAN5 (по 12.5% соответственно). Только популяция LAN4 *O. lanata* с о-ва Ольхон Иркутской области характеризуется низким гаплотипическим разнообразием ($h = 0.378$). Таким образом, большинство изученных популяций (23 популяции, 71.9%) видов секции *Verticillares* характеризуются высоким уровнем гаплотипического и низким уровнем нуклеотидного разнообразия.

Для выявления генеалогических связей между хлоротипами в объединенную матрицу были добавлены последовательности *O. glabra* (LT856572, LT856585, LT856598) в качестве внешней группы и удален полиморфизм длин моно- и динуклеотидных повторов. Выявлено 55 хлоротипов (Н1–Н55), из них только два (Н14 и Н36) были общими

для нескольких видов: хлоротип Н14 обнаружен у семи видов (*O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. stukovii*, *O. bargusinensis*, *O. reverdattoi*, *O. turczaninovii* и *O. prostrata*), а Н36 – у двух (*O. bargusinensis* и *O. tomopudae*). Отношения между хлоротипами показаны на рис. 2,а. Все хлоротипы 19 видов секции *Verticillares* связаны в единую сеть, в которой можно выделить три гаплогруппы (I, II, III), каждая из которых содержит “звездчатую” структуру с одним из хлоротипов в центре. Гаплогруппа I занимает центральное положение в сети, а гаплогруппы II и III – терминальные. Гаплогруппу I образуют хлоротипы четко обособленных видов *O. ochrantha*, *O. mongolica*, *O. lanata*, *O. gracillima* и *O. myriophylla* с хлоротипом Н11 последнего в центре. Кроме того, хлоротип Н12 *O. myriophylla* связан через много мутационных шагов с хлоротипом *O. glabra*. Гаплогруппа II включает хлоротипы близкородственных видов *O. bargusinensis*, *O. oxyphylla*, *O. pumila*, *O. reverdattoi*, *O. selengensis*, *O. tomopudae*, *O. turczaninovii*, *O. prostrata* и *O. stukovii* с общим для семи видов хлоротипом Н14 в центре. Гаплогруппа III объединяет хлоротип Н29 *O. oxyphylla* и все хлоротипы арктических видов: *O. scheludjakovae*, *O. schmorgunoviae*, *O. sverdrupii*, *O. putoranica* и *O. wrangelii*, которые произошли от центрального гипотетического (вымершего, либо не выявленного в данной выборке) хлоротипа (рис. 2,а). В гаплогруппах I и II выявлены альтернативные связи (петлевые структуры) между хлоротипами, что не позволяет однозначно установить взаимоотношения между популяциями каждого из видов. Кроме того, в гаплогруппах I и II, кроме *O. mongolica*, соседние хлоротипы связаны в основном, одним–двумя мутационными переходами, в то время как в гаплогруппе III некоторые хлоротипы удалены друг от друга на 4–5 мутационных шагов (рис. 2,а). Хлоротипы *O. oxyphylla* обнаружены в двух гаплогруппах: Н14–Н28 в составе гаплогруппы II и хлоротип Н29 популяции OXY8 (9 образцов из 10 исследуемых) в гаплогруппе III, что указывает на существование двух филетических линий. Четкой географической закономерности в распределении хлоротипов в гаплогруппах не обнаружено, за исключением обособленной группы хлоротипов арктических видов.

Нуклеотидные последовательности ITS рДНК 137 образцов, представляющие все выявленные в настоящем исследовании хлоротипы хпДНК всех исследуемых видов *Oxytropis*, кроме *O. pumila* – в связи с отсутствием материала, характеризуются одинаковой длиной

Таблица 2. Генетическое разнообразие популяций видов *Oxytropis* секции *Verticillares* и регистрационные номера нуклеотидных последовательностей *psbA–trnH*, *trnL–trnF* и *trnS–trnG* хпДНК в DDBJ/ENA/Genbank-INSDC

Код популяции (ссылка)	Генетическое разнообразие		Номер доступа в DDBJ/ENA/Genbank-INSDC		
	Гаплотипическое (SD)	Нуклеотидное (SD)	<i>psbA–trnH</i>	<i>trnL–trnF</i>	<i>trnS–trnG</i>
BARKUR [34]	0.762 (0.096)	0.0011 (0.0007)	LT856473–LT856488	LT856506–LT856521	LT856539–LT856554
BARBAR [34]	0.895 (0.070)	0.0016 (0.0009)			
OCHR	0.700 (0.218)	0.0007 (0.0005)	OQ622432–OQ622434	OQ604977–OQ604979	OQ605014–OQ605016
OXY1 [23]	0.900 (0.161)	0.0007 (0.0005)	LT994867–LT994891; OQ622410–OQ622431	LT994921–LT994945; OQ604955–OQ604976	LT996010–LT996034; OQ604992–OQ605013
OXY2 [23]	0.958 (0.036)	0.0023 (0.0013)			
OXY3 [23]	0.964 (0.077)	0.0045 (0.0026)			
OXY4 [23]	1.000 (0.177)	0.0042 (0.0029)			
OXY5	0.956 (0.059)	0.0020 (0.0012)			
OXY6	0.533 (0.180)	0.0005 (0.0004)			
OXY7	0.800 (0.114)	0.0006 (0.0005)			
OXY8	0.978 (0.054)	0.0035 (0.0020)			
PUM [23]	—	—	MH174939	LT996251	LT996252
REVER1	—	—	OQ622459; OQ622460	OQ604909; OQ604910	OQ604938; OQ604939
REVER2	—	—			
SEL [23]	0.634 (0.127)	0.0009 (0.0006)	MH174937; LT996052–LT996057	LT996045–LT996051	LT996038–LT996044
TOMP [34]	0.893 (0.111)	0.0026 (0.0016)	LT856566–LT856571	LT856579–LT856584	LT856592–LT856597
TURCZ1	0.700 (0.218)	0.0003 (0.0003)	OQ622437–OQ622441	OQ604887–OQ604891	OQ604916–OQ604920
TURCZ2	0.583 (0.183)	0.0006 (0.0005)			
MONG [22]	—	—	LN898501	LN898613	LN898625
PROST1	0.894 (0.063)	0.0014 (0.0009)	OQ622442–OQ622458	OQ604892–OQ604908	OQ604921–OQ604937
PROST2	0.956 (0.059)	0.0020 (0.0012)			
PROST3	0.964 (0.077)	0.0010 (0.0007)			
STUK1 [23]	0.833 (0.222)	0.0005 (0.0005)	LT994892–LT994894	LT994946–LT994948	LT996035–LT996037
STUK2	0.711 (0.117)	0.0004 (0.0003)			
LAN1 [23]	0.895 (0.051)	0.0010 (0.0006)	LT994841–LT994858; OQ622400–OQ622402	LT994895–LT994912; OQ604945–OQ604947	LT994949–LT994966; OQ604982–OQ604984
LAN2 [23]	0.895 (0.052)	0.0010 (0.0006)			
LAN3 [23]	0.900 (0.161)	0.0017 (0.0012)			
LAN4	0.378 (0.181)	0.0003 (0.0002)			
LAN5	0.545 (0.072)	0.0029 (0.0017)			
MYR1 [23]	0.700 (0.218)	0.0003 (0.0003)			
MYR2 [23]	0.767 (0.057)	0.0007 (0.0005)	LT994859–LT994866; OQ622403–OQ622409	LT994913–LT994920; OQ604948–OQ604954	LT996002–LT996009; OQ604985–OQ604991
MYR3 [23]	0.821 (0.101)	0.0008 (0.0005)			
MYR4	0.867 (0.129)	0.0005 (0.0004)			
MYR5	0.857 (0.108)	0.0014 (0.0009)			
MYR6	0.733 (0.155)	0.0006 (0.0005)			
GRAC [23]	1.000 (0.126)	0.0042 (0.0027)	MH174938, LT996058–LT996061	LT996062–LT996066	LT996067–LT996071
SCHEL1 [22]	—	—	LN898574; OQ622437; OQ622438	LN898536; OQ604980; OQ604981	LN898648; OQ605017; OQ605018
SCHEL2	—	—			
SCHEL3	—	—	OQ622461	OQ604911	OQ604940
SCHMOR	—	—			
SVERD [22]	—	—	LN898508	LN898620	LN898632
WRANG1	—	—	OQ622463–OQ622465	OQ604913–OQ604915	OQ604942–OQ604944
WRANG2	—	—			
WRANG3	—	—	OQ622462	OQ604912	OQ604941
PUTOR	—	—			

Примечание. SD — стандартное отклонение. Жирным шрифтом выделены популяции, данные о генетическом разнообразии и номера доступа последовательностей, полученные в настоящем исследовании. (—) — расчет параметров генетического разнообразия не производился в связи с малой выборкой популяции (менее пяти образцов).

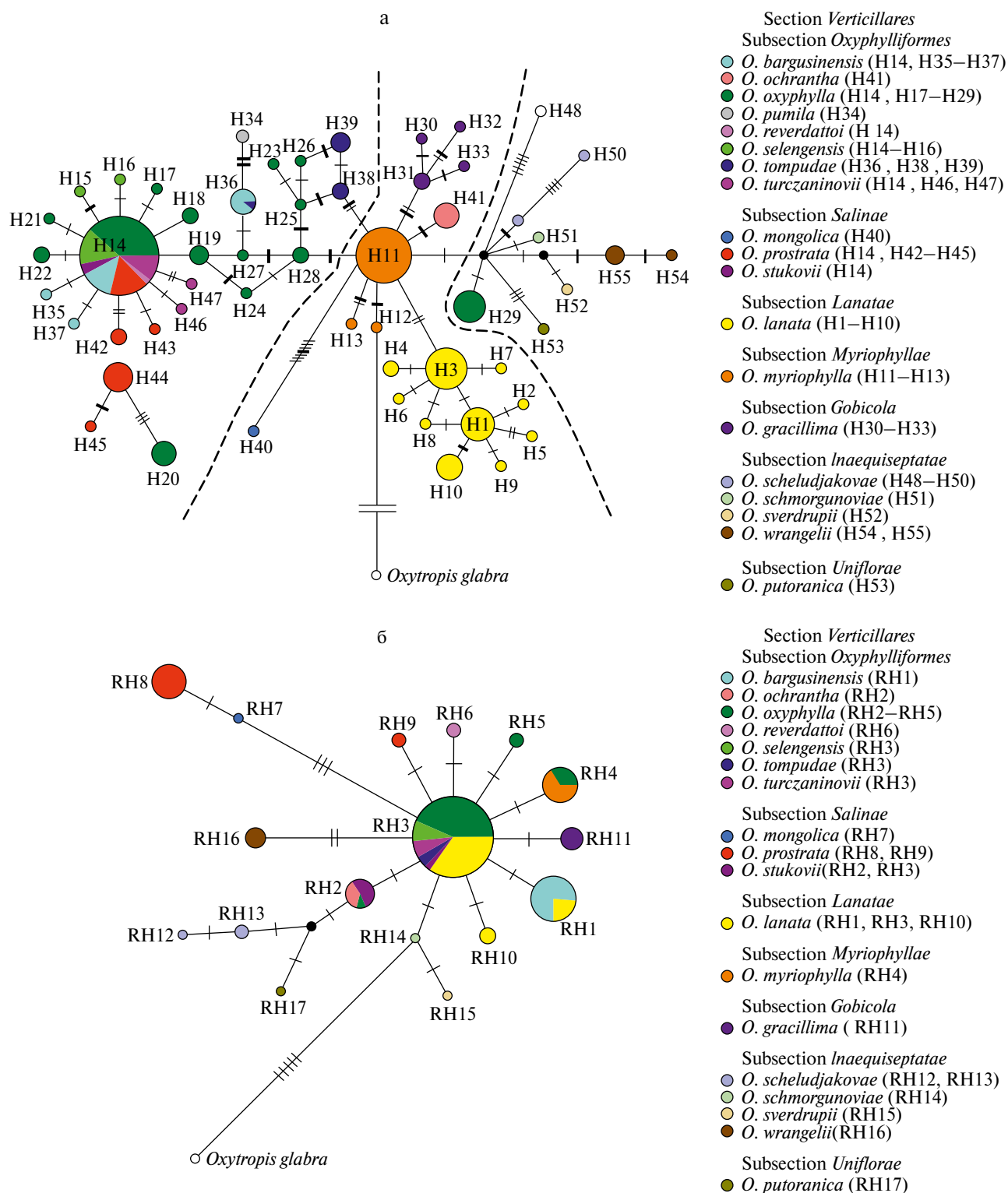


Рис. 2. Генеалогические связи гаплотипов видов *Oxytropis* секции *Verticillares*, построенные с помощью MJ-метода: *a* – генеалогическая сеть хлоротипов хпДНК (H1–H55); *б* – генеалогическая сеть риботипов ITS рДНК (RH1–RH17). Размер окружностей отражает частоту встречаемости хлоро- и риботипов, маленькие черные кружки – гипотетические хлоро- и риботипы, поперечные тонкие пересекающие линии на ветвях – мутационные события, толстые черные пересекающие линии – индели. Пунктирная линия разделяет сеть хлоротипов на гаплогруппы I, II, III. Мутации для *O. glabra*, используемого в качестве внешней группы, не указаны и не рассматриваются.

(603 пн) и низкой/средней нуклеотидной изменчивостью. Размеры последовательностей ITS1, гена 5.8S рДНК и ITS2 составили 227, 164 и 212 пн соответственно. Из 603 сайтов 20 были вариабельными, из них 17 информативны согласно методу максимальной экономии: восемь замен (позиции 28, 73, 119, 122, 166, 175, 178, 223) в ITS1 и девять (позиции 405, 415, 427, 458, 485, 531, 538, 548, 549) в ITS2. В 137 последовательностях выявлено 17 риботипов (RH1–RH17), последовательности которых депонированы в DDBJ/ENA/Genbank-INSDC (табл. 3). В сети генеалогических связей риботипов (рис. 2,б) можно выделить хорошо выраженную “звездчатую” структуру с риботипом RH3 в центре, который является общим для шести видов Южной Сибири: *O. lanata*, *O. oxyphylla*, *O. selengensis*, *O. turczaninovi*, *O. tomopudae* и *O. stukovii*. Кроме того, общие риботипы имеют виды: *O. lanata* и *O. bargusensis* (RH1); *O. ochrantha*, *O. stukovii* и *O. oxyphylla* (RH2); *O. myriophylla* и *O. oxyphylla* (RH4). Все арктические виды секции *Verticillares* имеют индивидуальные риботипы (рис. 2,б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Секция *Verticillares* представляет собой довольно четко обособленную группу видов рода *Oxytropis*. Она предположительно появилась на основе макромутанта, который оказался перспективным и дал начало новым таксонам [3]. Формирование новых видов происходило в регионе, рельеф которого характеризуется многообразием форм, включающих предгорные депрессии, плоские нагорья, горные хребты и межгорные котловины, флора которых образует “степные острова”. Наличие гетерогенного рельефа и различных климатических условий послужили основой для эволюционных преобразований видов этой группы, их диверсификации и возникновению сложных взаимоотношений, что и было показано ранее при изучении морфологического разнообразия видов секции *Verticillares* [9, 10].

Полученные в настоящей работе результаты анализа видов секции *Verticillares* по данным хпДНК отражают высокий уровень разнообразия видов в очаге формирования секции и сложную картину их филогенетических связей. Так, из 32 изученных популяций нет ни одной монотипной популяции. Высокополиморфными являются популяции как довольно распространенных видов (*O. oxyphylla* и *O. lanata*), так

и узколокальных эндемиков (*O. bargusensis* и *O. tomopudae*). Большинство изученных популяций (84.4%), кроме изолированной островной популяции LAN4 *O. lanata*, характеризуются высоким уровнем гаплотипического разнообразия (табл. 2), как и популяции видов *Oxytropis* секций *Polyadena* [25] и *Xerobia* [35] Байкальской Сибири (максимальные величины $h = 0.911$ и $h = 1.000$ соответственно). Нуклеотидное разнообразие в популяциях видов *O. ochrantha* и *O. myriophylla*, расположенных ближе к центру происхождения секции (Южная Сибирь), составило 0.0007 и 0.0003–0.0014 соответственно (табл. 2), в то время как в популяциях этих же видов, расположенных в Северном Китае (≈ 40 – 41° с.ш.), но южнее исследованных нами территорий, оказалось существенно ниже (0.000093 и 0.000095 соответственно) [36]. В целом невысокий уровень нуклеотидного разнообразия согласуется с низкой скоростью мутаций в хлоропластном геноме для рода *Oxytropis*, которая составляет 8.9×10^{-10} замен на сайт в год [37].

Сочетание высокого уровня гаплотипического и низкого уровня нуклеотидного разнообразия для большинства изученных популяций видов *Oxytropis* секции *Verticillares* характерно и для

Таблица 3. Риботипы ITS рДНК видов *Oxytropis* секции *Verticillares* и регистрационные номера нуклеотидных последовательностей в DDBJ/ENA/Genbank-INSDC

Вид	Риботип	Номер доступа в DDBJ/ENA/Genbank-INSDC
<i>O. bargusensis</i>	RH1	OQ625437
<i>O. ochrantha</i>	RH2	OQ625441
<i>O. oxyphylla</i>	RH2, RH3, RH4, RH5	OQ625442–OQ625445
<i>O. reverdattoi</i>	RH6	OQ625452
<i>O. selengensis</i>	RH3	OQ625448
<i>O. tomopudae</i>	RH3	OQ625449
<i>O. turczaninovi</i>	RH3	OQ625450
<i>O. mongolica</i>	RH7	OQ625453
<i>O. prostrata</i>	RH8, RH9	OQ625454, OQ625455
<i>O. stukovii</i>	RH2, RH3	OQ625446, OQ625447
<i>O. lanata</i>	RH1, RH3, RH10	OQ625438–OQ625440
<i>O. myriophylla</i>	RH4	OQ625451
<i>O. gracillima</i>	RH11	OQ625456
<i>O. scheludjakovae</i>	RH12, RH13	OQ625457, OQ625458
<i>O. schmorgunoviae</i>	RH14	OQ625459
<i>O. sverdrupii</i>	RH15	OQ625460
<i>O. wrangelii</i>	RH16	OQ625461
<i>O. putoranica</i>	RH17	OQ625462

других ранее исследованных видов *Oxytropis* Южной Сибири [38] и для *O. diversifolia* ($h = 0.880 \pm 0.074$; $\pi = 0.00061 \pm 0.00020$) из Внутренней Монголии (Китай) [39]. Такое сочетание предполагает быстрый рост популяции от небольшого числа основателей, при этом временной интервал должен быть достаточным для восстановления гаплотипической изменчивости посредством мутаций, но недостаточным для накопления значительных нуклеотидных различий в последовательностях ДНК [40, 41].

На сложный характер филогенетических взаимоотношений изученных видов секции *Verticillares* указывает распределение хлоротипов в генеалогической сети (рис. 2,а). Хлоротипы пяти видов из пяти подсекций: *O. ochrantha* подсекции *Oxyphylliformes*, *O. mongolica* подсекции *Salinae*, *O. gracillima* подсекции *Gobicola*, *O. myriophylla* и *O. lanata* монотипных подсекций *Myriophyllae* и *Lanatae* соответственно, группируются в гаплогруппе I в соответствии с видовой принадлежностью, даже в случае совместного произрастания популяций видов *O. myriophylla* и *O. lanata* в одних и тех же местообитаниях с растениями видов гаплогруппы II (рис. 1; рис. 2,а). Ранее [23] была показана высокая степень генетической дифференциации *O. lanata*, *O. myriophylla*, *O. gracillima* и *O. mongolica* от остальных видов секции *Verticillares*. Высокие генетические дистанции между каждым из вышеперечисленных видов и другими видами секции, а также выявленные в настоящей работе видоспецифические нуклеотидные замены и вставки у *O. lanata* и *O. ochrantha* указывают на существенную дивергенцию их хлоропластных геномов. В основе такой дивергенции видов, произрастающих в зоне симпатрии, могут быть различные причины, но наиболее важной из них в данном случае является, по-видимому, экологическая специализация видов.

Б. А. Юрцев [9], обсуждая пути морфологической эволюции видов секции *Verticillares*, предполагал, что в основе эволюционных преобразований лежит приспособление к различным условиям обитания — к произрастанию в условиях высокогорий, на засоленных и щебнистых субстратах, а также к освоению песчаных субстратов. То, что экологическая дифференциация способствует генетической дивергенции, было неоднократно показано для ряда видов растений, обитателей сложных гетерогенных ландшафтов [42–47]. В ряде случаев генетическая дивергенция связана именно с субстратом [42,

45], как было выявлено, в том числе, и для представителей редких видов *Astragalus* — родственной группы для рода *Oxytropis*, произрастающих в межгорном регионе западной части Северной Америки, диверсификация которых была обусловлена взаимодействием особенностей демографии и эдафических факторов [44].

У *O. myriophylla* хлоротипы H11 и H12 являются, вероятно, предковыми для других видов секции, так как один из них занимает центральное положение в сети, а другой тесно связан с внешней группой. У этого вида более широкая экологическая амплитуда, чем у остальных видов гаплогруппы I, он встречается в каменистых степях, на степных склонах, в сосновых и березовых лесах, на песчаных участках [1, 13, 14], тогда как остальные виды гаплогруппы I — *O. ochrantha*, *O. mongolica*, *O. gracillima* и *O. lanata* приурочены к песчаным участкам степей и прибрежным пескам рек и озер, при этом *O. lanata* наиболее узкоспециализированный вид, псаммофит [1, 9, 13, 14]. Узкая субстратная специфичность была отмечена ранее для видов *Oxytropis*, в частности для видов секции *Arctobia*: растения *O. czukotica* Jurtz. ацидофилы и обитают на кислых горных породах, *O. gorodkovii* Jurtz. — кальцефилы и характерны для карбонатных пород [48]. Несмотря на их морфологическую близость (оба вида входят в комплекс *O. nigrescens* s.l. [48]), виды показали четкую генетическую обособленность по данным изменчивости хлоропластных и ядерных маркеров [49]. Таким образом, узкая специализация к обедненным песчаным почвам могла внести определенный вклад и в формирование обособленных филетических линий видов секции *Verticillares*, хлоротипы которых составляют гаплогруппу I в генеалогической сети.

Ядро гаплогруппы II (рис. 2,а) составляет самый распространенный хлоротип H14, что указывает на общее происхождение образующих ее видов. С наибольшей частотой H14 встречается в популяциях *O. oxyphylla*. Этот вид относится к числу древних малоспециализированных видов секции [8] и является типовым для самой крупной и древней в пределах секции *Verticillares* подсекции *Oxyphylliformes* [9, 17]. Кроме этого, H14 является общим для *O. stukovii*, *O. prostrata* и ряда видов, которые составляют цикл *O. oxyphylla* s. ampliss. (*O. reverdattoi*, *O. selengensis*, *O. turczaninonii* и *O. bargusinensis*, последний у Б. А. Юрцева [9, 17] приведен как “еще не описанная баргузинская раса”). К циклу *O. oxyphylla* s. ampliss. относится и *O. tompudae*,

имеющий общий хлоротип H36 с *O. bargusinensis*, а также два хлоротипа, образующих петлевую структуру с хлоротипами *O. oxyphylla* (рис. 2,а). Такая “звездообразная” топология предполагает быстрый поток генов в популяциях небольшого эффективного размера, которые не были разделены древними барьерами и испытали быстрое и недавнее расширение [40]. Полученные нами ранее демографические данные для некоторых популяций *O. oxyphylla* [24] свидетельствуют о возможной недавней демографической экспансии вида. Сочетание высокого уровня гаплотипического и низкого уровня нуклеотидного разнообразия, характерное для всех популяций видов секции, является также косвенным указанием на относительно недавнее и быстрое демографическое расширение (табл. 2).

Наличие общих хлоротипов у разных видов, обнаруженное только в гаплогруппе II, может быть обусловлено несколькими причинами, среди которых основными принято считать: 1) сохранение полиморфизма предковой формы; 2) неполное расхождение генеалогических линий (incomplete lineage sorting, ILS) во время и после видообразования; 3) интрогрессивная гибридизация между близкими видами [46, 50–55]. В ряде случаев наблюдается взаимное влияние этих факторов. Интрогрессия чаще всего выявляется в зоне симпатрии, в совместно расположенных популяциях разных видов. Отсутствие четкой географической закономерности в распределении хлоротипов в гаплогруппе II свидетельствует о неполной сортировке генеалогических линий [46, 54]. Это вполне вероятно, так как с учетом предполагаемого времени образования секции *Verticillares* около 2.5 млн лет назад [8] прошло недостаточно времени для полной дивергенции пластидных геномов видов цикла *O. oxyphylla* s. ampliss. Кроме того, наличие в сети внутреннего гаплотипа с множественными мутационными связями, в настоящей работе это H14 с 13-ю связями, высокой частотой и широким географическим распространением свидетельствует о присутствии анцестрального полиморфизма ([55] и ссылки в этой работе). При изучении закономерностей распространения этой группы видов было отмечено, что все они имеют узкие разобщенные ареалы, приуроченные к отдельным участкам горных территорий Южной Сибири [56], и являются потомками общего предкового вида, имевшего в криофильных ландшафтах миоцен–плиоцена сплошное зональное распространение [7]. Такая обширная экспансия могла привести к широкому закре-

плению предкового полиморфизма, прежде чем эти виды подверглись морфологической диверсификации. В настоящее время они существуют в форме небольших изолированных популяций [56]. Поэтому высока вероятность того, что наличие общего хлоротипа у нескольких видов секции связано в большей степени с сохранением предкового полиморфизма, а не с текущим обменом генами.

В то же время нельзя исключать и влияние гибридизации на эволюционные процессы у видов гаплогруппы II. Интрогрессия и гибридизация видов рода *Oxytropis*, включая виды секции *Verticillares*, были описаны ранее [9, 10, 12–14, 17]. Так, было указано на гибридное происхождение *O. bargusinensis*, *O. prostrata* и *O. tompudae*, а также на способность *O. oxyphylla* и *O. lanata* к гибридизации. Вероятно, что и появление полиплоидов в подсекции *Oxyphylliformes* (*O. selengensis* и кариологическая раса *O. turczaninovichii* с $2n = 32$) является результатом гибридизации. Поэтому можно предположить, что как гибридизация, так и общий полиморфизм предковой формы могли играть важную роль в формировании эволюционных связей видов цикла *O. oxyphylla* s. ampliss., наблюдаемых в настоящее время (рис. 2,а). Таким образом, картина филогенетических связей хлоротипов видов в гаплогруппе II указывает на сложные процессы видообразования и последующей диверсификации видов цикла *O. oxyphylla* s. ampliss., а также *O. stukovii* и *O. prostrata*.

Подобная картина филогенетических связей, возникающая при взаимном влиянии анцестрального полиморфизма и гибридизации, и наблюдаемый при этом даже у узколокальных эндемиков высокий уровень разнообразия (как у *O. bargusinensis* и *O. tompudae* в настоящей работе) – все это было неоднократно представлено для групп близкородственных видов из различных топографически гетерогенных регионов, которые, как правило, являются очагами биоразнообразия. Например, для видов *Centaurea* (горы континентальной Греции) [50], трех видов альпийского дуба (регион Восточные Гималаи и горы Хэндуань) [51], для видов *Spiraea* (Цинхай-Тибетское нагорье) [52], для видов *Acanthophyllum* (Ирано-Туранская флористическая область) [53] и для изученных нами ранее видов *Oxytropis* секции *Xerobia* (Южная Сибирь и прилегающие территории) [35], из того же региона, что и виды секции *Verticillares*. Эта область (территория возникновения и основного распространения видов секции *Verticillares*) также

практически совпадает с одним из важнейших узлов флористического разнообразия — это так называемый Селенгинско-Даурский узел в Южной Сибири [57]. Очевидно, что *O. oxyphylla*, *O. reverdattoi*, *O. selengensis*, *O. turczaninovii*, *O. bargusinensis*, *O. tomputae*, *O. stukovii*, *O. prostrata* и *O. pumila*, хлоротипы которых образуют гаплогруппу II, имеют самостоятельный видовой статус, но генетически очень близки друг к другу, что свидетельствует об относительной молодости этой группы и активно текущих микроэволюционных процессах в центре образования секции.

Хлоротипы пяти арктических видов, которые являются эндемиками с узкой экологической амплитудой: *O. scheludjakovae*, *O. schmorgunoviae*, *O. sverdrupii* и *O. wrangelii* подсекции *Inaequiseptatae* и *O. putoranica* подсекции *Uniflorae*, образуют гаплогруппу III (рис. 2,а). Два последних как редкие виды включены в “Красную книгу Чукотского автономного округа” (2008) и в “Красную книгу Красноярского края” (2022) соответственно; *O. sverdrupii* как узкоареальный эндемик, обитающий только на о-ве Айон, включен в “Красную книгу Российской Федерации” (2008). Эти виды пространственно изолированы от группы южно-сибирских видов секции, и их хлоротипы генетически обособлены как друг от друга, так и от хлоротипов остальных видов, что свидетельствует о независимой эволюции арктических таксонов с ограниченным потоком генов между ними. Исключением в этой гаплогруппе является хлоротип Н29 *O. oxyphylla*, составляющий вторую филетическую линию, появление которой может быть вызвано конвергентной эволюцией. Из-за того, что анализ арктических видов выполнен на малом количестве гербарных образцов, сложно сделать какие-либо заключения по этой группе, но стоит отметить некоторые особенности. Ранее Б.А. Юрцев [48], характеризуя морфоэкологическую дифференциацию видов подсекции *Inaequiseptatae*, выделил морфологический и эволюционный ряд от *O. schmorgunoviae* (эндемик степных сообществ бассейна Колымы и Западной Чукотки) через *O. sverdrupii* (эндемик о-ва Айон, обитатель сухих тундр) к *O. wrangelii* (эндемик о-ва Врангеля и востока Чукотского п-ова, обитатель сухих и среднеувлажненных тундр). Направлением эволюции в этом ряду является освоение более влажных местообитаний одновременно с адаптацией к более холодному климату, при этом *O. schmorgunoviae* и *O. sverdrupii* — гексаплоиды ($2n = 48$), а у *O. wrangelii* число хромо-

сом увеличивается до $2n = 64$. В генеалогической сети (рис. 2,а) хлоротипы этих видов (Н51 *O. schmorgunoviae*, Н52 *O. sverdrupii*, Н54 и Н55 *O. wrangelii*) расположены в такой же последовательности от гипотетического центрального хлоротипа этой гаплогруппы. Возможно, что такое расположение хлоротипов отчасти обусловлено экологической специализацией этих видов, как и обособление хлоротипа Н53 *O. putoranica*, эндемика плато Путорана и гор Бырранга на Таймыре, кальцефила, обитателя щебнистых горных тундр на обдуваемых участках и известняках [48]. Интересно расположение хлоротипов из трех популяций *O. scheludjakovae*, настолько генетически обособленных друг от друга, что количество мутационных шагов между их хлоротипами превышает таковое между хлоротипами некоторых видов секции (рис. 2,а). Вероятно, это может быть связано с аллопатрической дивергенцией в удаленных изолированных популяциях. У *O. scheludjakovae* было отмечено [13] наличие кариологических рас с числом хромосом 16, 32 и 48, однако эти данные получены для популяций, довольно удаленных от изученных нами, но можно допустить, что процессы полиплоидизации также оказали свое влияние на глубокую внутривидовую дивергенцию *O. scheludjakovae*. Анализ генеалогических связей хлоротипов видов *Oxytropis* [22] показал близость *O. scheludjakovae* и *O. sverdrupii* к видам секции *Orobia*, что согласуется с мнением Юрцева [48] о способности к гибридизации видов секции *Orobia* и подсекции *Inaequiseptatae* секции *Verticillares*. Возможно, что появление полиплоидных рас *O. scheludjakovae* происходило вследствие гибридизации. Таким образом, можно предположить, что эволюционные процессы в группе арктических видов, чьи хлоротипы объединены в гаплогруппу III, происходят на основе экологической специализации, аллопатрической дивергенции и гибридизации с образованием полиплоидных рас и видов, однако для обоснованных выводов нужны исследования на расширенной выборке популяций и видов этой группы.

В генеалогической сети риботипов (рис. 2,б), как и в сети хлоротипов, наблюдается “звездчатая” структура — свидетельство общей экспансии, в центре которой находится риботип RH3 с 11-ю мутационными связями. Это доминантный и потенциальный предковый риботип общий для 6 южно-сибирских таксонов, включая *O. lanata*, хлоротипы которого хорошо дивергированы от хлоротипов других видов гаплогруппы II

(рис. 2,а). Такое “звездчатое” расположение риботипов, как было сказано ранее, обусловлено общим происхождением видов секции *Verticillares*, их относительно недавней дивергенцией, сохранением анцестрального полиморфизма и неполным расхождением филетических линий, а также гибридизацией между таксонами со слабыми репродуктивными барьерами в зоне симпатрии. Кроме того, “звездчатая” структура может указывать на быструю адаптивную радиацию входящих в нее таксонов. Ранее на основе ядерных и хлоропластных маркеров было установлено, что быстрая радиация характерна для рода *Oxytropis* [4], как и других родов сем. Fabaceae: *Lupinus* [58], *Astragalus* [59], *Sophora* [60], *Indigofera* [61] и др. Наличие общего риботипа также было показано нами для шести видов *Oxytropis*, относящихся к трем разным под родам *Phacoxytropis*, *Tragacanthoxytropis* и *Oxytropis* рода *Oxytropis* [26]. Риботипы арктических видов обособлены и не имеют общих риботипов с южно-сибирскими видами, что указывает на их относительно раннюю дивергенцию от этой группы.

В целом необходимо отметить, что количество выявленных хлоротипов (54) у 18 изученных видов секции *Verticillares* (*O. pumila* не учитываем из-за отсутствия риботипа) более чем в 3 раза превышает количество риботипов (17). Это характерно для видов *Oxytropis* других секций, например секция *Orobia* – 5 изученных видов, 39 хлоротипов и 6 риботипов [62], *Arctobia* – 9 видов, 55 хлоротипов и 10 риботипов [49], *Xerobia* – 7 видов, 69 хлоротипов и 2 риботипа [35]. Подобные различия также отмечены и у других видов растений [61, 63, 64]. Это несоответствие возникает, вероятно, в связи с уже упомянутыми процессами быстрой радиации и неполного расхождения филетических линий, а также из-за различных способов наследования хлоропластного и ядерного геномов (унипарентальное или бипарентальное наследование) и способов распространения (распространение только с помощью семян или с помощью пыльцы и семян). Наследуемый по одной родительской линии хлоропластный геном несет только половину эффективной численности популяции, по сравнению с ядерным геном ITS, который распространяется как через пыльцу, так и через семена, и поэтому процесс расхождения филетических линий у ядерной ДНК протекает дольше, чем у хлоропластной ДНК.

Проведенное на основе маркеров хлоропластного генома исследование видов секции *Verticillares* в очаге образования секции пока-

зало, что большинство изученных популяций характеризуются сочетанием высокого гаплотипического и низкого нуклеотидного разнообразия, что предполагает быстрый рост популяции от небольшого числа основателей. По характеру выявленных генеалогических связей между хлоротипами можно предположить наличие разных эволюционных путей для видов секции: 1) дивергенция хорошо генетически обособленных таксонов в зоне симпатрии предположительно на основе экологической специализации; 2) неполное расхождение филетических линий с сохранением предкового полиморфизма в сочетании с гибридизацией слабо дивергировавших таксонов; 3) аллопатрическая дивергенция и полиплоидизация. Полученные данные анализа маркеров хлоропластного и ядерного геномов свидетельствуют о быстрой адаптивной радиации видов секции *Verticillares*. Очевидно, что центр происхождения секции (Байкальская Сибирь и прилегающие районы Южной Сибири, Монголии и Китая) является в настоящее время центром активного видообразования и высокого генетического разнообразия. С учетом того, что секция *Verticillares* включает редкие, эндемичные и ценные лекарственные виды, настоящая работа может послужить основой для выявления центров генетического разнообразия, их сохранения и мониторинга состояния видов.

Авторы выражают благодарность И.Н. Поспелову и Е.Б. Поспеловой за предоставление образцов *O. putoranica* с п-ова Таймыр, М.В. Легченко за предоставление образцов из Гербария высших растений БИН РАН (LE), Санкт-Петербург, и М.Г. Хоревой за предоставление образцов из Гербария ИБПС ДВО РАН (MAG), Магадан.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема 124012400285-7).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhu X., Welsh S. L., Ohashi H. *Oxytropis* // Flora of China. 2010. V. 10. P. 453–500. (<http://www.efloras.org>)
- Малышев Л. И. Фенетика подродов и секций остролодок (род *Oxytropis* DC., Fabaceae) в связи с экологией и филогенией // Сиб. экол. журн. 2008. № 4. С. 571–576. <https://doi.org/10.1134/S1995425508040073>
- Положий А. В. К вопросу о происхождении и эволюции рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Бот. журн. 2003. Т. 88. № 10. С. 55–59.
- Shavvon R. S., Kazempour-Osaloo S., Maassoumi A. A. et al. Increasing phylogenetic support for explosively radiating taxa: The promise of high-throughput sequencing for *Oxytropis* (Fabaceae) // J. Syst. Evol. 2017. V. 55. № 4. P. 385–404. <https://doi.org/10.1111/jse.12269>
- Тулохонов А. К. Байкал: природа и люди. Энциклопедический справочник. Улан-Удэ: ЭКОС, 2009. С. 580.
- Намзалов Б. Б. Байкальский фитогеографический узел как новейший центр эндемизма Внутренней Азии // Сиб. экол. журн. 2009. Т. 16. № 4. С. 563–571. <https://doi.org/10.1134/S1995425509040079>
- Малышев Л. И., Пешкова Г. А. Особенности и генезис флоры Сибири (Предбайкалье и Забайкалье). Новосибирск: Наука, 1984. 364 с.
- Положий А. В. Флорогенетический анализ остролодочников Средней Сибири // Ученые записки ТГУ. Биология и почвоведение. 1965. № 51. С. 18–38.
- Юрцев Б. А. Основные пути эволюции остролодочников секции *Baicalia* Vge. // Бот. журн. 1964. Т. 49. № 5. С. 634–648.
- Малышев Л. И. Фенетика в секции *Verticillares* рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Бот. журн. 2007. Т. 92. № 6. С. 793–807.
- Bunge Al. Species generis *Oxytropis* DC. // Mem. Acad. Sci. Petersb. (Sci. Phys. Math.). Ser. 7. 1874. Т. 22. № 1. 166 p.
- Попов М. Г. *Oxytropis* DC. // Флора Средней Сибири. Т. 1. М.-Л.: Изд. АН СССР, 1957. С. 336–352.
- Малышев Л. И. Разнообразие рода Остролодка (*Oxytropis*) в Азиатской России // Turczaninowia. 2008 а. Т. 11. № 4. С. 5–141.
- Положий А. В. *Oxytropis* DC. // Флора Сибири. Новосибирск: Наука, 1994. Т. 9. С. 74–151.
- Улзийхутаг Н. Бобовые Монголии (таксономия, экология, география, филогения и хозяйственное значение). Улаанбаатар: Бемби Сан, 2003. 587 с.
- Санданов Д. В. Современные подходы к моделированию разнообразия и пространственному распределению видов растений: перспективы их применения в России // Вестн. ТГУ. Биология. 2019. № 46. С. 82–114. <https://doi.org/10.17223/19988591/46/5>
- Юрцев Б. А. Конспект системы секции *Baicalia* Vge рода *Oxytropis* DC. // Новости систематики высших растений. М.: Наука, 1964. С. 191–218
- Krivenko D. A., Kotseruba V. V., Kazanovsky S. G. et al. Fabaceae // IAPT/IOPB chromosome data 11 / Ed. Marhold K. // Taxon. 2011. V. 60. № 4. P. 1222.
- Konichenko E. S., Selyutina I. Yu., Dorogina O. V. *Oxytropis triphylla* // IAPT/IOPB chromosome data 14 / Ed. Marhold K. // Taxon. 2012. V. 61. № 6. P. 1338–1339.
- Gao J., Lu P., Wang J.-N. et al. Molecular phylogeny of several species of *Oxytropis* DC. based on 5.8S rDNA/ITS sequence // Acta Agric. Bor. Sin. 2009. V. 24. № 6. P. 168–173. <https://doi.org/10.7668/hbnxb.2009.06.034>
- Archambault A., Stromvik M. V. Evolutionary relationships in *Oxytropis* species, as estimated from the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences point to multiple expansions into the Arctic // Botany. 2012. V. 90. № 8. P. 770–779. <https://doi.org/10.1139/B2012-023>
- Холина А. Б., Козыренко М. М., Артюкова Е. В. и др. Филогенетические взаимоотношения видов *Oxytropis* DC. subg. *Oxytropis* и *Phacoxytropis* (Fabaceae) Азиатской России на основе анализа нуклеотидных последовательностей межгенных спейсеров хлоропластного генома // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 895–909. <https://doi.org/10.1134/S1022795416060065>
- Холина А. Б., Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Санданов Д. В. Дивергенция видов *Oxytropis* секции *Verticillares* (Fabaceae) степной флоры Байкальской Сибири на основе анализа хлоропластной ДНК // Генетика. 2019. Т. 55. № 6. С. 665–674. <https://doi.org/10.1134/S0016675819060055>
- Холина А. Б., Позднякова Т. Э., Санданов Д. В. Состояние популяций ценных лекарственных видов рода *Oxytropis* Байкальской Сибири по данным хлоропластной ДНК // Изв. СПБГАУ. 2022. № 3 (68). С. 20–31. <https://doi.org/10.24412/2078-1318-2022-3-20-31>
- Холина А. Б., Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Позднякова Т. Э. Изменчивость хлоропластной ДНК видов *Oxytropis* секции *Polyadena* (Fabaceae) Азиатской России: популяционный анализ и филогенетические связи // Изв. РАН. Сер. биол. 2021. № 1. С. 19–29. <https://doi.org/10.1134/S1062359021010076>
- Холина А. Б., Козыренко М. М., Артюкова Е. В. и др. Филогенетические связи видов Азиатской России подродов *Phacoxytropis* и *Tragacanthoxytropis* рода *Oxytropis* на основе полиморфизма маркеров хлоропластного и ядерного геномов // Генетика. 2021. Т. 57. № 9. С. 1039–1053. <https://doi.org/10.31857/S0016675821090058>
- Kholina A., Kozyrenko M., Artyukova E. et al. Phylogenetic relationships of *Oxytropis* section *Gloecephala* from Northeast Asia based on sequencing of the intergenic spacers of cpDNA and ITS nrDNA // Genetica. 2022. V. 150. P. 117–128. <https://doi.org/10.1007/s10709-022-00152-y>
- Mir B. A., Koul S., Kumar A. et al. Intraspecific variation in the internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA in *Withania somnifera* (Linn.) Dunal // Indian J. Biotechnol. 2010. V. 9. P. 325–328.
- Bonfeld J. K., Smith K. F., Staden R. A new DNA se-

- quence assembly program // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4992–4999.
30. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. P. 221–224.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
 31. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
 32. Excoffier L., Lischer H. E. L. Arlequin suite v3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resour. 2010. V. 10. P. 564–567.
 33. Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
 34. Холина А. Б., Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Санданов Д. В. Современное состояние популяций эндемичных видов *Oxytropis* Байкальской Сибири и их филогенетические связи по данным секвенирования маркеров хлоропластной ДНК // Генетика. 2018. Т. 54. № 7. С. 795–806.
<https://doi.org/10.1134/S1022795418070050>
 35. Kholina A., Kozyrenko M., Artyukova E. et al. Genetic diversity of *Oxytropis* section *Xerobia* (Fabaceae) in one of the centres of speciation // Genetica. 2021. V. 149. № 2. P. 89–101.
<https://doi.org/10.1007/s10709-021-00115-9>
 36. Guo C., Zhang L., Zhao Q. et al. Host-species variation and environment influence endophyte symbiosis and mycotoxin levels in Chinese *Oxytropis* species // Toxins. 2022. V. 14.
<https://doi.org/10.3390/toxins14030181>
 37. Wojciechowski M. F. *Astragalus* (Fabaceae): A molecular phylogenetic perspective // Brittonia. 2005. V. 57. P. 382–396.
 38. Sandanov D. V., Kholina A. B., Kozyrenko M. M. et al. Genetic diversity of *Oxytropis* species from the center of the genus origin: insight from molecular studies // Diversity. 2023. V. 15.
<https://doi.org/10.3390/d15020244>
 39. Wang H., Liu P.-L., Li J. et al. Why more leaflets? The role of natural selection in shaping the spatial pattern of leaf-shape variation in *Oxytropis diversifolia* (Fabaceae) and two close relatives // Front. Plant Sci. 2021. V. 12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.681962>
 40. Avise J. C. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press, 2000. 441 p.
 41. Абрамсон Н. И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Инф. Вест. ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.
 42. Moore A. J., Merges D., Kadereit J. W. The origin of the serpentine endemic *Minuartia laricifolia* subsp. *ophioliica* by vicariance and competitive exclusion // Mol. Ecol. 2013. V. 22. P. 2218–2231.
<https://doi.org/10.1111/mec.12266>
 43. Cortés A. J., Garzón L. N., Valencia Jh. B., Madriñán S. On the causes of rapid diversification in the Páramos: isolation by ecology and genomic divergence in *Espeletia* // Front. Plant Sci. 2018. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01700>
 44. Jones M. R., Winkler D. E., Massatti R. The demographic and ecological factors shaping diversification among rare *Astragalus* species // Divers. Distrib. 2021. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1111/ddi.13288>
 45. Sampson J., Byrne M. Genetic differentiation among subspecies of *Banksia nivea* (Proteaceae) associated with expansion and habitat specialization // Diversity. 2022. V. 14.
<https://doi.org/10.3390/d14020098>
 46. Yang Zh., Ma W.-X., He X. et al. Species divergence and phylogeography of *Corylus heterophylla* Fisch complex (Betulaceae): inferred from molecular, climatic and morphological data // Mol. Phylogenet. Evol. 2022. V. 168.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107413>
 47. Özüdoğru B., Karacaoğlu Ç., Akaydin G. et al. Ecological specialization promotes diversity and diversification in the Eastern Mediterranean genus *Ricotia* (Brassicaceae) // J. Syst. Evol. 2022. V. 60. P. 331–343.
<https://doi.org/10.1101/2020.08.30.274670>
 48. Юрцев Б. А. *Oxytropis* DC. // Арктическая флора СССР. Л.: Наука, 1986. Вып. 9. Ч. 2. С. 61–146.
 49. Холина А. Б., Козыренко М. М., Артюкова Е. В. и др. Филогенетические отношения видов *Oxytropis* секции *Arctobia* северо-востока Азии по данным секвенирования межгенных спейсеров хлоропластного и ITS ядерного геномов // Генетика. 2020. Т. 56. № 12. С. 1386–1397.
<https://doi.org/10.1134/S1022795420120091>
 50. Lopez-Vinyallonga S., Lopez-Pujol J., Constantinidis Th. et al. Mountains and refuges: Genetic structure and evolutionary history in closely related, endemic *Centaurea* in continental Greece // Mol. Phylogenet. Evol. 2015. V. 92. P. 243–254.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.06.018>
 51. Feng L., Zheng Q.-J., Qian Z.-Q. et al. Genetic structure and evolutionary history of three alpine sclerophyllous oaks in East Himalaya-Hengduan Mountains and adjacent regions // Front. Plant Sci. 2016. V. 7.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01688>
 52. Khan G., Zhang F., Gao Q. et al. Spiroides shrubs on Qinghai-Tibetan Plateau: Multilocus phylogeography and palaeodistributional reconstruction of *Spiraea alpina* and *S. mongolica* (Rosaceae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2018. V. 123. P. 137–148.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.02.009>
 53. Mahmoudi Shamsabad M., Assadi M., Parducci L. Phylogeography and population genetics of *Acanthophyllum squarrosum* complex (Caryophyllaceae) in the Irano-Turanian region // Syst. Biodivers. 2019. V. 17. № 4. P. 412–421.
<https://doi.org/10.1080/14772000.2019.1590476>
 54. Schanzer I. A., Fedorova A. V., Shelepova O. V., Suleymanova G. F. Molecular phylogeny and phylogeography of *Potentilla multifida* L. agg. (Rosaceae) in Northern Eurasia with special focus on two rare and critically endangered endemic species, *P. vulgarica* and *P. eversmanniana* // Plants. 2020. V. 9.

- <https://doi.org/10.3390/plants9121798>
55. Li Y., Wang L., Zhang X. et al. Extensive sharing of chloroplast haplotypes among East Asian *Cerris* oaks: The imprints of shared ancestral polymorphism and introgression // *Ecol. Evol.* 2022. V. 12. <https://doi.org/10.1002/ece3.9142>
 56. Sandanov D.V., Dugarova A.S., Brianskaia E.P. et al. Diversity and distribution of *Oxytropis* DC. (Fabaceae) species in Asian Russia // *Biodivers. Data J.* 2022. V. 10. <https://doi.org/10.3897/BDJ.10.e78666>
 57. Намзалов Б.Б. Важнейшие узлы биоразнообразия и фитогеографические феномены горных степей Южной Сибири // *Аридные экосистемы.* 2021. Т. 27. № 3 (88). С. 24–36. doi: 10.1134/S2079096121030100
 58. Drummond C.S., Eastwood R.J., Miotto S.T.S., Hughes C.E. Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (Leguminosae): Testing for key innovation with incomplete taxon sampling // *Syst. Biol.* 2012. V. 61 (3). P. 443–460. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr126>
 59. Bagheri A., Maassoumi A.A., Rahiminejad M.R. et al. Molecular phylogeny and divergence times of *Astragalus* section *Hymenostegis*: An analysis of a rapidly diversifying species group in Fabaceae // *Sci. Rep.* 2017. № 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14614-3>
 60. Shepherd L.D., Heenan P.B. Evidence for both long-distance dispersal and isolation in the Southern Oceans: Molecular phylogeny of *Sophora* sect *Edwardsia* (Fabaceae) // *N. Z.J. Bot.* 2017. V. 55. № 3. P. 334–346. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2017.1353527>
 61. Zhao X.L., Gao X.F., Zhu Zh.M. et al. The demographic response of a deciduous shrub (the *Indigofera bungeana* complex, Fabaceae) to the Pleistocene climate changes in East Asia // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00613-x>
 62. Козыренко М.М., Холина А.Б., Артюкова Е.В. и др. Молекулярно-филогенетическая характеристика эндемичных дальневосточных близкородственных видов секции *Orobia* рода *Oxytropis* (Fabaceae) // *Генетика.* 2020. Т. 56. № 4. С. 421–432. <https://doi.org/10.1134/S1022795420040043>
 63. Hou B., Luo J., Zhang Y. et al. Iteration expansion and regional evolution: Phylogeography of *Dendrobium officinale* and four related taxa in southern China // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. <https://doi.org/10.1038/srep43525>
 64. Zheng H.-Y., Guo X.-L., Price M. et al. Effects of mountain uplift and climatic oscillations on phylogeography and species divergence of *Chamaesium* (Apiaceae) // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.673200>
 65. Zhang S.Z., Ma Y.C., Li M.X. Cytotaxonomical studies on 14 species of *Oxytropis* DC. from Neimenggu // *Acta Sci. Nat. Univ. Neimenggu.* 1994. V. 25. P. 64–72.
 66. Sandanov D.V., Dugarova A.S., Brianskaia E.P. et al. Diversity and distribution of *Oxytropis* DC. (Fabaceae) species in Asian Russia // *Biodivers. Data J.* 2022. V. 10. <https://doi.org/10.3897/BDJ.10.e78666>

THE EVOLUTIONARY PATHWAYS OF *Oxytropis* SPECIES OF THE SECTION *Verticillares* AT THE CENTER OF THE SECTION ORIGIN

A. B. Kholina^{1,*}, E. V. Artyukova¹, D. V. Sandanov²

¹Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

²Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia

*e-mail: kholina@biosoil.ru

Genetic diversity and phylogenetic relationships of *Oxytropis* species from the section *Verticillares* were studied based on nucleotide polymorphism of cpDNA intergenic spacers *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, and *trnS-trnG* at the center of the section origin (Baikal Siberia and adjacent territories of South Siberia, Mongolia, and China). Moreover, at the first time the reconstruction of phylogenetic relationships of species from section *Verticillares* based on the analysis of ITS nrDNA has been performed. The paper summarizes new samples and new data for unstudied species and populations. 84.4% populations of 11 species are characterized by a high level of chloroplast haplotype diversity (*h* varies from 0.700 to 1.000). The majority of populations (71.9%) have high haplotype diversity with low nucleotide diversity. Three haplogroups revealed in the genealogical network of chlorotypes indicate that there are different evolutionary pathways of the species included in these groups: divergence of genetically isolated taxa in the zone of sympatry presumably on the base of ecological specialization; incomplete lineage sorting with preserving of ancestral polymorphism in combination with hybridization of weakly diversified taxa; allopatric divergence and polyploidization. Analysis of markers of chloroplast and nuclear genomes testify the rapid adaptive radiation of *Oxytropis* section *Verticillares*.

Keywords: genetic diversity, phylogenetic relationships, chloroplast DNA, ITS nrDNA, Fabaceae, *Oxytropis*, *Verticillares*.

УДК 581.15:575.8:582.477.6

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ *Juniperus deltoides* R.P. Adams В КРЫМСКО-КАВКАЗСКОМ РЕГИОНЕ ПО ДАННЫМ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ

© 2024 г. Е. В. Хантемирова^{1, *}, Ц. Радукова²

¹ Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

² Пловдивский университет им. П. Хилендарского, кафедра ботаники и биологического образования, Пловдив, 4000 Болгария

*e-mail: hantemirova@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 19.06.2023 г.

После доработки 21.09.2023 г.

Принята к публикации 25.09.2023 г.

В северо-восточной части ареала изучена структура генетической изменчивости можжевельника дельтовидного *Juniperus deltoides* R.P. Adams (семейство Cupressaceae) — важного компонента средиземноморских аридных и полуаридных экосистем. Для генотипирования выборки из шести популяций этого вида в западных регионах Крыма, Кавказа и на Балканах впервые были применены пять ядерных микросателлитных локусов, разработанных для другого вида — *J. cedrus* Webb & Berthel. Для *J. deltoides* характерен средний уровень внутривидовой генетической изменчивости (H_e варьирует от 0.428 до 0.602) с наименьшими значениями в крымских популяциях. Филогенетический анализ выявил статистически значимую дифференциацию исследуемых популяций (9.9% от общей изменчивости, $P < 0.001$) на три генетические группы: Западный Крым, Кавказ (Краснодарский край) и Балканы (Болгария). Первые две группы соответствуют ранее выявленной азиатской группе *J. deltoides*, третья — балканской группе. Дифференциация крымских популяций от географически близких кавказских популяций показана нами впервые.

Ключевые слова: *Juniperus deltoides*, ядерная ДНК, SSR-маркеры, генетическое разнообразие.

DOI: 10.31857/S0016675824020032 **EDN:** DRSEKX

Важным компонентом средиземноморских аридных и полуаридных экосистем является теплолюбивый и исключительно засухоустойчивый вид можжевельник колючий или красный — *Juniperus oxycedrus* L. (семейство Cupressaceae). Это небольшое деревце или кустарник с красновато-коричневыми шишкочагодами и колючей хвоей. Внутри этого изменчивого вида выделяют четыре подвида, различающихся по габитусу, размеру шишкочагод и ширине хвои [1]. Из них наиболее распространенным является *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, который свою очередь также оказался неоднороден. Применение молекулярных методов и анализ содержания терпеноидов в листьях выявили существенные различия между западно- и восточно-средиземноморскими особями, что послужило причиной выделения двух отдельных видов — типичного *J. oxycedrus* в западном Средиземноморье и нового вида *J. deltoides* R.P. Adams в Восточно-Средиземноморском регионе (Балканы, Малая Азия, Крым) [2–4] (рис. 1). Внешние отличия *J. deltoides* незначительны и сводятся к линейно-треугольным листьям и на-

личию на шишкочагоде выступающих кончиков семенных чешуй (у *J. oxycedrus* узколанцетные листья и незаметные рубчики на шишкочагоде). Отсутствие явных морфологических различий между этими двумя таксонами позволило рассматривать *J. deltoides* как криптовид [3]. Предполагают, что так же, как у многих других древесных видов, эта дифференциация связана с расселением из разных рефугиумов в плейстоцене — восточных популяций из восточно-средиземноморских плейстоценовых рефугиумов в Малой Азии и на Аравийском полуострове, а западных — из западно-средиземноморских рефугиумов в южной части Пиренейского полуострова и Северо-Западной Африки [6, 7].

Можжевельник колючий, произрастающий в районе наших исследований (Крымский п-ов, Краснодарский край и Болгария), находится в восточной части обширного ареала и, согласно вышеупомянутым исследованиям, относится к *J. deltoides*. Хотя существуют мнения, что отличия этого криптовиды отражают скорее внутривидовую изменчивость [1, 8], мы в данной работе

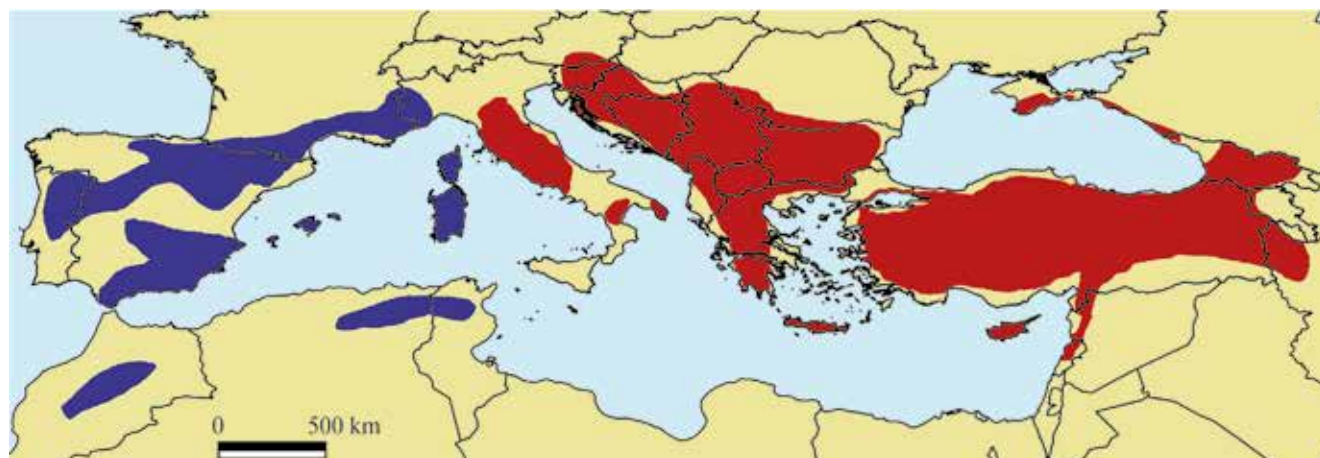


Рис. 1. Ареалы *Juniperus deltooides* (красный цвет) и *J. oxycedrus* (синий цвет) по R.P. Adams [3].

будем использовать номенклатурное название *J. deltooides*.

Использование ядерных микросателлитов (SSR-маркеров) для этого видового комплекса позволило выявить дальнейшую дифференциацию *J. deltooides* на балканскую и азиатскую группы [9]. В азиатской группе оказался и *J. deltooides*, собранный на Крымском п-ове. Однако материал исследования с полуострова был ограничен всего одной популяцией и не позволил сделать конкретные выводы, помимо общих предположений об ограниченном потоке генов, вызванном фрагментацией ареала и/или выживанием в разных рефугиумах во время последних ледниковых циклов.

В целом, следует признать, что исследования биогеографических закономерностей у *J. deltooides* почти не охватывают крымско-кавказский регион, где проходит северо-восточная граница ареала этого вида. Этот вид растет здесь в горах на небольших высотах и не образует сомкнутых лесов, в отличие от другого распространенного древовидного можжевельника *J. exelsa* M. Bieb. Ареал *J. deltooides* в данном регионе в течение прошлого века значительно сократился в результате антропогенного воздействия и подвергся фрагментации. Этот вид включен в Красные Книги Республики Крым и Краснодарского края [10, 11]. Крымский п-ов с точки зрения филогеографии заслуживает особого изучения. Этот уникальный полуостров, который почти полностью окружен Черным и Азовским морями, принято считать самым удаленным северо-восточным эксклавом природы Средиземноморья [12]. Можно предположить, что *J. deltooides* из изолированных популяций Крыма может иметь некоторые генетиче-

ские отличия от *J. deltooides*, обитающих в других районах Причерноморья (Болгария, Грузия и Анатолийское побережье Турции).

Основной целью данного исследования является оценка генетической изменчивости и популяционной структуры *J. deltooides* в районе бассейна Черного моря, а также определение существующих биогеографических тенденций и генетических связей между популяциями по данным изменчивости пяти микросателлитных локусов. Полученные результаты и выводы обеспечат теоретическую основу для разработки стратегии сохранения этого вида можжевельника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мультилокусный генетический анализ с помощью ядерных микросателлитов был проведен на 117 образцах ДНК из шести природных популяций можжевельника колючего (две популяции из Краснодарского края, три из Крыма и одна из Болгарии) (табл. 1, рис. 2,а).

ДНК выделяли методом Devey [13] из сухой хвои, засушенной в силикагеле. На четырех образцах ДНК *J. deltooides* были протестированы 28 пар праймеров: 6 пар, разработанных для *J. communis* L., [14], 9 пар, разработанных для *J. przewalskii* Ком. [15], 13 пар — для *J. cedrus* Webb & Berthel. [16]. Успешно аплифицированные локусы использовали для дальнейшего тестирования. Для этого на восьми образцах ДНК *J. deltooides* из двух популяций из разных географических точек проводили амплификацию с немечеными олигонуклеотидами, затем визуализировали продукты реакции на акриламидных гелях с серебряным окрашивани-

Таблица 1. Исследуемые популяции *Juniperus deltoides* и параметры генетического разнообразия

№	Популяция	Координаты, с. ш./в. д.	Высота над уровнем моря, м	<i>N</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>
Краснодарский край								
1	Большой Утриш	N 44°45' /E 37°23'	125	24	2.58	0.379	0.582	0.318
2	Сукко	N 44°48' /E 37°26'	39	22	2.70	0.382	0.602	0.362
среднее					2.64	0.381	0.592	
Крымский полуостров								
3	Чуфут-Кале	N 44°44' /E 33°55'	457	23	2.67	0.308	0.570	0.457
4	Бахчисарай	N 44°45' /E 33°54'	332	19	2.32	0.260	0.468	0.426
5	Мыс Мартыан	N 44°30' /E 34°14'	130	19	2.04	0.258	0.428	0.323
среднее					2.33	0.275	0.489	
Болгария								
6	г. Пловдив, д. Марково	N 42°02' /E 24°42'	607	10	2.27	0.431	0.509	0.137

Примечание. *N* – общее количество образцов, *Ne* – эффективное число аллелей на локус, *Ho* – наблюдаемая гетерозиготность, *He* – ожидаемая гетерозиготность, *F* – индекс фиксации.

ем и смотрели, есть ли изменчивость. Локусы, разработанные для *J. przewalskii*, у *J. deltoides* оказались неизменчивыми. Из локусов, разработанных для *J. communis*, были отобраны *Jc16*, *Jc31*, *Jc32* и *Jc35*, как нормально амплифицируемые и изменчивые, но в дальнейшем они были исключены из анализа из-за трудностей с интерпретацией. Пять локусов, разработанных для *J. cedrus* (*Jce01*, *Jce08*, *Jce10*, *Jce11* и *Jce13*), оказались изменчивыми и для *J. deltoides* и из них был составлен мультиплекс с учетом температуры отжига праймеров, сочетания флуоресцентного красителя и длины продукта (табл. 2). Использовалась следующая программа ПЦР: 5 мин при 95°C, затем 35 циклов: 30 с при 95°C, 45 с при 60°C, 90 с при 72°C и 15 мин при 72°C. ПЦР-продукт разводили в пять раз. 1 мкл разбавленного ПЦР-продукта смешивали с 8.5 мкл формамида и 0.5 мкл размерного стандарта или маркера молекулярной массы S-450 (Гордиз). Длины амплифицированных фрагментов определяли на НАНОФОР-05. Хроматограммы расшифровывались в программе GeneMapper v. 4.0 сначала автоматически, а затем проверялись вручную.

С помощью программ GENALEX v. 6.5 [17] и ARLEQUIN v. 3.5.2 [18] вычисляли следующие параметры генетической изменчивости: эффективное число аллелей на локус (*Ne*), число уникальных аллелей, наблюдаемая (*Ho*) и ожидаемая (*He*) гетерозиготности, индекс фиксации (*F*), коэффициент генетической дифференциации популяций (F_{ST}). Тест на равновесие Харди-Вайнберга (HWE) был выполнен с помощью

GENEPOP v. 4.2 [19]. Частоту нулевых аллелей оценивали методом Брукфилда [20], реализованным в программном обеспечении MICRO-CHECKER 2.2.3 [21].

Несколько подходов были использованы для изучения популяционной структуры и филогенетических анализов *J. deltoides*. С помощью анализа главных координат (PCoA в GENALEX v. 6.5) была проведена кластеризация популяций на основе матрицы парных генетических дистанций (DA) Nei [22]. Матрицы значений D были использованы также для построения UPGMA дендрограммы в пакете программ NTSYSpc 2.1 [23].

Вклад генотипов в каждую изучаемую популяцию оценивали на основе байесовского подхода с алгоритмом MCMC (цепь Маркова Монте-Карло) с помощью STRUCTURE 2.3.4 [24]. Наиболее вероятное количество кластеров определяли на основе апостериорной вероятности данных для заданного *K* методом Evanno

Таблица 2. Характеристика пяти микросателлитных локусов, используемых для *Juniperus deltoides*

Локус	Мотив	Температура отжига, °C	Размер фрагмента, п. н.	Число аллелей
Jce01 F: FAM	(AAACCT)6	60	233–251	4
Jce08 F: FAM	(ATAC)10	60	161–201	8
Jce10 F: FAM	(ATC)10	60	272–293	6
Jce11 F: HEX	(TTC)10	60	327–346	6
Jce13 F: TAMRA	(CATA)12	60	194–222	7

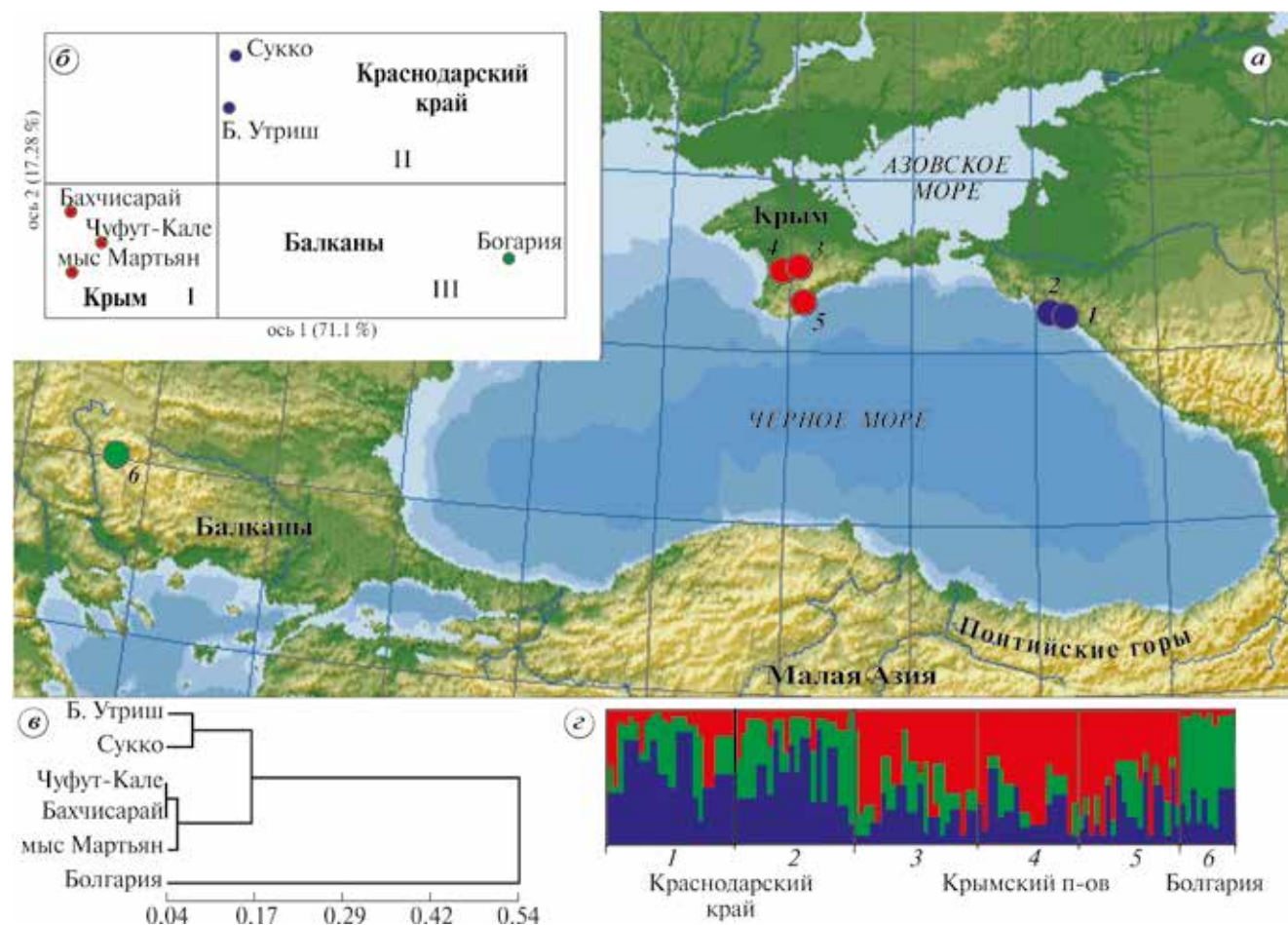


Рис. 2. Очертания района исследований с расположением исследованных популяций *J. deltoides*, распределение генетических групп и графики с оценками SSR-полиморфизма. Номера популяций и географические координаты пояснены в табл. 1. *a* – распределение генетических групп *J. deltoides* на основе полиморфизма SSR-маркеров. Цвет значков соответствует группам SAMOVA и PCoA. *б* – ординация популяций *J. deltoides* методом главных координат (PCoA) на основе их генетических дистанций; римскими цифрами обозначены группы согласно SAMOVA. *в* – UPGMA-дендрограмма популяций *J. deltoides*, построенная на основе их генетических дистанций в программе NTSYSpc 2.1. *г* – результаты анализа STRUCTURE.

в программе STRUCTURE HARVESTER [25]. Для идентификации популяционных кластеров был также использован пространственный анализ молекулярной изменчивости (SAMOVA v. 1.0) [26]. Корреляцию между генетическим и географическим расстояниями для пар выборок анализировали посредством теста Мантелла [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате мультилокусного анализа в популяциях *J. deltoides* выявлен 31 аллельный вариант, из них 6 уникальных. Все локусы полиморфны с числом аллелей, варьирующим от четырех до восьми. Самые высокие показатели генетического разнообразия оказались в популяциях Краснодарского края, самые низкие – в крым-

ских популяциях. В целом *J. deltoides* показал средний уровень генетического разнообразия.

Согласно тесту Харди–Вайнберга, три локуса (*Jce08*, *Jce10*, *Jce11*) из пяти показали значимое отклонение ($P < 0.01$). В локусах *Jce08* и *Jce11* это может быть связано с наличием нуль-аллелей. Во всех популяциях (кроме болгарской) наблюдаются отклонения от Харди–Вайнберга с дефицитом гетерозигот. Значения F высоко положительные, варьирующие от 0.137 до 0.457.

Степень генетической дифференциации между всеми анализируемыми популяциями $F_{ST} = 14\%$. Согласно тесту Мантелла, наблюдается высокий коэффициент корреляции по генетическим расстояниям между популяциями

J. deltoides, основанный на частотах SSR-маркеров, и географическими расстояниями между ними ($r = 0.869$, $p = 0.06$). В результате пространственного анализа молекулярной изменчивости (SAMOVA) все популяции делятся на три группы по географическому расположению: Болгария, Крым и Краснодарский край. Дифференциация между этими же тремя группами была выявлена при помощи анализа главных координат на основании генетических дистанций между популяциями (рис. 2,б). Крымские популяции значительно отделены от остальных по первой главной координате (71.1% от общей изменчивости). Согласно второй главной компоненте, популяция из Болгарии дифференцируется от популяций Краснодарского края (17.28% изменчивости). На UPGMA-дендрограмме видно, что наибольшие генетические дистанции между болгарской популяцией и всеми крымско-кавказскими (рис. 2,в). Такие же три группы выявились при оценке данных STRUCTURE ($K = 3$, $\Delta K = 5.18$) (рис. 2,г). Применение AMOVA для трех генетических кластеров показало статистически значимую дифференциацию (9.9% от общей изменчивости, $P < 0.001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни генетического разнообразия и дифференциации у *J. deltoides*, обнаруженные в нашей работе, сходны с результатами, полученными для этого вида при помощи трех SSR-маркеров польскими исследователями [9]. Средняя ожидаемая гетерозиготность H_e в этой работе составляла 0.519, в нашей — 0.527. У *J. exelsa* в Турции среднее H_e равно 0.524 [28]. Эти показатели соответствуют среднему уровню генетического разнообразия и свидетельствуют о том, что антропогенная фрагментация в этих популяциях не оказала значительного влияния на показатели генетического разнообразия. Низкий показатель дифференциации у *J. exelsa* (2%) по сравнению с полученным в нашей работе у *J. deltoides* (9.9%) может свидетельствовать о лучшем генном потоке у первого вида или о более однородном произрастании вида на территории, на которой отбирали образцы.

При сравнении показателей генетического разнообразия у *J. deltoides* с таковыми у *J. communis* [29] оказывается, что у последнего они значительно выше ($H_e = 0.708$). Это может быть связано с тем, что *J. communis*, являясь холодостойким видом, имеет более широкий современный ареал и, возможно, способен был переживать леднико-

вые периоды в микрорефугиумах. При этом коэффициенты инбридинга у обоих видов одинаково высоки, что может определяться биологическими особенностями данных видов. Есть мнение, что это явление характерно для многих видов семейства Cupressaceae [30].

В работе с использованием SSR маркеров [9] статистически значимая дифференциация (6.7% от общей изменчивости, $P < 0.001$) была обнаружена между популяциями *J. deltoides* балканской группы (Греция, Босния и Герцеговина) и популяциями азиатской группы (Турция, Израиль и дополнительная популяция из Крыма). Выявленную структуру авторы объясняют фрагментацией ареала и/или различными рефугиумами, в которых этот вид выживал во время последнего ледникового максимума. По результатам изменчивости ITS ядерной ДНК и двух хлоропластных маркеров (*petN-psbM*, *trnS-trnG*) крымские популяции *J. deltoides* также оказались в одной группе с популяциями этого вида из Малой Азии (Турции) [31].

Мы обнаружили сходную дифференциацию популяций *J. deltoides*, согласно которой популяция *J. deltoides* из Болгарии может относиться к балканской группе, а крымские и кавказские популяции этого вида, по-видимому, — к азиатской группе. Кроме того, наши результаты выявили дальнейшую дифференциацию азиатской группы, показав обособленность крымских популяций от материковых кавказских.

Дифференциация крымских популяций *J. deltoides* не только от болгарской популяции, но и от географически близких популяций этого вида из Краснодарского края, может определяться общим своеобразием флоры этого полуострова и сложной геологической историей Черноморской впадины, а также неоднократными трансгрессиями моря — появлением и исчезновением сухопутных мостов суши. Крымская флора имеет смешанные черты, так как в прошлом испытывала влияние флоры Балкан, Кавказа и Малой Азии [12, 32]. Это нашло свое отражение и в генетической структуре некоторых видов. Например для крымского бука *Fagus taurica* Popl. доказано гибридное происхождение от балканского *F. sylvatica* s. str и кавказского *F. orientalis* Lipsky [33].

Для других крымских древесных видов, наоборот, миграции из разных географических источников с последующей изоляцией могли

вызывать процессы генетической дифференциации. Например, по результатам анализа изменчивости хлоропластной ДНК, робуроидные дубы на полуострове делятся на две генетические группы: западную и восточную. При этом западная группа оказывается близка к группе дубов из Малой Азии, а восточная — к группе из закавказских гаплотипов [34]. Авторы делают предположения о разных путях колонизации дубов на полуострове.

Несмотря на то, что применение ITS и хлоропластных маркеров к многочисленным выборкам из восточной, западной и центральной частей Крыма не выявило дифференциации *J. deltooides* на полуострове [31], возможно это могли бы сделать микросателлитные маркеры.

Таким образом, данные, полученные в настоящей работе с использованием микросателлитных локусов, которые мы впервые применили к этому виду, подтверждают результаты других исследований, а также могут дать новую информацию, которая позволит сделать конкретные выводы о происхождении и расселении *J. deltooides* на северо-восточном краю ареала. Необходимы дальнейшие исследования с привлечением большего числа выборок из Крыма, Кавказа и Турции.

Работа выполнена в рамках государственного задания института экологии растений и животных УрО РАН № 122021000090-5.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farjon A., Filer D. An Atlas of the World's Conifers: an Analysis of Their Distribution, Biogeography, Diversity and Conservation Status. 2013. Brill, Leiden-Boston. 524 p.
2. Adams R.P. *Juniperus deltooides*, a new species, and nomenclatural notes on *Juniperus polycarpus* and *J. turcomanica* (Cupressaceae) // Phytologia. 2004. V. 86. P. 49–53.
3. Adams R.P., Morris J.A., Padney R.N., Schwarzbach A.E. Cryptic speciation between *Juniperus deltooides* and *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean // Biochem. System. and Ecology. 2005. V. 33. P. 771–787. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2005.01.001>
4. Adams R.P. Morphological comparison and key to *Juniperus deltooides* and *J. oxycedrus* // Phytologia. 2014. V. 96. P. 58–62.
5. Roma-Marzio F., Najar B., Alessandri et al. Taxonomy of prickly juniper (*Juniperus oxycedrus* group): A phytochemical-morphometric combined approach at the contact zone of two cryptospecies // Phytochemistry. 2017. V. 141. P. 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.05.008>
6. Bennet K.D., Tzedakis P.C., Willis K.J. Quaternary refugia of north European trees // J. Biogeogr. 1991. V. 18. P. 103–115. <https://doi.org/10.2307/2845248>
7. Willis K., Rudner E., Sümege P. The full-glacial forests of Central and Southeastern Europe // Quaternary Research. 2000. V. 53. I. 2. P. 203–213. <https://doi.org/10.1006/qres.1999>
8. Klimko M., Boratynska K., Montserrat J.M. et al. Morphological variation of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean region // Flora. 2007. V. 202. P. 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2006.03.006>
9. Boratynski A., Wachowiak W., Dering M. et al. The biogeography and genetic relationships of *Juniperus oxycedrus* L. and related taxa from the Mediterranean and Macaronesian regions // Bot. J. Linn. Soc. 2014. V. 174. P. 637–653. <https://doi.org/10.1111/boj.12147>
10. Красная книга Республики Крым. Растения, водоросли и грибы / Отв. ред. Ена А.В., Фатерыга А.В.. Симферополь: ООО “ИТ “АРИАЛ”, 2015. 480 с.
11. Красная книга Краснодарского края. Растения и грибы 3-е изд. Краснодар: 2017. 850 с.
12. Ена А.В. Природная флора Крымского полуострова. Симферополь: Н. Орианда, 2012. 232 с.
13. Devey M.E., Bell J.S., Smith D.N., Neale D.B. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. P. 673–679. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
14. Michalczyk I.M., Sebastiani I.F., Buonomici A. et al. Characterization of highly polymorphic nuclear microsatellite loci in *Juniperus communis* L. // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. P. 346–348. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01227.x>
15. Zhang Q., Yang Y.Z., Wu G.L. et al. Isolation and characterization of microsatellite DNA primers in *Juniperus przewalskii* Kom (Cupressaceae) // Conserv. 2008. V. 9. P. 767–769. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9387-y>
16. Rumeu B., Sosa P.A., Nogales M., Gonzalez-Perez M.A. Development and characterization of 13 SSR markers for an endangered insular juniper (*Juniperus cedrus* Webb & Berth.) // Conserv. Genet. Resources. 2013. V. 5. P. 457–459. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9827-y>
17. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
18. Excoffier L., Lischer H. Arlequin suite ver 3.5: A new series

- of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
19. Raymond M., Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism // *J Hered.* 1995. V. 86. P. 248–249.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
 20. Brookfield J. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency // *Mol. Ecol.* 1996. V. 5. P. 453–455.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00098.x>
 21. Oosterhout C.V., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // *Mol. Ecol. Notes.* 2004. V. 4. P. 535–538.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
 22. Nei M., Tajima F., Tatenio Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data // *J. Mol. Evol.* 1983. V. 19. P. 153–70.
<https://doi.org/10.1007/BF02300753>
 23. Rohlf F.J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis systems // Exeter Software, Applied Biostatistics. New York: 1992. 225 p.
 24. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 945–959.
<https://doi.org/doi:10.1093/genetics/155.2.945>
 25. Earl D.A., von Holdt B.M. Structure harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Conserv. Genet. Resour.* 2012. V. 4. P. 359–361.
<https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
 26. Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 2571–2581. doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x
 27. Mantel N.A. The detection of disease clustering and generalized regression approach // *Cancer. Res.* 1967. V.27. P. 209–220.
 28. Evren O., Kaya N. High genetic diversity within and low differentiation among *Juniperus excelsa* M. Bieb. populations: Molecular markers reveal their genetic structure patterns // *Turk. J. Bot.* 2021. V. 45. P. 192–202.
<https://doi.org/10.3906/bot-2006-22>
 29. Хантемирова Е.В., Бессонова В.А. Генетическое разнообразие можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) в Евразии и на Аляске по данным анализа ядерных микросателлитов // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 3. С. 316–326. EDN: INZGJC
<https://doi.org/10.31857/S0016675823030050>
 30. Ritland C., Pape T., Ritland K. Genetic structure of yellow cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*) // *Can. J. Bot.* 2001. V. 79. P. 822–828.
<https://doi.org/10.1139/b01-053>
 31. Lantushenko A.O., Korenkova O.O., Syrovets A.A. et al. Morphological and phylogenetic features of the Crimean population of *Juniperus deltoides* R.P. Adams // *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii.* 2023. V. 27(4). P. 306–315.
<https://doi.org/10.18699/VJGB-23-37>
 32. Тахтаджян А.Л. Флористические области Земли. Л.: Наука, 1978. 247 с.
 33. Gömöry D., Paule L., Mačejovský V. Phylogeny of beech in western Eurasia as inferred by approximate Bayesian computation // *Acta Soc. Bot. Pol.* 2018. V. 87. I. 2.
<https://doi.org/10.5586/asbp.3582>
 34. Semerikova S.A., Podergina S.M., Tashev A.N., Semerikov V.L. Phylogeography of Oaks in the Crimea Reveals Pleistocene Refugia and Migration Routes // *Russ. J. Ecology.* 2023. V. 54. № 3. P. 197–212.

Differentiation of *Juniperus deltoides* R.P. Adams in the Crimean-Caucasian Region According to the Variability of Microsatellite DNA Markers

E. V. Hantemirova¹*, Tz. Radoukova²

¹Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Division of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144, Russia

²Department of Botany and Biological Education, University of Plovdiv “Paisii Hilendarski”, Plovdiv, 4000 Bulgaria

*e-mail: hantemirova@ipae.uran.ru

The structure of genetic variability of the prickly juniper *Juniperus deltoides* R.P. Adams (family Cupressaceae), an important component of Mediterranean arid and semi-arid ecosystems was studied. We used for the first time 5 nuclear microsatellite loci developed for another juniper species *J. cedrus* Webb & Berthel. to genotype samples from 5 populations of *J. deltoides* located at the northeastern limit of the range in Eurasia (Western Crimea, Transcaucasia) and one Balkan population (Bulgaria). *J. deltoides* is characterized by an average level of genetic variability (*He* varies from 0.428 to 0.602) with the lowest values in the Crimean populations. Phylogenetic analyses revealed three genetic groups: Western Crimea, Transcaucasia (Krasnodar Territory) and Bulgarian population. Application of AMOVA to these groups showed statistically significant differentiation (9.9% of total variability, $P < 0.001$). The first two groups correspond to the previously identified Asian group of *J. deltoides*, and the third group corresponds to the Balkan group. The differentiation of the Crimean populations from geographically close Caucasian populations is shown by us for the first time.

Keywords: *Juniperus deltoides*, nuclear DNA, simple sequence repeat (SSR), genetic diversity.

УДК 639.311/575.113.2

ОБ ИСЧЕЗНОВЕНИИ ПЛЕЙОТРОПНОГО ЭФФЕКТА ГЕНА *N* ЧЕШУЙНОГО ПОКРОВА У КАРПА (*Cyprinus carpio* L.)

© 2024 г. Е. В. Виноградов¹, *, В. В. Караваев¹, Д. А. Балашов¹, В. Н. Дементьев¹,
В. М. Симонов¹, Л. А. Шарт¹, Е. Ю. Журенкова¹

¹Филиал по пресноводному рыбному хозяйству Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии, Московская область, пос. Рыбное, 141821 Россия

*e-mail: vinogradus11@gmail.com

Поступила в редакцию 10.07.2023 г.

После доработки 15.08.2023 г.

Принята к публикации 22.08.2023 г.

Ранее в многочисленных исследованиях показан широкий плеiotропный эффект доминантного аллеля гена *N* чешуйного покрова. Носители этого аллеля уступают рецессивным гомозиготам *nn* по скорости роста и жизнеспособности, а также различаются по целому ряду физиологических и меристических признаков. В настоящей работе обнаружен случай отсутствия плеiotропии: при скрещивании бесчешуйных самок (*ssNn*) и самцов с разбросанным чешуйным покровом (*ssnn*) голые и разбросанные потомки не различались по скорости роста, жизнеспособности, гематологическим показателям. Плеiotропный эффект гена *N* сохранился только по меристическим признакам. Отсутствие негативного действия гена *N* на признаки продуктивности открывает возможность использования голых карпов в аквакультуре.

Ключевые слова: карп бесчешуйный, разбросанный, плеiotропия, гены *S* и *N*.

DOI: 10.31857/S0016675824020043 **EDN:** DRLWTK

Чешуйный покров у карпа определяется действием двух несцепленных аутосомных генов *S* и *N*, сочетание доминантных и рецессивных аллелей которых дает четыре известных фенотипа: чешуйчатый (*Ssnn*; *SSnn*), разбросанный (*ssnn*), линейный (*SsNn*) и голый (бесчешуйный) (*ssNn*) [1–4]. Гомозиготы *NN* нежизнеспособны и погибают в позднем эмбриогенезе [5].

Сразу же после установления наследования чешуйного покрова было обнаружено плеiotропное действие генов *S* и *N*, особенно широко и сильно оно проявляется у гена *N* [6–8]. Плеiotропный эффект генов чешуйного покрова впоследствии был неоднократно подтвержден, в том числе в последние годы [9–11].

В своей монографии В.С. Кирпичников [4] дал обзор многочисленных исследований плеiotропного эффекта гена *N*. У голых карпов *ssNn* по сравнению с разбросанными *ssnn* отмечены пониженная жизнеспособность и скорость роста, уменьшенное число глоточных зубов, низкое содержание гемоглобина в крови, сниженное число эритроцитов, низкая устойчивость к дефициту кислорода и иммунологическая реактивность, уменьшены число лучей в спинном,

анальном и грудных плавниках, а также число жаберных тычинок. Голые карпы имеют более высокий индекс прогонистости, т.е. отношение длины к наибольшей высоте тела у них выше, чем у разбросанных. При ухудшении условий выращивания негативное влияние гена *N* проявляется особенно остро [12].

Низкие продуктивные показатели линейных и голых карпов привели к тому, что на территории России и Европы рыбы с таким фенотипом полностью исчезли в товарных хозяйствах и сейчас их можно встретить лишь в отдельных племенных хозяйствах. Тем не менее линейные и голые карпы по-прежнему вызывают повышенный интерес потребителей [13].

Настоящая работа предпринята в связи с тем, что при изучении рыбоводных свойств потомства от скрещивания голых самок с разбросанными самцами мы обнаружили, что голые сеголетки по выживаемости и скорости роста не уступили разбросанным. Это заставило нас провести сравнительное исследование голых и разбросанных карпов разного возраста по тем признакам, по которым ранее был описан плеiotропный эффект гена *N*.



Рис. 1. Двухлетки карпа из кросса $N \times MP$ с разбросанным чешуйным покровом (а) и бесчешуйные (голые) (б).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом служили карпы из кросса $N \times MP$, полученные в 2019 г. скрещиванием самок с голым фенотипом (N) и самцов породы московский разбросанный (MP). Такое скрещивание ($ssNn \times ssnn$) дает потомство, состоящее из голых и разбросанных карпов в соотношении 1 : 1 (рис. 1). Производители московского разбросанного и голого карпов взяты из племенного стада, содержащегося в Опытном селекционно-племенном хозяйстве ВНИИПРХ “Якоть”.

У голых и разбросанных карпов из кросса $N \times MP$ изучали рыбоводные, морфологические и физиологические признаки, на которые, по литературным данным, распространяется плеiotропное действие гена N [4].

Рыбоводные опыты

Половые продукты от производителей получали по стандартным методикам заводского воспроизводства карпа [14]. Икра была получена от 12 самок голого карпа. Равные порции икры каждой самки были смешаны, и из этой смеси было взято шесть равных частей по 800 г. Каждая часть была оплодотворена смесью спермы трех самцов московского разбросанного карпа и помещена на инкубацию в аппараты Вейса. После вылупления личинки из инкубационных аппаратов попали в один общий лоток.

Выращивание рыб проводили в прудах. Сеголеток выращивали в пруду площадью 2 га, плотность посадки составляла 60 тыс. шт./га. Двухлеток выращивали в пруду совместно с волжским сазаном того же возраста. Сазан был подсажен для достижения товарной плотности посадки, т.е. 3200 шт./га. Зимовали карпы также в прудах при совместной посадке голых и разбросанных рыб.

В конце каждого сезона выращивания у выловленных рыб с разным чешуйным покровом определяли среднюю массу и выживаемость. Среднюю массу сеголеток определяли путем взвешивания на электронных весах нескольких

проб по 500 рыб в каждой, таким образом были взвешены все выращенные рыбы. Так же определяли и среднюю массу двухлеток, но в каждой пробе было по 10 рыб. Выживаемость рассчитывали по соотношению числа выловленных рыб к числу посаженных на выращивание.

Гемоглобин и число эритроцитов в крови у годовиков

После вылова из зимовальных прудов часть годовиков поместили в аквариумы с проточной водой и адаптировали к аквариальным условиям в течение месяца [15]. Рыб с разным фенотипом содержали совместно.

После адаптации определяли концентрацию гемоглобина и число эритроцитов. Сбор образцов проводили по стандартным методикам [16]. Концентрацию гемоглобина в крови и подсчет эритроцитов проводили согласно методическим указаниям по проведению гематологического обследования рыб [17].

Морфометрическое описание двухлеток

Проводили измерения и определение индексов морфометрических показателей [18]. Измерение признаков морфотипа рыб проводили по цифровым фотографиям с использованием компьютерной графической программы Adobe Photoshop [19].

Меристические признаки

Определение числа ветвистых лучей в спинном и анальном плавниках, глоточных зубов и тычинок в первой жаберной дуге проводили по стандартным методикам [18].

Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 8.0. Вначале проводили проверку выборки на нормальность. Для анализа выборок с нормальным распределением использовали критерий Стьюдента, для выборок с ненормальным распределением использовали критерий Манна–Уитни [20–21].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рыбоводные опыты

Осенью, после каждого сезона выращивания, рыб разделяли по чешуйному покрову на голых и разбросанных и определяли рыбоводные показатели.

Результаты выращивания сеголеток представлены в табл. 1. Выживаемость голых и разбросанных сеголеток рассчитывали, исходя из предпо-

Таблица 1. Рыбоводные показатели сеголеток кросса N × МР с разным типом чешуйного покрова

Тип чешуйного покрова	Количество, шт.	Средняя масса, г $M \pm m$	Выживаемость, %	Соотношение рыб с разным чешуйным покровом, %
Голый	9606	13.28 ± 1.31	16.01	50.65
Разбросанный	9357	14.13 ± 1.45	15.59	49.35

Примечание. Для табл. 1, 2, 4–7: $M \pm m$ – среднее значение признака ± ошибка среднего значения.

Таблица 2. Рыбоводные показатели двухлеток кросса N × МР с разным типом чешуйного покрова

Тип покрова	Посажено весной		Выловлено осенью			<i>t; p</i>
	шт.	ср. масса, г $M \pm m$	шт.	ср. масса, г $M \pm m$	Выживаемость, %	
Голый	540	17.2 ± 0.97	173	554.2 ± 11.76	32.0	0.46; $p > 0.05$
Разбросанный	540	17.9 ± 0.97	179	561.2 ± 9.22	33.1	

Примечание. *t* – критерий Стьюдента по показателю средняя масса, *p* – уровень значимости.

Таблица 3. Зимовка голых и разбросанных карпов в прудах

Возраст при посадке	Группа	Посажено, шт.	Выловлено, шт.	Отношение выловленных к посаженным, %
Двухлетки	голые	77	52	67.5
	разбросанные	74	70	94.6
Двухлетки	голые	72	72	100.0
	разбросанные	55	46	83.6
Трехлетки	голые	60	57	95.0
	разбросанные	40	36	90.0
Среднее по трем повторностям	голые	69.6 ± 5.04	60.3 ± 6.01	875 ± 10.1
	разбросанные	56.3 ± 9.84	50.6 ± 10.1	89.4 ± 3.2

ложения, что соотношение особей с генотипами *Nnss* и *nnss* среди личинок равно 1 : 1. Как видно из табл. 1, это соотношение осталось таким же и у сеголеток. Различия в средней массе сеголеток статистически недостоверны.

Рыбоводные показатели двухлеток представлены в табл. 2. И на втором году жизни голые и разбросанные карпы проявили сходные показатели по средней массе роста и выживаемости.

Результаты зимовки двухлеток и трехлеток представлены в табл. 3. Двухлетки зимовали в двух прудах, трехлетки – в одном. Выживаемость колебалась в разных зимовальных прудах, но

в среднем она оказалась сходной между голыми и разбросанными карпами.

Гемоглобин и число эритроцитов в крови у годовиков

У годовиков были определены некоторые показатели красной крови. Результаты представлены в табл. 4. Достоверных различий между показателями не обнаружено.

Морфометрическое описание двухлеток

Результаты морфометрического анализа двухлеток представлены в табл. 5. Показаны достоверные различия индексов некоторых пластических признаков между голыми и разбросанными рыбами из кросса.

Таблица 4. Показатели красной крови у голых и разбросанных годовиков

Тип чешуйного покрова	Концентрация гемоглобина в крови, г/л $M \pm m$	Число эритроцитов в крови, млн/см ³ $M \pm m$	<i>U; p</i>
Голый (<i>N</i> = 26)	55.79 ± 3.32	0.92 ± 0.06	179; $p > 0.05$
Разбр. (<i>N</i> = 17)	57.81 ± 2.21	0.88 ± 0.04	220; $p > 0.05$

Примечание. *U* – критерий Манна–Уитни для выборок с ненормальным распределением; *p* – уровень значимости. *N* – число особей.

Таблица 5. Морфометрические индексы двухлеток кросса N × МР с разным типом чешуйного покрова

Признак	Голый (N = 54)	Разбросанный (N = 46)	t; p
	M ± m	M ± m	
Длина без хвостового плавника (AD), см	27.66 ± 0.22	27.76 ± 0.29	0.27; p > 0.05
Индексы пластических признаков, % от AD			
Длина туловища	73.97 ± 0.24	73.14 ± 0.07	1.54; p > 0.05
Длина рыла	7.39 ± 0.11	7.25 ± 0.11	0.85; p > 0.05
Диаметр глаза	3.86 ± 0.05	3.81 ± 0.05	0.65; p > 0.05
Заглазничный отдел головы	16.56 ± 0.12	16.75 ± 0.13	1.07; p > 0.05
Длина головы	26.30 ± 0.22	26.35 ± 0.21	0.15; p > 0.05
Высота головы	23.99 ± 0.16	24.06 ± 0.16	0.30; p > 0.05
Наибольшая высота тела	39.55 ± 0.23	40.14 ± 0.28	1.61; p > 0.05
Наименьшая высота тела	13.98 ± 0.07	14.29 ± 0.09	2.54; p < 0.05
Антедорсальное расстояние	54.35 ± 0.22	54.41 ± 0.49	0.11; p > 0.05
Постдорсальное расстояние	17.93 ± 0.10	17.62 ± 0.21	1.06; p > 0.05
Длина хвостового стебля	15.08 ± 0.10	14.38 ± 0.17	3.49; p < 0.05
Длина основания спинного плавника	37.64 ± 0.27	38.72 ± 0.26	2.87; p < 0.05
Высота спинного плавника	11.73 ± 0.28	12.41 ± 0.27	1.70; p > 0.05
Длина основания анального плавника	6.89 ± 0.09	8.27 ± 0.12	8.74; p < 0.05
Высота анального плавника	11.20 ± 0.21	12.38 ± 0.17	4.13; p < 0.05
Длина грудного плавника	19.86 ± 0.17	20.47 ± 0.17	2.49; p < 0.05
Длина брюшного плавника	14.68 ± 0.16	14.93 ± 0.19	0.99; p > 0.05
Пектоцентрально-анальное расстояние	26.13 ± 0.16	26.32 ± 0.19	0.77; p > 0.05
Вентроанальное расстояние	28.85 ± 0.17	27.67 ± 0.20	4.46; p < 0.05

Примечание. t – критерий Стьюдента; p – уровень значимости. Полужирным шрифтом отмечены значения критерия Стьюдента для признаков, имеющих достоверные различия. N – число особей.

Меристические признаки

Число глоточных зубов и число жаберных тычинок в первой жаберной дуге у двухлеток кросса N×МР с разным чешуйным покровом представлены в табл. 6, число лучей в спинном и анальном плавниках представлено в табл. 7.

Число жаберных тычинок оказалось одинаковым у голых и разбросанных карпов, значения остальных исследованных меристических признаков были достоверно выше у разбросанных карпов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В потомстве от скрещивания голых и разбросанных карпов (Nnss × nnss) изучены восемь признаков, по которым ранее был продемонстрирован плеiotропный эффект гена N [4]. В исследованном нами потомстве плеiotропный эффект нашел свое проявление только в меристических признаках (в трех из четырех изученных). По признакам, характеризующим физиологическую полноценность (скорость роста, жизнеспособность, число эритроцитов, кон-

центрация гемоглобина), плеiotропный эффект гена N не обнаружен (рис. 2). Плеiotропный эффект гена N также обнаружен при изучении 19 морфологических индексов (табл. 5) из которых семь достоверно различались у голых и разбросанных карпов.

В работе Л.И. Цветковой [12], которая была выполнена на материале этой же племенной группы карпов носителей гена N, содержащейся на селекционно-племенной базе ВНИИПРХ “Якоть”, плеiotропный эффект гена N по жизнеспособности и скорости роста был продемонстрирован, причем он усиливался при выращивании карпов в неблагоприятных условиях. Семь поколений спустя мы наблюдаем исчезновение плеiotропного эффекта. И его исчезновение не связано с улучшением условий выращивания, поскольку условия в наших опытах также были весьма неблагоприятными. На это указывают низкие рыболовные результаты: выживаемость сеголеток 16%, двухлеток – 30%, невысокая средняя масса (табл. 1 и 2).

Пока трудно судить, насколько стабильными распространенным окажется обнаруженное

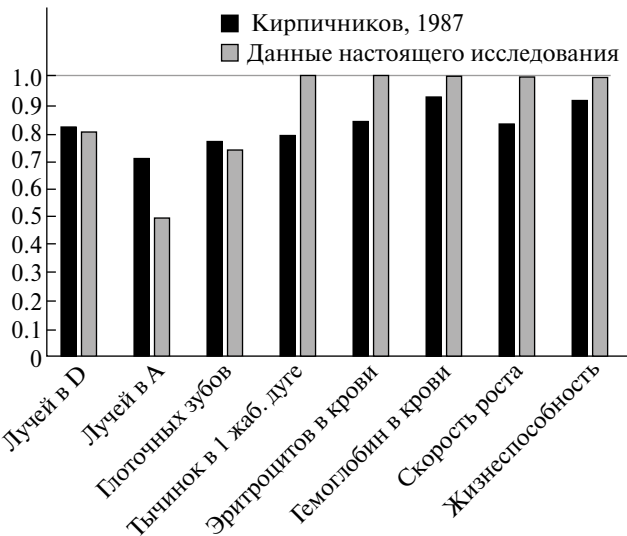


Рис. 2. Отношение величин различных признаков у голых карпов к соответствующим значениям у разбросанных карпов по литературным данным [4] и данным настоящей работы.

в настоящей работе исчезновение плейотропного эффекта гена *N*. Очевидно, что в ответ на действие вредных генов, которые по каким-либо причинам сохраняются в популяции, должны складываться аллельные комплексы, направленные на компенсацию негативного влияния. И если вредный ген обладает плейотропным эффектом, то его плейотропия должна также ослабляться или исчезать. Математическая модель эволюции плейотропии показала, что плейотропный эффект генов, влияющих на физиологическую полноценность организма, в ряду

поколений должен уменьшаться [22]. По данным М.А. Ахмедова [23], гибридная карликовость пшеницы обусловлена плейотропным влиянием двух генов. Многократный отбор в родительских линиях высокорослых растений привел к формированию константных линий без признаков гибридной карликовости и к исчезновению плейотропного эффекта.

В 2022 г. мы повторно получили и вырастили сеголеток карпа от скрещивания *Nnss* × *nnss*. И в этом случае скорость роста и выживаемость голых и разбросанных сеголеток оказались сходными.

Кросс *N* × *MP* обладает ценными свойствами для потребителей: 50 % особей не имеют чешуи, что удобно для кулинарии. Результаты выращивания рыб этого кросса показали, что основные рыбохозяйственные характеристики у рыб с разным чешуйным покровом практически одинаковы. Таким образом, в комбинации *Nnss* × *nnss* отсутствует негативное действие гена *N*, что открывает возможность использования голых карпов в аквакультуре.

Работа выполнена в рамках Государственного задания “Проведение прикладных научных исследований”. Исследования проводились при поддержке гранта № 075-15-2021-1084 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Авторы выражают благодарность А.В. Рекуратскому, сотрудникам лаборатории генетики

Таблица 6. Число глоточных зубов и тычинок в первой жаберной дуге у рыб из кросса *N* × *MP* с разным типом чешуйного покрова

Признак	Голый (<i>N</i> = 13) <i>M</i> ± <i>m</i>	Разбросанный (<i>N</i> = 14) <i>M</i> ± <i>m</i>	<i>U</i> ; <i>p</i>
Число глоточных зубов, шт.	6.84 ± 0.18	9.21 ± 0.18	2.0; <i>p</i> < 0.05
Число тычинок в первой жаберной дуге, шт.	20.69 ± 0.64	20.14 ± 0.49	70.5; <i>p</i> > 0.05

Примечание. *U* – критерий Манна–Уитни для выборок с ненормальным распределением; *p* – уровень значимости. Полужирным шрифтом отмечены значения *U*-критерия для признаков, имеющих достоверные различия. *N* – число особей.

Таблица 7. Количество ветвистых лучей в спинном и анальном плавниках у рыб из кросса *N* × *MP* с разным типом чешуйного покрова

Признак	Голый (<i>N</i> = 30) <i>M</i> ± <i>m</i>	Разбросанный (<i>N</i> = 30) <i>M</i> ± <i>m</i>	<i>t</i> ; <i>p</i>
Число лучей в спинном плавнике, шт.	14.36 ± 0.56	18.73 ± 0.3	6.83; <i>p</i> < 0.05
Число лучей в анальном плавнике, шт.	3.4 ± 0.18	5.7 ± 0.09	11.07; <i>p</i> < 0.05

Примечание. *t* – критерий Стьюдента; *p* – уровень значимости. Полужирным шрифтом отмечены значения *t*-критерия для признаков, имеющих достоверные различия. *N* – число особей.

и селекции рыб ВНИИПРХ за помощь в подготовке и проведении исследовательской работы, а также сотрудникам ОСПХ “Якот” за помощь в проведении рыбоводных работ.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кирпичников В.С. Балкашина Е.И. Материалы по генетике и селекции карпа. I сообщ. // Зоол. журн. 1935. № 1. С. 45–78.
2. Кирпичников В.С. Балкашина Е.И. Материалы по генетике и селекции карпа. II сообщ. // Биол. журн. 1936. № 2. С. 327–376.
3. Кирпичников В.С. Основные гены чешуи у карпа // Биол. журн. 1937. № 3. С. 601–632.
4. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987. 520 с.
5. Головинская К.А. Плейотропия генов чешуи карпа // ДАН СССР. 1940. № 6. С. 533–536.
6. Кирпичников В.С., Головинская К.А., Михайлов Ф.Н. Важнейшие типы чешуйчатого покрова у карпа и их связь с хозяйственно-ценными признаками // Рыбное хоз-во. 1937. С. 51–59.
7. Головинская К.А. О линейной форме культурного карпа // ДАН СССР. 1946. № 7. С. 637–640.
8. Кирпичников В.С. Влияние условий выращивания на жизнеспособность, скорость роста и морфологию карпов различного генотипа // ДАН СССР. 1945. № 7. С. 521–525.
9. Casas L., Szüch R., Vij S. et al. Disappearing scales in carps: Revisiting Kirpichnikovs model on the genetics of scale pattern formation // PLoS One. 2013. V. 8. Is. 12. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083327>
10. Cserveni-Szüch R. Re-visiting the inheritance of scale pattern of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Doc. of philosophy (PHD) thesis points. Univ. of Pannonia. Keszthely, Hungary, 2013. 21 p.
11. Andria-Mananjara D.E., Rasamoelina H., Vandeputte M. Comparison of rearing performances and intermuscular bone number in the mirror and nude genotypes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in controlled field test in Madagascar // Aquaculture Rep. 2016. № 3. P. 77–81.
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.12.005>
12. Цветкова Л. И. Биологические особенности четырех основных форм карпа (чешуйчатых, разбросанных, линейных и голых), различающихся по генам чешуйного покрова: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. М., 1979. 42 с.
13. Законнова Л.И., Никишкин И.В. К вопросу об исследовании механизмов снижения негативного плейотропного действия гена N при линейной селекции карпа *Cyprinus carpio* (L.). Постановка проблемы // Матер. Первой междунар. научно-практ. конф. “Рекультивация выработанного пространства: проблемы и перспективы”. Новосибирск: Изд-во Новосиб. филиала Западно-Сибирского НИИ вод. биорес. и аквакультуры, 2015. С. 39–44.
14. Инструкция по племенной работе с карпом в репродукторах и промышленных хозяйствах. М.: ВНИИПРХ, 1982. 39 с.
15. Лав Р.М. Химическая биология рыб. М.: Пищевая пром., 1976. С. 44–46.
16. Мусселиус В.А., Ванятинский В.Ф., Вихман А.А. Лабораторный практикум по болезням рыб. М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1983. 296 с.
17. Методические указания по проведению гематологического обследования рыб. Министерство сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации. Департамент ветеринарии. № 13-4-2/1487 от 02 февраля 1999.
18. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая пром-ть, 1966. 380 с.
19. Симонов В.М., Поддубная А.В. Способ оценки и сохранения морфометрических характеристик биологических объектов аквакультуры: Патент Российской Федерации. № 2437282 С2 МПК А 01К 61/00. (2006. 01). 2011.
20. Халафян А.А. Статистический анализ данных. М.: ООО “Бином-Пресс”, 2010. 528 с.
21. Халафян А.А. Statistica 6. Математическая статистика с элементами теории вероятностей. М.: ООО “Бином-Пресс”, 2011. 482 с.
22. Guillaume F., Otto S.P. Gene functional trade-offs and the evolution of pleiotropy // Genetics. 2012. V. 192. P. 1389–1409.
<https://doi.org/10.1534/genetics.112.143214>
23. Ахмедов М.А. К вопросу о природе гибридной карпиковости // Генетика. 2010. Т. 46. № 8. С. 1139–1142.
<https://doi.org/10.1134/S1022795410080156>

On the Disappearance of the Pleiotropic Effect of the *N* Gene of the Scale Cover in Carp (*Cyprinus carpio* L.)

E.V. Vinogradov¹, *, V.V. Karavaev¹, D.A. Balashov¹, V.N. Dement'ev¹,
V.M. Simonov¹, L.A. Shart¹, E.Yu. Zhurenkova¹

¹Branch for freshwater fisheries of the All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow oblast, Rybnoe, 141821 Russia

*e-mail: vinogradus11@gmail.com

Previously, numerous studies have shown a broad pleiotropic effect of the dominant allele of the scaly cover gene *N*. Carriers of this allele are inferior to recessive *nn* homozygotes in terms of growth rate and viability, and also differ in a number of physiological and meristic traits. In the present work, a case of the absence of pleiotropy was found: when scaleless females (*ssNn*) and males with scattered scale cover (*ssnn*) were crossed, naked and scattered offspring did not differ in growth rate, viability, and hematological parameters. The pleiotropic effect of the *N* gene was preserved only in terms of meristic characters. The absence of a negative effect of the *N* gene on productivity traits opens up the possibility of using naked carps in aquaculture.

Keywords: common carp, scaleless, scattered, pleiotropy, *S* and *N* genes.

УДК 575.17

ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ КАРАЧАЕВЦЕВ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ДЕСЯТИ ДНК-МАРКЕРОВ

Н. В. Петрова¹, А. В. Марахонов¹, Н. В. Балинова¹, Т. А. Васильева¹,
Г. И. Ельчинова¹*, Е. К. Гинтер¹, Р. А. Зинченко¹

¹Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

*e-mail: elchinova@med-gen.ru

Поступила в редакцию 11.04.2023 г.

После доработки 08.09.2023 г.

Принята к публикации 12.09.2023 г.

Проведено изучение популяции карачаевцев ($N = 485$) из Республики Карачаево-Черкесия на основе анализа десяти полиморфных ДНК-локусов ($CCR5\Delta32$, ID/ACE , $D7S23(KM19)$, $STR/THOI$, $STR/FABP2$, $STR/IVS6aGATT(CFTR)$, $VNTR/PAH$, $VNTR/DAT1$, $VNTR/NOS3$, $VNTR/APOB$) ядерного генома. В работу включены выборки из четырех районов (Карачаевского, Прикубанского, Малокарачаевского, Усть-Джегутинского) и г. Черкесска. Полученные результаты свидетельствуют о значительной генетической гетерогенности популяции карачаевцев. Наибольший уровень разнообразия для карачаевцев по диаллельной системе установлен по локусу ID/ACE , $H_{obs} = 0.513$, по мультиаллельной – по локусу $STR/THOI$, $H_{obs} = 0.792$. Среднее значение наблюдаемой гетерозиготности на локус составляет 0.466, варьируя от 0.441 в Усть-Джегутинском р-не до 0.503 в г. Черкесске. Уровень генетических различий между географическими подгруппами карачаевцев из разных районов находится в пределах вариации ($F_{ST} = 0.007$), установленной для ранее изученных по данным генным локусам народов: марийцев ($F_{ST} = 0.0024$), удмуртов ($F_{ST} = 0.0048$), чувашей ($F_{ST} = 0.006$), татар ($F_{ST} = 0.0075$) и башкир ($F_{ST} = 0.008$).

Ключевые слова: карачаевцы, генетическая структура популяций, ДНК-маркеры.

DOI: 10.31857/S0016675824020052 **EDN:** DQUUYG

Карачаевцы – тюрко-язычный народ Северного Кавказа, коренной этнос Карачаево-Черкесии, составляющий более 40% населения республики (194 тыс. человек) [1], компактно проживают в четырех районах (Карачаевском, Малокарачаевском, Прикубанском, Усть-Джегутинском), в которых сотрудниками лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ “МГНЦ” проведено комплексное генетико-эпидемиологическое исследование. Карачаевцы принадлежат к кавкасионскому антропологическому типу, говорят на карачаево-балкарском языке кыпчакской группы тюркской языковой семьи [2].

По мнению Е.П. Алексеевой, можно определить четыре основных элемента, из которых сформировалась карачаево-балкарская народность: 1) местные племена, носители кобанской культуры; 2) аланы и другие племена, носители аланской культуры, жившие в Алании в эпоху раннего средневековья; 3) болгары – так называемые “черные”, или “внутренние”; 4) кипчаки (половцы, куманы). Кроме болгар и кипчаков в

образовании карачаево-балкарской народности могли принять участие и другие тюркские племена, например печенег. Впоследствии карачаевцы и балкарцы, уже сформировавшиеся в народность, принимали представителей других народов. Однако роль их не была столь велика, как роль четырех основных этнических единиц, из которых образовалась карачаево-балкарская народность [1].

Настоящая работа является продолжением серии публикаций, посвященных популяционно-генетическим исследованиям населения европейской части России, проводимым лабораторией генетической эпидемиологии ФГБНУ МГНЦ [3–7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из крови 485 неродственных карачаевцев, проживающих в районах Республики Карачаево-Черкесия и г. Черкесск с максимальной компактной плотностью

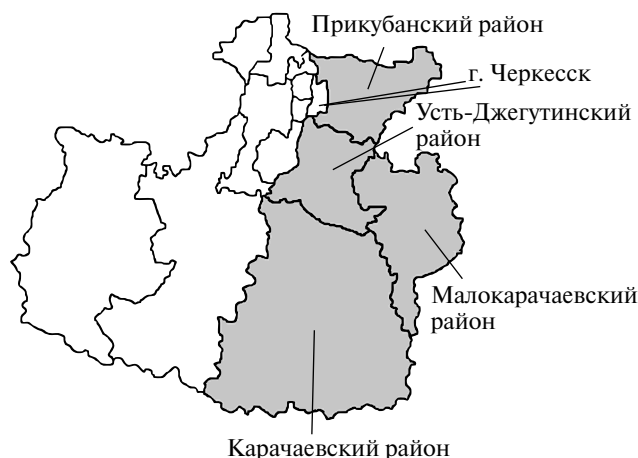


Рис. 1. Расположение изученных районов Республики Карачаево-Черкесия.

населения (не менее 70%) (рис. 1). При выборе рассматриваемых популяций учитывалась не только гомогенность этнографических групп на территории района, но и численность изучаемой этнической группы: в Карацаевском р-не карачаевцы составляют 85.7% населения, в Малокарачаевском – 87.5%, в Прикубанском – 75.7% и Усть-Джегутинском – 69.3%. В Черкесске карачаевцы являются второй по численности (16.4%), после русских (54.7%), этнической группой (рис.1).

Образцы ДНК собраны сотрудниками лаборатории генетической эпидемиологии Федерального Государственного бюджетного учреждения “Медико-генетический научный центр” им. академика Н.П. Бочкова в 2013–2016 гг. При формировании выборки учитывались следующие параметры: выбирались районы максимального компактного проживания карачаевцев на территории КЧР; все включенные индивиды были неродственными до третьего поколения и имели в родословной только карачаевцев. Этническая принадлежность (до третьего поколения) устанавливалась при опросе обследуемых индивидов. Во всех случаях составлены анкеты и получено письменное информированное согласие о проведении медико-генетических исследований. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ МГНЦ (протокол № 5 от 20.12.2010 г.).

Выделение ДНК проводили из лейкоцитов венозной крови (4–8 мл) с использованием набора реактивов WizardGenomicDNA Purification Kit фирмы Promega (USA) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полиморфные маркеры были отобраны по высокой гетерозиготности во многих исследованных популяциях мира. Анализ полиморфных маркеров проводили методами полимеразной цепной реакции синтеза ДНК и анализа ПДРФ с использованием праймеров и условий, описанных ранее [3–7]. Результаты оценивали путем проведения вертикального электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле для локусов *VNTR/PAH*, *VNTR/DAT1*, *VNTR/NOS3*, *CCR5Δ32*, *VNTR/APOB*, в 12%-ном полиакриламидном геле для локусов *STR/THOI*, *STR/FABP2*, *STR/IVS6aGATT(CFTR)* и в 2%-ном агарозном геле для локусов *ID/ACE*, *D7S23(KM19)*. В табл. 1 представлена характеристика десяти изученных маркеров, праймеры и использованная рестриктаза.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью надстройки GeneAlex v 6.5 [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ полиморфизма трех диаллельных (*CCR5Δ32*, *ID/ACE*, *D7S23(KM19)*) и семи мультиаллельных (*STR/THOI*, *STR/FABP2*, *STR/IVS6aGATT(CFTR)*, *VNTR/PAH*, *VNTR/DAT1*, *VNTR/NOS3*, *VNTR/APOB*) маркеров ядерного генома у карачаевцев. Диаллельные маркеры представлены инсерционно-делеционными полиморфизмами (*CCR5Δ32*, *ID/ACE*) и однонуклеотидной заменой (*D7S23(KM19)*). Мультиаллельные маркеры включают в себя тандемные повторяющиеся последовательности микро- (*STR/IVS6a*, *STR/THOI*, *STR/FABP2*) и минисателлитов (*VNTR/PAH*, *VNTR/DAT1*, *VNTR/NOS3*, *VNTR/APOB*).

Локус *CCR5Δ32*

Изучен инсерционно-делеционный полиморфизм диаллельного маркера *CCR5Δ32* гена рецептора хемокинов *CCR5*. Ген локализуется на коротком плече (p21.3) хромосомы 3 внутри кластера генов рецепторов CC-хемокинов [9].

Генетический вариант *CCR5*, делеция 32 пар оснований, приводит к нарушению адгезивных свойств кодируемого белка *CCR5* Т-клеток, который является основным корецептором для М-тропных цепей вируса ВИЧ-1 и вероятно препятствует взаимодействию рецептора с вирусом ВИЧ-1, тем самым определяя устойчивость к инфекции [10]. Частота варианта *CCR5Δ32* в европейских популяциях составляет в среднем 10%, варьируя от 16% в финской и мордовской популяциях до 4% на Сарди-

Таблица 1. Характеристика маркеров, использованных для генетического изучения популяции карачаевцев

№	Локус	Район хромосомы	Тип полиморфизма	Размер амплифицируемого фрагмента, п. н.	Последовательности праймеров и эндонуклеаза рестрикции
1	CCR5Δ32	3p.21.3	Инсерционно-делеционный полиморфизм гена рецептора хемокинов CCR5 (диаллельный)	368–400	F: 5'-CTTCATCATCATCCTCCTGAC R: 5'-TGTAGGGAGCCCAGAAGAGA
2	ID/ACE	17q23.	Инсерционно-делеционный полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента ACE (диаллельный)	110–400	F: 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT R: 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT
3	D7S23 (KM19)	7q31-32	Однонуклеотидный полиморфизм в локусе D7S23, сцепленный с геном муковисцидоза (диаллельный)	956	F: 5'-GCTGCATCATATAAGTTGCC R: 5'-AACGCTACACTGTTAATTTT PstI
4	IVS6aGATT (CFTR)	7q31.2	Варибельные tandemные повторы (микросателлиты) гена трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза CFTR	106–114	F: 5'-CAAGTCTTTTCAGTGATCTTC R: 5'-TGAGCAGTTCTTAATAGATAA
5	STR/FABP2	4q28-31	Полиморфизм переменного числа повторов (микросателлиты) гена белка, связывающего жирные кислоты в слизистой кишечника	200–220	F: 5'-GTAGTATCAGTTTCATAGGGTCACC R: 5'-CAGTTCGTTTCCATTGTCTGTCCG
6	STR/THOI	11p15.5	Полиморфизм переменного числа повторов (микросателлиты) гена тирозингидроксилазы	183–207	F: 5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATAT R: 5'-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG
7	VNTR/PAH	12q22-24.1	Варибельные tandemные повторы (минисателлиты) гена фенилаланингидроксилазы	380–650	F: 5'-AGATTTTAATGTTCTCACCCGCC R: 5'-CTTGGAACTTAAGAATCCCATC
8	VNTR/DAT1	5p15.3	Варибельные tandemные повторы (минисателлиты) гена переносчика дофамина	320–520	F: 5'-TGTGGTGTAGGGAACGGCCTGAG R: 5'-CTTCCTGGAGGTCACGGCTCAAGG
9	VNTR/NOS3	7q35-36	Варибельные tandemные повторы (минисателлиты) гена эндотелиальной синтазы окиси азота	393–420	F: 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT R: 5'-TCTCTAGTGCTGTGGTCAAC
10	VNTR/APOB	2p24.1	Варибельные tandemные повторы (минисателлиты) гена аполипопротеина В	525–950	F: 5'-TGTTCTGGCACAGCAAAACCT R: 5'-TCACTTGGCAAATACAATTCCTGA

нии. Исследование ВИЧ-протективных генов показало повышенную частоту встречаемости *CCR5-Δ32* у русских и украинцев (10–15 % гетерозиготны по данному варианту). Распространение варианта в Европе, особенно в Северной, может быть связано со средневековыми пандемиями “Черной смерти”, так как этот вариант повышает сопротивляемость организма чумной палочке, что теоретически объясняет высокую частоту аллеля *D (*CCR5Δ32*) среди европейцев, трудно объяснимую лишь случайным генетическим дрейфом, и указывает на действие отбора в пользу гомо- или гетерозиготных носителей в

прошлом или настоящем. Выявлена необычайно высокая частота аллеля с делецией *CCR5-Δ32* (11.1%) среди финно-угорского коренного населения Западной Сибири и очень низкая частота того же аллеля среди коренного населения Центральной Азии, Восточной Сибири, Дальнего Востока и Канады, установлен градиент в распространении аллеля с делецией с уменьшением с Запада на Восток [11]. Обнаружение аллеля с делецией *D (*CCR5Δ32*) в неевропейских популяциях, вероятно, является следствием относительно недавнего потока “европейских” генов [9–10].

Во всех подгруппах карачаевцев преобладающим оказался генотип $*I/*I$, гомозиготный по отсутствию делеции. Наблюдаемые частоты генотипов локуса *CCR5* проверяли на соответствие равновесному распределению Харди–Вайнберга по критерию χ^2 и соотношению вероятностей (G^2). Во всех субпопуляциях карачаевцев наблюдается соответствие распределения наблюдаемых частот встречаемости генотипов локуса *CCR5* равновесному распределению Харди–Вайнберга (табл. 2).

Распределение частот аллелей $*I$ и $*D$ во всех изученных географических подгруппах карачаевцев является сходным. Аллель $*D$, несущий делецию 32 пн, встречается с частотой от 0.025 до 0.074 (в среднем – 0.058), что ниже, чем в ряде других европейских популяций [11–13]. Среди ранее проведенных аналогичных исследований популяций Волго-Уральского региона максимальная частота аллеля $*D$ отмечена в популяции удмуртов и русских Кировской обл. (0.126 и 0.138), минимальная – у башкир и чувашей (0.034) [3–7].

Значения показателя фактической гетерозиготности по локусу *CCR5* невысокие: в пределах от 0.050 в г. Черкесске до 0.149 в Карачаевском р-не.

Локус *ID/ACE*

Ген *ACE* кодирует ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) – циркулирующий во внеклеточном пространстве белок (карбоксипептидаза), который играет важную роль в регуляции кровяного давления и баланса электролитов, катализируя расщепление неактивного ангиотензина I до активного ангиотензина II [14].

Изученный в настоящей работе инсерционно-делеционный (I/D) полиморфизм обусловлен наличием или отсутствием вставки размером 287 пн в интроне 16 гена *ACE*, расположенного на 17-й хромосоме в районе q23, состоящей из Alu-повтора. Делеция Alu-повтора приводит к повышению экспрессии гена *ACE* и увеличению концентрации АПФ в крови, лимфе и тканях, что является фактором, повышающим риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркта миокарда, гипертрофии левого желудочка, ишемической болезни сердца), болезни почек, атеросклероза, болезни Альцгеймера [15–17]. Делеционный аллель $*D$ встречается у западно-евразийских народов чаще, чем у восточно-азиатских. У коренного

населения Африки частота делеции сравнима с частотой в европейских популяциях. Частота инсерционного аллеля низка среди русских (0.46) и особенно высока в некоторых популяциях Якутии (0.77) и Японии (0.73) [18, 19]. Популяции Волго-Уральского региона по частотам аллеля $*D$ занимают в определенной степени промежуточное положение между популяциями русских и китайцев [18]. Исследование инсерционно-делеционного полиморфизма гена *ACE* может быть весьма информативным и может вносить существенный вклад в генетическую характеристику популяций.

Аллель $*D$ является преобладающим в одной из географических подгрупп, у карачаевцев Усть-Джегутинского р-на его частота составляет 0.534. В четырех остальных подгруппах более частым является аллель $*I$ (от 0.510 в Карачаевском р-не до 0.590 в Черкесске). Для всей выборки карачаевцев частота аллеля $*D$ составляет 0.476, что является промежуточным значением для ранее изученных популяций: для русских Кировской обл. эта частота – 0.538, чувашей – 0.525, татар – 0.513, удмуртов – 0.505, марийцев – 0.452 и башкир – 0.423 [3–7].

В трех подгруппах карачаевцев (Карачаевского, Прикубанского, Малокарачаевского р-нов) показатели фактической гетерозиготности ниже теоретической. В подгруппах Усть-Джегутинского р-на и Черкесска показатели фактической гетерозиготности превышают показатели теоретической гетерозиготности. Дефицит гетерозигот может свидетельствовать об инбридинге в трех популяциях и их изолированности, в отличие от популяций Черкесска и Усть-Джегутинского р-на.

Локус *D7S23 (KM19)*

Одним из маркеров, представляющих из себя однонуклеотидную замену, которую можно детектировать по появлению или потере сайта узнавания определенных эндонуклеаз рестрикции является полиморфизм KM19 в локусе *D7S23*(7q31-q32), сцепленный с геном, кодирующим трансмембранный регулятор муковисцидоза (*CFTR*). Полиморфизм KM19 характеризуется наличием двух аллелей: аллель $*A$ – отсутствие сайта рестрикции для эндонуклеазы PstI, аллель $*B$ – наличие сайта рестрикции [3].

Наиболее частым во всех выборках карачаевцев является аллель $*A$, частота которого варьирует от 0.746 в выборке Усть-Джегутинского

Таблица 2. Частоты аллелей исследуемых маркеров в изученных популяциях, а также их основные популяционные характеристики

Локус	Аллель/ Гетерозиготность/ Индекс фиксации	Малокара-чаевский р-н	Прикубан-ский р-н	Усть-Дже-гутинский р-н	Карачаев-ский р-н	г. Черкесск	FIS	FST
<i>CCR5Δ32</i>	*D	0.068	0.059	0 063	0.074	0.025	-0.036	0.005
	*I	0.932	0.941	0 938	0.926	0.975		
	HWE $p(\chi^2)$	0.432	0.403	0 284	0.304	0.039		
	H_{obs}	0.120	0.119	0 125	0.149	0.050		
	H_{exp}	0.127	0.112	0 117	0.138	0.049		
	F	0.061	-0.063	-0 067	-0.080	-0.026		
<i>ID/ACE</i>	*D	0.475	0.473	0 534	0.490	0.410	-0.034	0.006
	*I	0.525	0.527	0 466	0.510	0.590		
	HWE $p(\chi^2)$	1.146	0.006	0 904	0.082	1.977		
	H_{obs}	0.450	0.495	0 559	0.479	0.580		
	H_{exp}	0.499	0.499	0 498	0.500	0.484		
	F	0.098	0.008	-0 124	0.041	-0.199		
<i>D7S23(KM19)</i>	*A	0.780	0.815	0 746	0.796	0.779	-0.127	0.003
	*B	0.220	0.185	0 254	0.204	0.221		
	HWE $p(\chi^2)$	1.142	0.436	1 551	3.222	1.544		
	H_{obs}	0.376	0.281	0 441	0.428	0.404		
	H_{exp}	0.343	0.302	0 379	0.325	0.344		
	F	-0.096	0.070	-0 162	-0.256	-0.172		
<i>IVS6aGATT(CFTR)</i>	*6	0.295	0.135	0 158	0.220	0.196	0.007	0.019
	*7	0.705	0.865	0 842	0.780	0.804		
	HWE $p(\chi^2)$	0.675	0.315	2 100	1.370	0.001		
	H_{obs}	0.386	0.247	0 217	0.400	0.314		
	H_{exp}	0.416	0.243	0 267	0.343	0.315		
	F	0.005	-0.166	-0.060	0.073	0.187		
<i>STR/FABP2</i>	*8	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.011	0.003
	*9	0.005	0.011	0.008	0.009	0.012		
	*10	0.528	0.517	0.516	0.583	0.537		
	*11	0.179	0.125	0.189	0.130	0.167		
	*12	0.032	0.028	0.057	0.046	0.062		
	*13	0.202	0.227	0.205	0.194	0.173		
	*14	0.041	0.045	0.025	0.037	0.043		
	*15	0.014	0.034	0.000	0.000	0.006		
	HWE $p(\chi^2)$	18.113	97.129	49.027	15.187	13.152		
	H_{obs}	0.661	0.693	0.541	0.574	0.704		
	H_{exp}	0.646	0.661	0.652	0.602	0.648		
	F	-0.022	-0.049	0.170	0.046	-0.086		
<i>STR/THO1</i>	*6	0.255	0.301	0.254	0.292	0.191	-0.007	0.007
	*7	0.255	0.199	0.254	0.170	0.185		
	*8	0.095	0.097	0.066	0.104	0.111		
	*9	0.205	0.165	0.221	0.198	0.216		
	*10	0.182	0.227	0.172	0.198	0.290		
	*11	0.009	0.011	0.033	0.038	0.006		
	HWE $p(\chi^2)$	117.879	15.163	29.811	13.783	9.071		
	H_{obs}	0.809	0.830	0.672	0.811	0.840		
	H_{exp}	0.786	0.762	0.787	0.795	0.786		
	F	-0.029	-0.061	0.146	-0.021	-0.068		

Таблица 2. Продолжение

Локус	Аллель/ Гетерозиготность/ Индекс фиксации	Малокара-чаевский р-н	Прикубан-ский р-н	Усть-Дже-гутинский р-н	Карачаев-ский р-н	г. Черкесск	FIS	FST
VNTR/PAH	*3	0.320	0.366	0.278	0.358	0.354	0.109	0.009
	*5	0.018	0.006	0.000	0.000	0.000		
	*7	0.086	0.105	0.071	0.104	0.201		
	*8	0.414	0.326	0.413	0.340	0.317		
	*9	0.095	0.169	0.135	0.132	0.061		
	*11	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000		
	*12	0.054	0.029	0.087	0.066	0.067		
	*13	0.009	0.000	0.016	0.000	0.000		
	*14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
	HWE $p(\chi^2)$	20.715	28.904	21.688	10.343	10.820		
	H_{obs}	0.631	0.570	0.603	0.717	0.683		
	H_{exp}	0.706	0.720	0.731	0.724	0.726		
	F	0.107	0.208	0.164	0.009	0.059		
VNTR/DATI	*9	0.280	0.214	0.253	0.208	0.294		
	*10	0.717	0.786	0.747	0.781	0.700		
	*11	0.004	0.000	0.000	0.010	0.006		
	HWE $p(\chi^2)$	2.904	0.538	0.037	3.840	2.498		
	H_{obs}	0.386	0.363	0.370	0.333	0.433		
	H_{exp}	0.408	0.337	0.378	0.346	0.423		
	F	0,055	−0.077	0.023	0.037	−0.024		
VNTR/NOS3	*4	0.202	0.157	0.182	0.135	0.218	−0.081	0.006
	*5	0.798	0.843	0.818	0.865	0.782		
	HWE $p(\chi^2)$	0.543	3.101	0.175	1.178	0.521		
	H_{obs}	0.344	0.315	0.284	0.271	0.368		
	H_{exp}	0.323	0.265	0.298	0.234	0.341		
	F	−0.064	−0.187	0.049	−0.157	−0.077		

до 0.815 в выборке Прикубанского р-на. Во всех географических подгруппах карачаевцев наблюдается соответствие распределения наблюдаемых частот генотипов локуса *D7S23 (KM19)* равновесному распределению Харди–Вайнберга (табл. 2). В четырех из пяти подгрупп, исключая только выборку Прикубанского р-на, так же, как и в общей выборке карачаевцев ($H_{obs} = 0.382$; $H_{exp} = 0.329$), индекс наблюдаемой гетерозиготности превышает теоретически ожидаемое значение, что косвенно указывает на наличие миграционной активности карачаевцев.

Распределение частот аллелей во всех изученных географических подгруппах карачаевцев является сходным: аллель *A является преобладающим. Аналогичное распределение частот ал-

лелей и генотипов локуса *D7S23 (KM19)* характерно для других популяций [3–7].

Локус *IVS6aGATT(CFTR)*

Микросателлитный локус *IVS6aGATT(CFTR)* tandemно повторяющихся тетра nukлеотидных *GATT* последовательностей в интроне ба гена муковисцидозного трансмембранного регуляторного белка CFTR представляет внутригенный STR-маркер [20]. Выявлено пять аллелей, имеющих от четырех до восьми повторов *GATT*. В различных популяциях мира встречаются в основном два аллеля с шестью или семью повторами. Их частота в европейских популяциях в среднем составляет 0.25 и 0.75 соответственно. Аллели с четырьмя, пятью и восемью повторами считаются редкими.

Таблица 2. Окончание

Локус	Аллель/ Гетерозиготность/ Индекс фиксации	Малокарачаевский р-н	Прикубанский р-н	Усть-Джегутинский р-н	Карачаевский р-н	г. Черкесск	FIS	FST
<i>VNTR/APOB</i>	*28	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.188	0.007
	*30	0.064	0.080	0.057	0.020	0.071		
	*32	0.008	0.021	0.021	0.029	0.022		
	*34	0.264	0.293	0.229	0.343	0.302		
	*36	0.432	0.367	0.514	0.461	0.401		
	*38	0.108	0.112	0.093	0.078	0.099		
	*40	0.004	0.005	0.021	0.000	0.022		
	*44	0.028	0.021	0.000	0.000	0.011		
	*46	0.044	0.048	0.029	0.010	0.033		
	*48	0.020	0.037	0.029	0.010	0.033		
	*50	0.024	0.016	0.000	0.029	0.005		
	*52	0.004	0.000	0.007	0.000	0.000		
	HWE $p(\chi^2)$	329.752	93.440	31.043	178.442	79.077		
	H_{obs}	0.592	0.670	0.600	0.353	0.659		
	H_{exp}	0.724	0.756	0.669	0.661	0.730		
	F	0.182	0.113	0.103	0.466	0.096		
Общее							0.003	0.007
SE							0.028	

Примечание. HWE $p(\chi^2)$ – вероятность в тесте на равновесие по Харди–Вайнбергу, F – индекс фиксации $[(H_e - H_o)/H_e]$, F_{IS} – коэффициент инбридинга между индивидами $[(H_s - H_o)/H_s]$, F_{ST} – коэффициент инбридинга между популяциями $[(H_t - H_s)/H_t]$.

Среди карачаевцев преобладают два аллеля, включающих шесть или семь единиц повтора. Установлено, что наиболее частым является аллель с семью повторами *7 (от 0.705 в Малокарачаевском до 0.865 в Прикубанском р-не). В целом по распределению частот аллелей локуса *IVS6aGATT* популяция карачаевцев отличается от популяции Волго-Уральского региона, для которых характерны более высокие частоты аллеля *6 (0.270–0.355) и более низкие частоты аллеля *7 (0.590–0.707) [3–7].

У карачаевцев Карачаевского района уровень фактической гетерозиготности по локусу *IVS6aGATT(CFTR)* незначительно превышает уровень теоретической; в двух районах, Малокарачаевском и Усть-Джегутинском, наблюдается снижение показателя фактической гетерозиготности. В Черкесске и Прикубанском р-не уровни фактической и теоретической гетерозиготности равны.

Во всех подгруппах карачаевцев наблюдается соответствие наблюдаемых частот встречаемости

генотипов локуса *IVS6aGATT(CFTR)* равновесному распределению Харди–Вайнберга (табл. 2).

Локус *STR/FABP2*

Ген *FABP2*, локализованный на коротком плече хромосомы 4, кодирует белок, который связывает жирные кислоты [10]. Белок FABP2 содержится в эпителии тонкого кишечника, где с его помощью осуществляется связывание жиров для формирования хиломикрон. Микросателлитный локус *STR/FABP2* локализован во втором интроне гена, этот тринуклеотидный повтор АТТ, обозначается как *HUMFABP2* или *STR/FABP2* и относится к группе *STR*-маркеров. Название аллелей соответствует числу повторов коровой тринуклеотидной последовательности. Описано восемь аллелей этого локуса с числом повторов от 8 до 16. Не выявлено никаких ассоциаций полиморфизма в данном локусе с какими-либо заболеваниями [10]. Высокое значение гетерозиготности локуса *HUMFABP2* в популяциях Европы ($H > 0.5$) делает целесообразным использование этого маркера в популяционно-генетических исследованиях [10].

В пяти изученных географических подгруппах карачаевцев выявлено восемь аллелей локуса *STR/FABP2*. Во всех изученных районах наиболее частыми оказались аллели **10* (частота от 0.516 до 0.583), **11* (частота от 0.125 до 0.189) и **13* (частота от 0.173 до 0.227).

Аллели **12*, **9*, **14* и **15* встречаются во всех районах с частотой менее 0.057. Аллель **8* является редким в изученных выборках и выявлен только в Малокарачаевском районе с частотой 0.011.

В трех подгруппах карачаевцев (Малокарачаевского, Прикубанского р-нов и г. Черкесска) наблюдается преобладание фактической гетерозиготности по локусу *STR/FABP2* по сравнению с теоретической. В Карачаевском и Усть-Джегутинском р-нах наблюдается недостаток гетерозигот.

Локус *STR/THO1*

Локус *HUMTHO1* (или *STR/THO1*) представляет еще один *STR*-маркер. Ген тирозингидроксилазы человека (*TH*) локализован на коротком плече 11-й хромосомы (11p15.5), в интроне 1 он содержит локус *HUMTHO1* коротких tandemных повторов AATG [15]. Название аллелей локуса *HUMTHO1* соответствует числу повторов. В некоторых аллелях из тетра nukлеотидной последовательности исчезает один нуклеотид, такие аллели обозначают как *n3*, где *n* — число коровых повторов (например, 9.3). Данный полиморфный локус имеет высокий уровень гетерозиготности (90%) и активно используется в популяционной генетике и при идентификации личности [15].

В общей выборке карачаевцев выявлено шесть аллелей локуса *STR/THO1*: наиболее частыми оказались пять аллелей **6*, **10*, **7*, **9* и **8*, частоты которых составили 0.259, 0.214, 0.213, 0.201 и 0.119, соответственно. Но следует отметить, что соотношение частот аллелей в изученных подгруппах карачаевцев различно (табл. 2). Аллель **11* является редким во всех пяти подгруппах: его частота не превышает 0.038.

По данному локусу отмечается в основном превышение наблюдаемой гетерозиготности, за исключением Усть-Джегутинского р-на, где ожидаемая гетерозиготность выше фактической.

Локус *VNTR/PAH*

Кроме микросателлитных маркеров, рассмотренных выше, в популяционно-генетических

исследованиях активно используются минисателлиты. Одним из них является высокополиморфный участок, представляющий собой AT-богатые повторяющиеся последовательности размером 30 пн, локализованные в 3'-конце гена фенилаланингидроксилазы *PAH* (12q22-q24). Анализ данного региона в популяциях Европы выявил девять вариантов аллелей, содержащих различное количество повторов размером от 350 до 650 пн [13].

В целом в выборке из 485 индивидов определены 8 аллелей локуса *VNTR/PAH* с числом повторов коровой единицы от 3 до 13 (аллели с числом повторов 4, 6 или 10 не выявлены). Наибольшее число аллелей по локусу *VNTR/PAH* отмечено для Малокарачаевского р-на (все 8 аллелей). Во всех районах самыми частыми оказались аллели **8* (от 0.414 в Малокарачаевском до 0.317 в Черкесске) и **3* (от 0.356 в Прикубанском до 0.278 в Усть-Джегутинском). Следует отметить, что в ранее изученных российских популяциях [3–7] частота аллеля **3* существенно преобладала над частотами всех остальных аллелей, в том числе и частотой аллеля **8*. В общей же выборке карачаевцев частоты этих аллелей значимо не различаются: 0.362 для аллеля **8* и 0.335 для аллеля **3*.

При исследовании ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности выявлено уменьшение показателей наблюдаемой гетерозиготности во всех подгруппах карачаевцев.

Локус *VNTR/DAT1*

Ген *SLC6A3* (прежнее название *DAT1*) кодирует переносчик дофамина, принадлежащий к семейству Na^+ , Cl^- -зависимых переносчиков нейромедиаторов и ограничивающий активность дофаминэргической системы в синапсах путем обратного поглощения нейромедиатора в пресинаптические терминалы, который играет важную роль в дофаминэргической нейротрансмиссии [9]. Ген *SLC6A3* локализован на хромосоме 5 в области p15.33. В гене *SLC6A3* обнаружен локус варьирующих tandemных повторов (*VNTR*) в 3'-нетранслируемой области с числом копий от 3 до 11 (длина копии повтора составляет 40 пн). Наиболее частыми являются аллели с 9 и 10 единицами повторов, они присутствуют более чем у 90% индивидов в популяциях европейцев и американцев европейского и африканского происхождения. Выявлены ассоциации между полиморфизмом *VNTR/DAT1* и шизофренией и гиперактивными состояниями с нарушением внимания [9].

Распределение частот аллелей локуса *VNTR/DAT1* во всей популяции карачаевцев характеризуется как унимодальное. Всего выявлено 3 аллеля. Самым частым является аллель с 10 единицами повтора, что характерно и для многих других ранее исследованных популяций [3–7]. Максимальное значение частоты аллеля *10 выявлено у карачаевцев Прикубанского р-на (0.786), а минимальное — у карачаевцев Черкесска (0.700). Вторым по частоте является аллель *9, наибольшая частота которого выявлена в Черкесске — 0.294, а минимальная — в Карачаевском р-не (0.208).

Показатели наблюдаемой гетерозиготности по данному локусу варьируют от 0.333 в подгруппе Карачаевского р-на до 0.433 у карачаевцев Черкесска. В объединенной выборке показатель фактической гетерозиготности значимо не отличается от теоретически ожидаемого по локусу *VNTR/DAT1*.

Локус *VNTR/NOS3*

Еще одним минисателлитом, широко используемым в популяционной генетике, является локус *VNTR/NOS3*. Ген *eNOS* расположен на хромосоме 7 в локусе q35-36 и кодирует фермент конститутивную эндотелиальную синтазу окиси азота, участвующий в образовании одного из важнейших вторичных мессенджеров в организме человека — окиси азота II (NO). Полиморфизм минисателлитного повтора в интроне 4 обусловлен варьирующим числом tandemных последовательностей размером в 27 пн [21]. Данные ряда исследователей свидетельствуют в пользу взаимосвязи полиморфизма 27-членных tandemных повторов гена эндотелиальной синтазы окиси азота с развитием инфаркта миокарда и эссенциальной гипертензией [22].

В популяции карачаевцев выявлены два аллеля *A и *B, с числом повторяющихся единиц 4 и 5 соответственно.

Частота аллеля *B гена *NOS3* во всех подгруппах карачаевцев значительно превышает частоту аллеля *A (табл. 1.), что соответствует распределению частот аллелей локуса *VNTR/NOS3* во многих изученных популяциях [3–7]. Наименьшая частота аллеля *A выявлена у карачаевцев Карачаевского р-на (0.135); наиболее высокие значения частоты этого аллеля отмечено у карачаевцев из Черкесска (0.218).

Локус *VNTR/APOB*

Одним из высокоинформативных высокополиморфных сегментов человеческого генома,

которые широко используются в судебной медицине и популяционной генетике, служит локус повторяющихся коровых АТ богатых последовательностей длиной 14–16 пн, локализованных примерно в 180 пн 3'-нетранслируемой области гена аполипопротеина В (*VNTR/APOB*). Обычно в популяциях сегрегируют 12 аллелей данного локуса с количеством повторов от 28 до 52 [23]. Предполагается, что аллели с большим количеством повторов в локусе *VNTR/APOB* ассоциированы с риском развития инфаркта миокарда [24]. Такие аллели очень редки в мировой популяции. Полученное в настоящей работе распределение частот аллелей в пяти географических подгруппах карачаевцев соответствует полученному ранее для других исследованных народов. Самые распространенные аллели *34 и *36 определены во всех 5 подгруппах с наибольшей частотой. Частота аллеля *36 составила от 0.367 в Прикубанском р-не до 0.514 в Усть-Джегутинском, аллеля *34 — от 0.229 в Усть-Джегутинском до 0.343 в Карачаевском. Третий по частоте аллель *38 также встретился во всех подгруппах карачаевцев с частотой от 0.078 в Карачаевском до 0.112 в Прикубанском р-не.

Из-за большого числа сегрегирующих аллелей (12) и возможных генотипов (78), а также совсем небольшой частоты редких аллелей (частота аллеля *52 составила 0.004 в Малокарачаевском р-не, в других районах некоторые редкие аллели не встретились совсем), используя стандартную методику, мы получили значительное отклонение от равновесия Харди–Вайнберга по данному мультиаллельному локусу, как и весьма заметное уменьшение фактической гетерозиготности от ожидаемых значений (табл. 2).

Итак, анализ полиморфизма десяти аутомных локусов ДНК в объединенной выборке популяции карачаевцев показал, что по двум локусам — *VNTR/PAH* ($F_{is} = 0.109$), *VNTR/APOB* ($F_{is} = 0.188$) — наблюдалось выраженное снижение уровня наблюдаемой гетерозиготности по отношению к теоретической, т.е. наблюдался дефицит гетерозигот. По пяти локусам — *IVS6aGATT(CFTR)*, *CCR5Δ32*, *DAT1*, *STR/FABP2* и *STR/THOI* — значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности практически равны. По трем локусам — *VNTR/eNOS* ($F_{is} = -0.081$), *ID/ACE* ($F_{is} = -0.034$) и *D7S23(KM19)* ($F_{is} = -0.127$) — наблюдается тенденция к избытку гетерозигот. Выявленные особенности могут указывать на эффекты различных типов отбора по этим трем группам локусов и/или



Рис. 2. Дендрограммы по матрице попарных коэффициентов F_{st} (а) и по частым фамилиям (б).

на изолированность географических подгрупп карачаевцев.

Наибольший уровень популяционного разнообразия для карачаевцев по диаллельной системе установлен по локусу *ID/ACE*, $H_{obs} = 0.513$. Для мультиаллельной системы маркеров максимальный уровень разнообразия наблюдается по локусу *STR/THO1*, $H_{obs} = 0.792$. Показатель средней наблюдаемой гетерозиготности на локус составляет 0.466 для карачаевской популяции в целом.

Таким образом, результаты анализа вариаций генных частот, уровень гетерозиготности или генного разнообразия по всем изученным локусам указывают на существование значительного генетического разнообразия в популяции карачаевцев.

Получить представление о подразделенности популяции, о характере генетических взаимоотношений между подгруппами позволяет коэффициент инбридинга между популяциями (F_{st}). Средний коэффициент инбридинга подгруппах F_{is} , характеризующий изменения на-

блюдаемой частоты гетерозиготных носителей по сравнению с ожидаемой, равен 0.003, что свидетельствует о незначительном недостатке гетерозиготных носителей и косвенно о практически полностью случайных браках в популяции карачаевцев. Среднее значение показателя F_{st} , определяющего подразделенность популяции, равняется 0.007 (табл. 3). Это говорит о существующей дифференциации географически разных подгрупп, входящих в состав популяции карачаевцев Республики Карачаево-Черкесия. Внутрипопуляционная изменчивость оказалась в пределах вариации, установленной для других популяций: для марийцев $F_{st} = 0.0024$, удмуртов $F_{st} = 0.0048$, чувашей $F_{st} = 0.006$, татар $F_{st} = 0.0075$ и башкир $F_{st} = 0.008$.

При сравнении матрицы попарных значений F_{st} между подгруппами с матрицей фамильных дистанций [25] выявлена значимая и положительная линейная корреляция ($r = 0.55 \pm 0.29$). Ранговая корреляция составила 0.53. На обеих дендрограммах (рис. 2) карачаевцы Черкесска являются наиболее удаленными от всех остальных.

Мы предполагаем, что это связано с более высоким уровнем метисации карачаевцев Черкесска. Интенсивность метисации карачаевцев в Черкесске составляет 41.3, в районах – 11.7%. Эндогамность районов не является высокой (0.29–0.53), это позволило нам определить территорию фактического проживания карачаевцев как элементарную популяцию, что допускает произвольное сочетание между подгруппами при кластеризации по различным генетическим системам [26].

Таким образом, несмотря на довольно высокий уровень генетического разнообразия карачаевцев в целом, внутри себя данная популяция довольно высоко подразделена.

Финансировано Госзаданием Министерства науки и высшего образования России.

Таблица 3. Парные коэффициенты инбридинга F_{st} между изученными субпопуляциями

г. Черкесск	Карачаевский р-н	Прикубанский р-н	Малокарачаевский р-н	Усть-Джегутинский р-н

0.0059	***			
0.0053	0.0027	***		
0.0047	0.0036	0.0062	***	
0.0061	0.0038	0.0039	0.0040	***

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карачай – страна на вершине Кавказа. Очерки истории и культуры Карачая. Составление, вступительная статья и комментарии С.Х. Хотко. Майкоп: ОАО “Полиграф-ЮГ”, 2011. 448 с.
2. Алексеева Е.П. Карачаевцы и балкарцы – древний народ Кавказа. Черкесск, 1963. 86с. (http://www.elbrusoid.org/upload/iblock/8fc/karacay-balkar-drev-narod_turklib.pdf)
3. Ахметова В.Л., Хусаинова Р.И., Юрьев Е.Б. и др. Анализ полиморфизма девяти ДНК-локусов ядерного генома в популяции марийцев // Генетика. 2006. Т. 42. № 2. С. 256–273.
4. Бермишева М.А., Петрова Н.В., Зинченко Р.А. и др. Популяционно-генетическое исследование популяции удмуртов (анализ десяти полиморфных ДНК-локусов ядерного генома) // Генетика. 2007. Т. 43. № 5. С. 688–705.
5. Гринберг Я.И., Гринберг Э.Р., Ахметова В.Л. и др. Медико-генетическое изучение населения Республики Башкортостан. Сообщ. VI. Популяционно-генетическое изучение этногеографических групп башкир (анализ десяти полиморфных ДНК-локусов ядерного генома) // Мед. генетика. 2010. Т. 9. № 2(92). С. 12–29.
6. Хуснутдинова Э.К., Викторова Т.В., Ахметова В.Л. и др. Популяционно-генетическая структура чувашей (по данным о восьми ДНК-локусах ядерного генома) // Генетика. 2003. Т. 39. № 11. С. 1550–1563.
7. Васильева Т.А., Петрова Н.В., Тимковская Е.Е. и др. Медико-генетическое изучение населения Республики Татарстан. Сообщ. VI. Популяционно-генетическое изучение этногеографических групп татар (анализ десяти полиморфных ДНК-локусов ядерного генома) // Мед. генетика. 2013. Т. 12. № 5 (131). С. 3–20.
8. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 2537–2539. <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>
9. Persico A.M., Macciardi F. Genomic Association between dopamine transporter gene polymorphisms and schizophrenia // Am. J. Med. Genet. 1997. V. 74. P. 53–57.
10. Polymeropoulos M.H., Rath D., Xiao H. et al. Trinucleotide repeat polymorphism at the human intestinal fatty acid binding protein gene (FABP2) // Nucl. Ac. Res. 1991. V. 18. P. 71–98.
11. Yudin N.S., Vinogradov S.V., Potapova T.A. et al. Distribution of CCR5-delta 32 gene deletion across the Russian part of Eurasia // Hum. Genet. 1998. V. 102(6). P. 695–698. <https://doi.org/10.1007/s004390050764>. PMID: 9703433
12. Chehab F., Johnson J., Louie E. et al. A dimorphic 4-bp repeat in the cystic fibrosis gene is in absolute linkage disequilibrium with the delta F508 mutation: Implications for prenatal diagnosis and mutation origin // Am. J. Hum. Genet. 1991. V. 48(2). P. 223–226.
13. Hoang L., Byck S., Prevost L., Scriver C.R. PAH Mutation Analysis Consortium Database: A database for disease-producing and other allelic variation at the human PAH locus // Nucl. Ac. Res. 1996. V. 24. № 1. P. 127–131.
14. Tiret L., Rigat B., Visvikis S. et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels // Am. J. Hum. Genet. 1992. V. 51(1). P. 197–205.
15. <http://www.ualberta.ca/~fyeh>
16. Prasad N., Kane K., Johnston H. et al. The relationship between blood pressure and left ventricular mass in essential hypertensives is observed only in the presence of the ACE-gene deletion allele // QJM. 1994. V. 87. P. 659–669.
17. Evans A.E., Poirier O., Kee F. et al. Polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease // Quart. J. Med. 1994. V. 87. P. 211–214.
18. Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В. Этногеномика и геногеография народов Восточной Европы. М.: Наука, 2002. 261 с.
19. Хитринская, И.Ю., Степанов В.А., Пузырев В.П. и др. Генетическая дифференциация населения Средней Азии по данным аутосомных маркеров // Генетика. 2003. Т. 39. № 10. С. 1389–1397.
20. Polymeropoulos M.H., Xiao H., Rath D. et al. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene // Nucl. Ac. Res. 1991. V. 19. P. 37–53.
21. Мустафина О.Е., Шагисултанова Л.И., Насибуллин Т.Р. и др. Полиморфизм 27-членных tandemных повторов гена эндотелиальной синтазы окиси азота: исследование в популяциях Волго-Уральского региона и анализ ассоциаций с инфарктом миокарда и эссенциальной гипертензией у жителей Башкортостана // Генетика. 2001. Т. 37. № 5. С. 668–674.
22. Пузырев К.В. Клинико-генетическое исследование факторов предрасположенности к эссенциальной гипертензии и идиопатической гипертрофической кардиомиопатии: Дис. ... канд. мед. наук. Томск: Томский науч. центр СО РАМН, 1999. 159 с.
23. Deka R., Chakraborty R., DeCoo S. et al. Characteristics of polymorphism at a VNTR locus 3' to the apolipoprotein B gene in five human populations // Am. J. Hum. Genet. 1992. V. 51(6). P. 1325–1333.
24. Singh N., Sinha N., Kumar S. et al. Influence of ApoB100 3' hypervariable repeats on acute myocardial infarction // Heart Asia. 2014. V. 7–6(1). P. 155–158. <https://doi.org/10.1136/heartasia-2014-010540>.

PMID: 27326195

25. Ельчинова Г.И., Макаов А.Х., Зинченко Р.А. Анализ семейного ландшафта Карачаево-Черкесии // Совр. пробл. науки и образования. 2015. № 5. С. 686–694.

<https://doi.org/10.17513/spno.128-22497>

26. Ельчинова Г.И., Шакманов М.М., Ревазова Ю.А. и др. Брачно-миграционная характеристика карачаевцев // Генетика. 2015. Т. 51. № 8. С. 941–945. <https://doi.org/10.7868/S0016675815070036>

Study of the Karachay Population Based on the Analysis of Ten Polymorphic DNA Loci

N. V. Petrova¹, A. V. Marakhonov¹, N. V. Balinova¹, T. A. Vasilyeva¹, G. I. El'chinova¹*,
E. K. Ginter¹, R. A. Zinchenko¹

¹Research Centre for Medical genetics, Moscow, 115522 Russia

*e-mail: elchinova@med-gen.ru

Genetic structure of Karachai population has been studied based on analysis of 10 autosomal DNA markers (diallelic and multiallelic): *CCR5Δ32*, *ACE*, *D7S23(KM19)*, *STR/THOI*, *STR/FABP*, *STR/IVS6a*, *VNTR/PAH*, *VNTR/DAT1*, *VNTR/eNOS*, *VNTR/APOB*. The total number of sample makes up 485 individuals who are residents of five Karachai regions: Karachaevesky, Prikubansky, Malokarachayevsky, Ust-Dzhegutinsky and the city of Cherkessk, the capital of the Republic of Karachaevo-Cherkessia. Analysis of allele's frequency of autosomal DNA markers in Karachay geographic subgroups shows considerable genetic differentiation between them. The highest level of genetic diversity for Karachay people on diallelic system is set at the locus *ID/ACE*, $H_{obs} = 0.513$, on multi-allele system is at the locus *STR/THOI*, $H_{obs} = 0.792$. The average value of the observed heterozygosity per locus is 0.466, varying from 0.441 in Ust-Dzhegutinsky to 0.503 in Cherkessk. The level of genetic differences between Karachai groups ($F_{ST} = 0.007$) is inside the variance defined in the previously studied peoples, Mari ($F_{ST} = 0.0024$), Udmurt ($F_{ST} = 0.0048$), Chuvash ($F_{ST} = 0.006$), Tatars ($F_{ST} = 0.0075$) and Bashkir ($F_{ST} = 0.008$).

Keywords: Karachai, population genetic structure, DNA markers.

УДК 575.162+575.164

ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИИИ VNTR ПОЛИМОРФИЗМА rs58335419 ГЕНА *MIR137* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ШИЗОФРЕНИИ

© 2024 г. Г. И. Коровайцева^{1, *}, И. В. Олейчик¹, Т. В. Лежейко¹, В. Е. Голимбет^{1, **}¹Научный центр психического здоровья, Москва, 115522, Россия

*e-mail: korovaitseva@mail.ru

**e-mail: golimbet@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 31.07.2023 г.

Ген *MIR137* кодирует микроРНК-137 (miR-137), которая активно экспрессируется в различных областях головного мозга и была идентифицирована как модулятор процессов, участвующих в патогенезе нервно-психических расстройств. В регуляторной области *MIR137* обнаружен функциональный полиморфизм вариативного числа tandemных повторов (VNTR) rs58335419, связанный с изменением экспрессии miR-137 и, как следствие, с увеличением риска развития психопатологий, в том числе и шизофрении. Нами проведен анализ частоты встречаемости аллелей и генотипов VNTR *MIR137* на большой выборке этнических русских российской популяции. Изучена ассоциация VNTR с риском развития шизофрении. Обнаружено, что наличие VNTR-аллелей с числом повторов более трех, а также генотипа, гомозиготного по таким аллелям, связано с увеличением риска развития шизофрении (ОШ = 1.4, 95% ДИ: 1.01–1.95).

Ключевые слова: полиморфизм VNTR, ген *MIR137*, miR-137, шизофрения.

DOI: 10.31857/S0016675824020065 **EDN:** DQTXKJ

Шизофрения — тяжелое психическое расстройство с высоким уровнем как клинической, так и генетической гетерогенности. Являясь сложным многофакторным заболеванием, шизофрения имеет очень значительный генетический компонент, наследуемость которого оценивается до 80% [1–3]. Многочисленные исследования выявили более 270 независимых локусов, связанных с риском шизофрении, в различных популяциях [4–6]. Показано, что значительное количество вариантов риска, зарегистрированных в этих локусах, расположено в некодирующих областях генома, обогащенных регуляторными элементами [7, 8]. Одним из таких элементов является вариативное число tandemных повторов (VNTR). Значительная часть идентифицированных VNTR-локусов человека расположена рядом с генами или внутри них. Вследствие этого их потенциальные эффекты на экспрессию генов или белковых продуктов значительны [9, 10]. VNTR могут находиться в неравновесии по сцеплению с однонуклеотидными полиморфизмами (SNP) — факторами риска или являться независимым компонентом развития заболевания [11–13].

Из числа таких VNTR-полиморфизмов особый интерес вызывает VNTR rs58335419 гена

MIR137 (1p21.3), кодирующего последовательность микроРНК-137 (miR-137). MiR-137 играет критическую роль в функционировании головного мозга. С ее экспрессией связаны развитие нервной системы, неопластическая трансформация и регуляция большого количества генов-мишеней, участвующих в различных путях метаболизма [14]. Полногеномные исследования ассоциаций (GWAS) идентифицировали *MIR137* как один из генов риска шизофрении [4, 6, 15]. VNTR, состоящий из повторов длиной 15 пар нуклеотидов (пн), находится в 5'-области гена в первичном транскрипте на расстоянии 6 пн от начала последовательности предшественника miR-137 [16]. Расположение VNTR в регуляторной области гена предполагает его возможность напрямую участвовать в сложном механизме созревания miR-137 [11].

Особенность функционирования miR связана с подавлением экспрессии генов-мишеней, деградацией транскриптов либо ингибированием трансляции, что делает их роль ключевой в регуляции экспрессии множества генов, в том числе и тех, которые связаны с риском развития шизофрении [17]. Учитывая этот широкий диапазон действия miR, генетические вариации, изменяющие экспрессию генов miR, могут спо-

способствовать развитию шизофрении. Поэтому исследования ассоциации таких генетических полиморфизмов с риском развития заболевания являются актуальными.

Цель настоящего исследования — анализ распределения частот аллелей и генотипов VNTR-полиморфизма *MIR137* в российской популяции и изучение ассоциации этого полиморфизма с риском развития шизофрении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования — “случай—контроль”. Группу контроля составили 1257 психически здоровых человек без наследственной отягощенности психическими заболеваниями (средний возраст 29.9 ± 11.5 лет; 58% женщин и 42% мужчин). Выборка больных включала в себя 1336 человек с шизофренией и расстройствами шизофренического спектра (рубрики F20, F21, F23 и F25 по МКБ-10). В выборку не включали лиц с относительно острой и тяжелой хронической соматической патологией в стадии декомпенсации. По полу и возрасту она была сопоставима с группой контроля (средний возраст 35.9 ± 12.3 лет; 56% женщин и 44% мужчин). Более 95% в каждой группе являлись этническими русскими. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГБНУ НЦПЗ № 98 от 11.09.2007.

Геномная ДНК была выделена из лейкоцитов периферической крови с помощью стандартной методики фенол/хлороформной экстракции. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), выполненной по стандартной процедуре с небольшими модификациями на амплификаторе C1000 Touch (Bio-Rad). Использовали олигонуклеотидные праймеры: прямой 5'-GCT CAG CGA GCA GCA AGA GT-3' и обратный 5'-GTC ACC GAA GAG AGT CAG AGG ACC-3' [16]. Учитывая высокое содержание GC в последовательности VNTR, для уменьшения вероятности возникновения неспецифики при ПЦР использовали Hot Start Taq ДНК-полимеразу (Genterra TaqF, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Амплифицируемый фрагмент для аллеля с тремя повторяющимися единицами составлял 118 пн, и длина ПЦР-фрагмента увеличивалась на 15 пн для каждого дополнительного повтора. Полученные ПЦР-фрагменты разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле. После анализа достаточного количества образцов была создана лестница из ранжированных по длине VNTR в диапазоне

от 3 до 12 повторов. В дальнейшем эта лестница использовалась в качестве маркера длины для определения генотипов остальных образцов. Аллели обозначали *R3*, *R4* и т.д., в соответствии с количеством содержащихся в них повторов.

При анализе данных соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди—Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 . Для оценки значимости различий в распределении аллелей и генотипов полиморфного локуса в изучаемых подгруппах использовали критерий χ^2 Пирсона. Риск того или иного аллеля или генотипа в развитии шизофрении или наступлении определенного функционального исхода оценивали с помощью показателя отношения шансов (ОШ) с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ). За порог статистической значимости при определении ОШ и χ^2 был принят стандартный уровень $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генотипирование выявило 11 VNTR аллелей в выборке больных (от 3 до 13 повторов). В группе контроля длина VNTR варьировала от 2 до 14 повторов, образуя 13 аллелей.

Результаты исследования распределения генотипов VNTR-полиморфизма гена *MIR137* в выборке больных шизофренией и в группе здорового контроля представлены в табл. 1.

Аллель дикого типа *R3* являлся мажорным. Частота *R3* составила 78% в контрольной группе и 74.7% в группе больных. Для последующего анализа все аллели с количеством повторов больше трех (минорные аллели) мы объединили в одну группу и обозначили ее как *R>3*. Один образец в контрольной группе с генотипом *R2/R3* был исключен из анализа. Выборка в результате составила 1256 человек. После группировки минорных аллелей генотипы VNTR *MIR137* распределялись следующим образом: в выборке больных *R3/R3* — 752 (56.3%), *R3/R>3* — 492 (36.8%), *R>3/R>3* — 92 (6.9%); в группе здорового контроля *R3/R3* — 770 (61.3%), *R3/R>3* — 423 (33.7%), *R>3/R>3* — 63 (5%). Распределение частот генотипов в обеих выборках соответствовало равновесию Харди—Вайнберга ($\chi^2 = 0.88$, $p = 0.35$ — в группе больных; $\chi^2 = 0.25$, $p = 0.88$ — в контрольной группе). Частоты аллелей и генотипов у мужчин и женщин значимо не отличалась между собой как в группе больных шизофренией, так и в группе контроля.

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов VNTR-полиморфизма гена *MIR137* у больных шизофренией и здоровых индивидов

Аллель, генотип	Больные шизофренией (<i>N</i> = 1336)		Контрольная группа (<i>N</i> = 1257)		Аллель, генотип	Больные шизофренией (<i>N</i> = 1336)		Контрольная группа (<i>N</i> = 1257)	
	<i>n</i>	частота (%)	<i>n</i>	частота (%)		<i>n</i>	частота (%)	<i>n</i>	частота (%)
R2	—	—	1	0.0398	R4/R11	3	0.22	1	0.08
R3	1996	74.70	1964	78.12	R4/R12	2	0.15	2	0.16
R4	250	9.36	207	8.47	R4/R13	1	0.07	—	—
R5	78	2.92	73	2.90	R4/R14	—	—	1	0.08
R6	65	2.43	51	2.03	R5/R5	2	0.15	4	0.32
R7	77	2.88	44	1.75	R5/R6	2	0.15	1	0.08
R8	52	1.95	38	1.51	R5/R7	6	0.45	—	—
R9	52	1.95	41	1.63	R5/R8	2	0.15	1	0.08
R10	58	2.17	46	1.83	R5/R9	—	—	2	0.16
R11	28	1.05	34	1.35	R5/R10	1	0.07	2	0.16
R12	14	0.52	13	0.52	R5/R11	—	—	3	0.24
R13	2	0.075	1	0.0398	R5/R12	—	—	1	0.08
R14	—	—	1	0.0398	R6/R6	1	0.07	—	—
R2/R3	—	—	1	0.08	R6/R7	2	0.15	2	0.16
R3/R3	752	56.29	770	61.26	R6/R8	—	—	1	0.08
R3/R4	176	13.17	163	12.97	R6/R9	—	—	2	0.16
R3/R5	58	4.34	54	4.30	R6/R10	2	0.15	1	0.08
R3/R6	52	3.89	36	2.86	R6/R11	—	—	2	0.16
R3/R7	53	3.97	38	3.02	R6/R12	—	—	1	0.08
R3/R8	39	2.92	27	2.15	R7/R7	4	0.30	—	—
R3/R9	41	3.07	31	2.47	R7/R8	1	0.07	—	—
R3/R10	39	2.92	36	2.86	R7/R9	1	0.07	2	0.16
R3/R11	22	1.65	28	2.23	R7/R11	1	0.07	—	—
R3/R12	11	0.82	9	0.72	R7/R12	1	0.07	—	—
R3/R13	1	0.07	1	0.08	R8/R9	—	—	1	0.08
R4/R4	15	1.27	10	0.80	R8/R10	4	0.30	2	0.16
R4/R5	5	0.37	1	0.08	R8/R11	1	0.07	—	—
R4/R6	5	0.37	5	0.40	R9/R9	1	0.07	—	—
R4/R7	4	0.30	2	0.16	R9/R10	2	0.15	1	0.08
R4/R8	5	0.37	6	0.48	R10/R11	1	0.07	—	—
R4/R9	6	0.45	2	0.16					
R4/R10	9	0.67	4	0.32					

Примечание. “—” — генотипы отсутствуют в анализируемой выборке.

Анализ распределения частот аллелей и генотипов выявил достоверное увеличение как частоты генотипа $R>3/R>3$, ($\chi^2 = 4.03$, $p = 0.044$; ОШ = 1.4, 95%ДИ (1.01–1.95)), так и аллеля $R>3$ ($\chi^2 = 8.51$, $p = 0.0035$; ОШ = 1.21, 95%ДИ (1.06–1.38)) у больных шизофренией по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

В качестве количественной меры эффекта при сравнении данных, нами использовался показатель отношения шансов (ОШ). Полученные значения ОШ указывают на то, что наличие VNTR-аллелей с числом повторов более трех повышает риск развития шизофрении. Аллель дикого типа, наиболее распространенный в по-

пуляции ($R3$), напротив, обладает защитным эффектом (табл. 2). Для того чтобы выяснить, связан ли риск шизофрении с полом, мы проанализировали распределение частот генотипов в группах мужчин и женщин. Достоверных отличий распределения генотипов между этими группами в выборках больных и контроля не обнаружено.

Самую высокую частоту среди аллелей, более чем с тремя VNTR-повторами, имел аллель $R4$. Поэтому мы проверили, связан ли данный аллель с риском развития шизофрении. Анализ не выявил достоверных отличий распределения $R4$ в выборках больных и контроля.

ОБСУЖДЕНИЕ

MIR137 кодирует miR-137, которая активно экспрессируется во всех областях головного мозга, за исключением мозжечка [18, 19], и была идентифицирована как модулятор процессов, участвующих в патогенезе нервно-психических расстройств, включая развитие нервной системы, нейрогенез у взрослых, синаптогенез и нервную передачу [14, 20–24]. Ряд генов-кандидатов шизофрении, выявленных в исследованиях GWAS, являлись мишенями miR-137 [6, 25–27]. А количество генов-мишеней для miR-137, прогнозируемое в результате биоинформационных исследований, превышает 1300 [28]. Кроме того, показано, что SNP гена *MIR137* увеличивают риск развития заболевания [4, 6, 15], влияют на уровень экспрессии miR-137 в мозге [20, 23, 29, 30], а также на структурные характеристики головного мозга и концентрацию серого вещества при шизофрении [29, 31]. Несмотря на все эти многочисленные данные, подтверждающие роль miR в этиологии шизофрении, молекулярные механизмы, лежащие в основе ассоциации miR-137 с шизофренией, до сих пор не ясны.

Наряду с SNP в гене *MIR137* обнаружен новый функциональный вариант — вариативное число tandemных повторов (VNTR) rs58335419. Показано, что он вовлечен в регуляцию альтернативного сплайсинга первичного транскрипта miR-137, который приводит к образованию изоформ, подавляющих экспрессию зрелой miR-137 [16]. Обнаружена роль аллелей VNTR в модулировании уровня экспрессии miR-137 [12, 21]. Кроме того, последовательность VNTR имеет высокое содержание GC и находится в области CpG-островков (CGI), так же, как и последовательность зрелой miR-137. Таким образом, увеличение числа копий повторов увеличивает протяженность CGI и может способствовать различным эпигенетическим модификациям этого участка, влияя на регуляцию экспрессии miR-137 [16].

Анализ частоты встречаемости аллелей и генотипов VNTR *MIR137* в разных популяциях демонстрирует различные результаты. Во всех исследованиях аллель дикого типа с тремя повторами *R3* является самым распространенным, однако его частота заметно различается и варьирует от 56 до 91% [11, 16, 32, 33]. В нашей работе это значение составляет 78% и превышает частоту *R3* (68%) в европейской популяции, полученную ранее другими авторами [16], причем оба эти значения отличаются от данных для европейских популяций, представленных в проек-

те “1000 геномов”, — 92% [34]. Следует отметить, что ранее некоторые исследователи уже отмечали сложности в определении длины VNTR при числе повторов более девяти и предполагали, что несопоставимость частот аллелей в разных исследованиях связана с различиями в протоколах амплификации [16].

Проведенный нами анализ ассоциаций вариантов VNTR гена *MIR137* в исследованиях “случай—контроль” в российской популяции выявил ассоциацию как генотипа *R>3/R>3*, так и аллеля *R>3* с увеличением риска развития шизофрении. Значение показателя ОШ свидетельствует о том, что изучаемый полиморфизм вносит определенный вклад в риск развития заболевания, хотя и не обладает большим самостоятельным эффектом. Это вполне естественно, так как возможно существование ряда других генетических и средовых факторов, которые при взаимодействии с VNTR *MIR137* могут определять особенности развития и протекания шизофрении.

Подобные исследования, выполненные ранее, показали различные результаты. При анализе японской популяции изучали ассоциацию отдельных вариантов VNTR и шизофрении [33]. Ни для одного варианта ассоциация не была обнаружена, однако частота аллеля *R>3* в группе больных шизофренией была выше, чем в группе контроля, что согласуется с результатами, полученными нами. В другом исследовании, напротив, было обнаружено, что у больных повышена частота аллеля дикого типа *R3* и генотипа *R3/R3* [16]. Это различие не достигало статистической значимости, но авторы прогнозировали значительный эффект при увеличении объема выборки. При изучении роли VNTR *MIR-137* в механизме альтернативного сплайсинга первичного транскрипта miR-137 была обнаружена ассоциация между VNTR, содержащими более трех повторов, и изоформами транскриптов, снижающих уровень экспрессии зрелой miR-137 [16]. Поэтому авторы предположили, что именно короткая длина VNTR связана с риском, а большая длина (*R>3*) обеспечивает защитный эффект. Существует ряд других подтверждений того, что наличие некоторых “длинных” аллелей VNTR может приводить к снижению экспрессии miR-137 [11, 21, 35, 36]. Между тем, при изучении гаплотипов SNP гена *MIR137*, ассоциированных с шизофренией, были получены данные, позволяющие предположить наличие гаплотипа, обуславливающего риск развития заболевания, который может включать редкие варианты VNTR

с большим числом копий [15]. Это согласуется с нашими результатами. Данные, полученные нами на больших выборках, свидетельствуют о том, что аллель дикого типа $R3$ обладает защитным эффектом, а $R>3$ является фактором риска.

Кроме того, следует отметить, что связь между уровнем экспрессии miR-137 и патофизиологическими механизмами развития шизофрении до сих пор остается неясной. Одни авторы предполагают, что риск развития шизофрении связан со сверхэкспрессией miR-137, приводящей к подавлению функционирования генов-мишеней [16, 18, 20, 24]. В то же время М. Strazisar с соавт. в результате проведения транскриптомного анализа показал, что именно снижение экспрессии miR-137 приводит к нарушению функционирования ряда генов, участвующих в синаптогенезе и нейрональной передаче, которые, как известно, связаны с психическими расстройствами [21]. Помимо этого исследования показали, что SNP в области гена MIR137, увеличивающие риск шизофрении, могут обуславливать как снижение экспрессии miR-137 [15, 30], так и ее увеличение [23].

Учитывая полученные ранее данные о связи аллеля VNTR с четырьмя повторами ($R4$) с изменениями морфологии головного мозга [11] и тяжестью когнитивных нарушений [11, 37], мы изучали ассоциацию $R4$ с риском развития шизофрении. Наши результаты согласуются с предыдущими исследованиями, в которых также не сообщалось об ассоциации между $R4$ и шизофренией [11, 33]. Соответственно мы подтвердили предположение о том, что $R4$ имеют более сильную связь с когнитивными и нейроанатомическими эндофенотипами шизофрении, чем с заболеванием, как диагностической категорией.

Таким образом, в настоящей работе мы впервые провели анализ VNTR rs58335419 гена *MIR137* на большой выборке этнических русских из российской популяции. В наших исследованиях мы показали, что и аллель $R>3$, и генотип $R>3/R>3$ влияют на риск развития шизофрении, повышая его.

Работа выполнена в рамках Государственного задания.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике

и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stefansson H., Ophof R.A., Steinberg S. et al. Common variants conferring risk of schizophrenia // *Nature*. 2009. V. 460. № 7256. P. 744–747. <https://doi.org/10.1038/nature08186>
2. Gejman P.V., Sanders A.R., Duan J. The role of genetics in the etiology of schizophrenia // *Psychiatr. Clin. North Am.* 2010. V. 33. № 1. P. 35–66. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.12.003>
3. Polderman T.J., Benyamin B., de Leeuw C.A. et al. Meta-analysis of the heritability of human traits based on fifty years of twin studies // *Nat. Genet.* 2015. V. 47. № 7. P. 702–709. <https://doi.org/10.1038/ng.3285>
4. Trubetskoy V., Pardiña, A.F., Qi T. et al. Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia // *Nature*. 2022. V.604. P. 502–508. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5>
5. Lam M., Chen C.Y., Li Z. et al. Comparative genetic architectures of schizophrenia in East Asian and European populations // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 12. P. 1670–1678. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0512-x>
6. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Ripke S., Walters J.T., O'Donovan M.C. Mapping genomic loci prioritises genes and implicates synaptic biology in schizophrenia // *MedRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.09.12.20192922>
7. Jaffe A.E., Straub R.E., Shin J.H. et al. Developmental and genetic regulation of the human cortex transcriptome illuminate schizophrenia pathogenesis // *Nat. Neurosci.* 2018. V. 21. № 8. P. 1117–1125. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0197-y>
8. Takata A., Matsumoto N., Kato T. Genome-wide identification of splicing QTLs in the human brain and their enrichment among schizophrenia-associated loci // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 14519–14529. <https://doi.org/10.1038/ncomms14519>
9. Bakhtiari M., Park J., Ding Y.C. et al. Variable number tandem repeats mediate the expression of proximal genes // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 2075–2099. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22206-z>
10. Eslami R.M., Hernández Y., Drinan S.D. et al. Genome-wide characterization of human minisatellite VNTRs: Population-specific alleles and gene expression differences // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. № 8. P. 4308–4324. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab224>
11. Mahmoudi E., Atkins J.R., Quidé Y. et al. The MIR137 VNTR rs58335419 is associated with cognitive impair-

- ment in schizophrenia and altered cortical morphology // *Schizophr. Bull.* 2021. V. 47. № 2. P. 495–504. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa123>
12. Warburton A., Breen G., Rujescu D. et al. Characterization of a REST-regulated internal promoter in the schizophrenia genome-wide associated gene MIR137 // *Schizophr. Bull.* 2015. V. 41. № 3. P. 698–707. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbu117>
 13. Li M., Jaffe A.E., Straub R.E. et al. A human-specific AS3MT isoform and BORCS7 are molecular risk factors in the 10q24.32 schizophrenia-associated locus // *Nature Med.* 2016. V. 22. P. 649–656. <https://doi.org/10.1038/nm.4096>
 14. Mahmoudi E., Cairns M.J. MiR-137: An important player in neural development and neoplastic transformation // *Mol. Psychiatry.* 2017. V. 22. № 1. P. 44–55. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.150>
 15. Warburton A., Breen G., Bubb V.J. et al. A GWAS SNP for schizophrenia is linked to the internal MIR137 promoter and supports differential allele-specific expression // *Schizophr. Bull.* 2016. V. 42. № 4. P. 1003–1008. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbv144>
 16. Pacheco A., Berger R., Freedman R., Law A.J. A VNTR regulates miR-137 expression through novel alternative splicing and contributes to risk for schizophrenia // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 11793–11804. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48141-0>
 17. O'Connor R.M., Gururajan A., Dinan T.G. et al. All Roads Lead to the miRNome: miRNAs have a central role in the molecular pathophysiology of psychiatric disorders // *Trends in pharmacological sciences.* 2016. V. 37. № 12. P. 1029–1044. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.004>
 18. Arakawa Y., Yokoyama K., Tasaki S. et al. Transgenic mice overexpressing miR-137 in the brain show schizophrenia-associated behavioral deficits and transcriptome profiles // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220389>
 19. Forero D.A., van der Ven K., Callaerts P., Del-Favero J. miRNA genes and the brain: Implications for psychiatric disorders // *Hum. Mutat.* 2010. V. 31. № 11. P. 1195–1204. <https://doi.org/10.1002/humu.21344>
 20. He E., Lozano M.A.G., Stringer S. et al. MIR137 schizophrenia-associated locus controls synaptic function by regulating synaptogenesis, synapse maturation and synaptic transmission // *Hum. Mol. Genet.* 2018. V. 27. № 11. P. 1879–1891. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy089>
 21. Strazisar M., Cammaerts S., van der Ven K. et al. MIR137 variants identified in psychiatric patients affect synaptogenesis and neuronal transmission gene sets // *Mol. Psychiatry.* 2015. V. 20. № 4. P. 472–481. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.53>
 22. Hill M.J., Donocik J.G., Nuamah R.A. et al. Transcriptional consequences of schizophrenia candidate miR-137 manipulation in human neural progenitor cells // *Schizophr. Res.* 2014. V. 153. № 1–3. P. 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.01.034>
 23. Siegert S., Seo J., Kwon E.J. et al. The schizophrenia risk gene product miR-137 alters presynaptic plasticity // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. № 7. P. 1008–1016. <https://doi.org/10.1038/nn.4023>
 24. He E., Lozano M.A.G., Stringer S. et al. MIR137 schizophrenia-associated locus controls synaptic function by regulating synaptogenesis, synapse maturation and synaptic transmission // *Hum. Mol. Genet.* 2018. V. 27. № 11. P. 1879–1891. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy089>
 25. Collins A.L., Kim Y., Bloom R.J. et al. Transcriptional targets of the schizophrenia risk gene MIR137 // *Transl. Psychiatry.* 2014. V. 4. № 7. e404. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.42>
 26. Kwon E., Wang W., Tsai L.H. Validation of schizophrenia-associated genes CSMD1, C10orf26, CACNA1C and TCF4 as miR-137 targets // *Mol. Psychiatry.* 2013. V. 18. P. 11–12. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.170>
 27. Kim A.H., Parker E.K., Williamson V. et al. Experimental validation of candidate schizophrenia gene ZNF804A as target for hsa-miR-137 // *Schizophr. Res.* 2012. V. 141. № 1. P. 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.06.038>
 28. Agarwal V., Bell G.W., Nam J.-W., Bartel, D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. // *eLife.* 2015. V. 4. e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
 29. Wright C., Gupta C.N., Chen J. et al. Polymorphisms in MIR137HG and microRNA-137-regulated genes influence gray matter structure in schizophrenia // *Transl. Psychiatry.* 2016. V. 6. № 2. e724. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.211>
 30. Guella I., Sequeira A., Rollins B. et al. Analysis of miR-137 expression and rs1625579 in dorsolateral prefrontal cortex // *J. Psychiatr. Res.* 2013. V. 47. № 9. P. 1215–1221. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.05.021>
 31. Zhang Z., Yan T., Wang Y. et al. Polymorphism in schizophrenia risk gene MIR137 is associated with the posterior cingulate Cortex's activation and functional and structural connectivity in healthy controls // *Neuroimage Clin.* 2018. V. 19. P. 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.03.039>
 32. Jafari P., Baghernia S., Moghanibashi M., Mohamadynejad P. Significant association of variable number tandem repeat polymorphism rs58335419 in the MIR137 gene with the risk of gastric and colon cancers // *Br. J. Biomed. Sci.* 2022. V. 79. P. 10095–10099. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2021.10095>
 33. Egawa J., Nunokawa A., Shibuya M. et al. Resequencing and association analysis of MIR137 with schizophrenia in a Japanese population // *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2013. V. 67. № 4. P. 277–279. <https://doi.org/10.1111/pcn.12047>
 34. Проект “1000 геномов”. <http://www.internationalgenome.org>
 35. Mamdani M., McMichael G.O., Gadepalli V. et al. Differential regulation of schizophrenia-associated microRNA gene function by variable number tandem repeats (VNTR) polymorphism // *Schizophr. Res.* 2013. V. 151. № 1–3. P. 284–286. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.10.024>
 36. Bemis L.T., Chen R., Amato C.M. et al. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 1362–1368.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2912>

37. González-Giraldo Y., González-Reyes R.E., Forero D.A. A functional variant in MIR137, a candidate gene for schizo-

phrenia, affects Stroop test performance in young adults // Psychiatry. Res. 2016. V. 236. P. 202–205. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.01.006>

A STUDY OF ASSOCIATION OF THE VNTR miR-137 rs58335419 WITH SCHIZOPHRENIA

G. I. Korovaitseva^{a, *}, I. V. Oleichik^a, T. V. Lezheiko^a, V. E. Golimbet^{a, **}

^aMental Health Research Centre, 115522 Moscow, Russia

*e-mail: korovaitseva@mail.ru

**e-mail: golimbet@mail.ru

The MIR137 gene encodes microRNA-137 (miR-137), which is a brain-enriched miR that is highly expressed in various brain regions. miR-137 has been identified as a modulator of processes involved in the pathogenesis of neuropsychiatric disorders. Functional polymorphism of variable number of tandem repeats (VNTR) rs58335419 was found in the regulatory region of the MIR137 gene. It is associated with a change in the expression of miR-137 and, as a result, with an increased risk of developing psychopathologies, including schizophrenia. In this study, we for the first time have analyzed the distribution of frequencies of alleles and genotypes of VNTR MIR137 in a large sample from the Russian population. The association of VNTR with the risk of schizophrenia has been studied. It was found that the presence of VNTR alleles with more than three repeats, as well as a genotype homozygous for such alleles, is associated with an increased risk of developing schizophrenia (OR = 1.4, 95% CI: 1.01-1.95).

Keywords: VNTR polymorphism, MIR137 gene, miR-137, schizophrenia.

УДК 575.174:599.9

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *FADS* И ИСТОРИЯ ФОРМИРОВАНИЯ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ СИБИРИ

© 2024 г. Б. А. Малярчук^{1,*}, М. В. Деренко¹, Г.А. Денисова¹, А. Н. Литвинов¹, И. К. Дамбуева¹¹ Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, 685000 Россия

*e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

Поступила в редакцию 30.07.2023 г.

После доработки 11.09.2023 г.

Принята к публикации 12.09.2023 г.

Исследован полиморфизм локусов rs174570, rs74771917 и rs7115739 *FADS*-генов в популяциях Сибири. Показано, что у современного коренного населения частота варианта rs174570-*T*, маркирующего гаплотип А с пониженным уровнем экспрессии десатураз жирных кислот, растет в направлении с юга на север Сибири. Аналогично в северном направлении наблюдается увеличение частоты гаплотипа ТТТ по локусам rs174570, rs74771917 и rs7115739. Однако в древности популяции Восточной Сибири (ее северо-восточной части, Байкальского региона и Приморья) характеризовались одинаково высокой частотой варианта rs174570-*T* (более 80%). Показано, что основной приток аллеля rs174570-*C* (и гаплотипа ССГ) на северо-восток Сибири произошел относительно недавно, на протяжении последних 300 лет в результате брачных контактов между коренным населением и пришлыми группами преимущественно восточноевропейского происхождения. Интенсивность генного потока (по аллелю rs174570-*C*) оценивается в 1.5–4.4% на поколение. Появление варианта rs174570-*C* у населения Байкальского региона регистрируется с эпохи энеолита, что связано, по всей видимости, в основном с продвижением на восток Сибири племен афанасьевской культуры. Между тем анализ палеогеномных данных показал, что гаплотип ТТТ, с высокой частотой распространенный у современных эскимосов и американских индейцев, в верхнем палеолите присутствовал у населения Приамурья, и поэтому его носители, по всей видимости, принимали участие в формировании древнейшего населения Берингии.

Ключевые слова: гены *FADS*, популяции человека, генофонд, адаптация, Сибирь.**DOI:** 10.31857/S0016675824020073 **EDN:** DQTRWQ

Кластер *FADS*-генов (*FADS1*, *FADS2* и *FADS3*), кодирующих десатуразы жирных кислот, представляет большой интерес в плане изучения генетических механизмов адаптации к условиям природной среды и особенностям питания различных народов [1–6]. В области расположения *FADS*-генов (11q12–13.1) находятся два гаплоглоба: первый определяется вариантами полиморфизма в гене *FADS1* и первой части гена *FADS2*, второй – вариантами полиморфизма оставшейся последовательности гена *FADS2* [1]. Установлено также, что первый гаплоглоб представлен двумя основными гаплотипами – А и D, которые кодируют ферменты соответственно с пониженной и повышенной десатуразной активностью.

Гаплотип А довольно редко встречается в популяциях Африки (примерно 1–3%) и Южной Азии (примерно 8%), а также Европы (12–16%) (по сведениям базы данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)). Однако у населения Восточной Азии и Америки частота гаплотипа А

достигает высоких частот (более 50%). У гренландских эскимосов наблюдается почти полная фиксация этого гаплотипа в популяции – 98% по данным работы [2]. Предполагается, что распространение менее активного в плане десатурации жирных кислот гаплотипа А началось еще со времен заселения Евразии и Америки верхнепалеолитическими людьми, потреблявшими богатую липидами и белками пищу [7–9]. Однако позже в неолите, по мере появления технологий сельского хозяйства более распространенными в некоторых регионах мира (Европе, Южной Азии) стали D-гаплотипы, позволяющие с большей скоростью синтезировать полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) из липидов растений [1, 8, 9]. Между тем по палеогеномным данным известно, что у донеолитических европейцев был распространен в основном гаплотип А [10]. Таким образом, частота гаплотипа D в Европе увеличилась от менее 10% 10 тыс. лет тому назад до 60–75% в настоящее время [7]. Предполагается, что столь резкое изменение частоты этого

гаплотипа у европейцев связано с действием положительного отбора [8–10]. Более того, недавно установлено, что действие отбора на локусы *FADS*-генов у европейцев продолжается до сих пор — согласно результатам анализа данных UK Biobank, частота гаплотипа D у британцев европейского происхождения продолжает расти на 0.009% в год [11]. Одной из причин этого может быть связь с репродуктивным успехом, поскольку рост частоты гаплотипа D ассоциируется с увеличением коэффициента рождаемости.

Результаты популяционно-генетических исследований показали, что с наиболее высокими частотами гаплотип A распространен среди коренного населения Сибири и Америки [4–6, 12–14]. Причем в сибирских популяциях частота гаплотипа A увеличивается в направлении с юга на север [5, 14]. У американских индейцев частота этого гаплотипа составляет более 90% как на севере, так и на юге Америки [4]. Предполагается, что высокая распространенность гаплотипа A у америндов связана с отбором наиболее оптимальных вариантов *FADS*-полиморфизма еще у населения Берингии, предкового по отношению к американским индейцам, в связи с необходимостью адаптироваться к холоду и ограниченными пищевыми ресурсами, предоставленными Арктикой [2, 4]. Другая гипотеза, основанная на палеогеномных данных, предполагает, что отбор гаплотипа A произошел еще раньше — во время выхода первых групп человека из Африки и расселения на территориях Евразии [8]. Поэтому к моменту формирования берингийской популяции (20–15 тыс. лет тому назад) вполне вероятно, что альтернативы гаплотипу A просто не было, однако отбор мог происходить на уровне его субгаплотипов.

В популяционно-генетическом исследовании гренландских эскимосов был выявлен сильный сигнал отбора в области *FADS*-генов, а также оказалось, что у эскимосов с частотой 98% распространен единственный гаплотип, сформированный вариантами полиморфизма *FADS*-генов, связанными с рядом метаболических и антропометрических фенотипов (например, ростом, распределением жира по телу, композицией жирных кислот в мембранах эритроцитов) [2]. Этот гаплотип представлен вариантами полиморфизма, маркирующими гаплотип A (rs174570-*T* гена *FADS2*), а также вариантами полиморфизма, выходящими за пределы области этого гаплоглоба (rs74771917-*T* гена *FADS2* и rs7115739-*T* гена *FADS3*). Поскольку информация о полиморфиз-

ме этих локусов в популяциях коренного населения Сибири очень фрагментарна, в настоящей работе нами исследован полиморфизм локусов rs174570, rs74771917 и rs7115739 в популяциях северной и южной частей Сибири, а также получены сведения о распространении гаплотипов для указанных локусов *FADS*-генов у современного и древнего населения Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы выборки коренного населения Сибири: чукчи ($N = 14$) из Чукотского автономного округа (г. Анадырь), коряки ($N = 96$) и эвены ($N = 96$) из Северо-Эвенского района Магаданской области, эвенки ($N = 56$) из различных поселков Эвенкийского района Красноярского края, буряты ($N = 123$) из различных районов Бурятии, алтайцы ($N = 125$) из различных районов Республики Алтай, тувинцы ($N = 84$) из различных районов Республики Тыва.

Выделение и очистку геномной ДНК проводили как описано нами ранее [6]. Генотипирование локусов rs174570, rs74771917 и rs7115739 выполняли с помощью секвенирования ДНК по Сэнгеру с использованием набора для циклического секвенирования ДНК BigDye Terminator (Applied Biosystems v 3.1) и генетического анализатора ABI Prism 3500xL (Applied Biosystems). Участок ДНК, включающий в свой состав полиморфный локус rs174570 (ген *FADS2*, позиция 61597212 хромосомы 11), амплифицировали с помощью пары олигонуклеотидных праймеров FA1 (5'-TCCTGCCAAGAACACCCTTC-3') и FA2 (5'-CACCACCTGTCCATTGTCCA-3'). Для генотипирования локуса rs74771917 (ген *FADS2*, позиция 61627960 хромосомы 11) использовали праймеры FA5 (5'-AGAACCGCCCATGACAACAA-3') и FA6 (5'-GTTTCGCCCATGTTGCTCAG-3'), для локуса rs7115739 (ген *FADS3*, позиция 61641717 хромосомы 11) применяли праймеры FA7 (5'-AACACCCCTGTATCCCCCAT-3') и FA8 (5'-CGCCTTTGTACACGCTGTTTC-3'). Нуклеотидные последовательности праймеров подобраны с помощью программы Primer3 [15]. Нумерация нуклеотидов приводится согласно референтной последовательности генома человека GRCh37.p13 (hg19).

Для анализа нуклеотидных последовательностей участков, включающих локусы rs174570, rs74771917 и rs7115739, использовали пакет программ MEGA5 [16]. Распределение аллелей, генотипов и гаплотипов, гетерозиготность

Таблица 1. Частоты генотипов и аллелей локуса rs174570 гена *FADS2* в популяциях Сибири

Популяция (<i>N</i>)	Генотипы			Аллели		<i>He</i>	<i>P</i>
	ТТ	СТ	СС	Т	С		
Эскимосы (19) ¹	0.789	0.211	0	0.895	0.105	0.194	1.0
Чукчи (14) ²	0.714	0.214	0.072	0.821	0.179	0.304	0.35
Коряки (96) ²	0.771	0.208	0.021	0.875	0.125	0.22	0.64
Эвены (96) ²	0.646	0.302	0.052	0.797	0.203	0.325	0.53
Эвенки (56) ²	0.625	0.286	0.089	0.768	0.232	0.36	0.14
Якуты (22) ¹	0.546	0.409	0.045	0.75	0.25	0.384	1.0
Буряты (123) ²	0.22	0.536	0.244	0.488	0.512	0.502	0.47
Тувинцы (84) ²	0.226	0.512	0.262	0.482	0.518	0.502	1.0
Алтайцы (125) ²	0.216	0.504	0.28	0.468	0.532	0.5	1.0
Шорцы (24) ¹	0.083	0.584	0.333	0.375	0.625	0.479	0.39

Примечание. *N* – размер выборки, *He* – ожидаемая гетерозиготность, *P* – статистическая значимость отклонения от равновесия Харди–Вайнберга (достоверно при $P < 0.05$). 1 – по данным работы [18]; 2 – настоящая работа.

Таблица 2. Частота варианта rs174570-*T* гена *FADS2* у древнего населения Сибири

Регион (<i>N</i>)	Координаты	Возраст (тыс. лет)	Частота варианта rs174570- <i>T</i>
Северо-Восточная Сибирь (26)	60.0°–66.2° с.ш., 132.0° в.д.–169.8° з.д.	0.6–9.8	1.0
Дальний Восток (Приморье) (11)	42.8°–44.5° с.ш., 131.0°–135.0° в.д.	5.6–7.7	1.0
Юго-Восточная Сибирь (55)	50.0°–57.5° с.ш., 102.0°–115.0° в.д.	0.6–8.8	0.873
Юго-Западная Сибирь (65)	48.8°–56.2° с.ш., 83.9°–95.8° в.д.	1.1–5.1	0.554

и генетическую дифференциацию популяций (в значениях F_{st}) исследовали с помощью пакета программ Arlequin 3.5 [17]. Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга в популяциях и различия в частоте аллелей и генотипов оценивали с помощью точного теста Фишера. Частоты гаплотипов определяли с помощью EM-алгоритма. Неравновесие по сцеплению между парами полиморфных локусов оценивали с помощью коэффициентов D' и r^2 (пакет программ Arlequin 3.5).

Для анализа распределения генотипов и аллелей локуса rs174570 использовали опубликованные ранее результаты мультилокусного генотипирования в популяциях эскимосов, якутов и шорцев [18]. Частоты аллелей для локусов rs174570, rs74771917 и rs7115739 в различных популяциях мира определяли с помощью баз генетических данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) и ALFRED (<https://alfred.med.yale.edu/alfred/>). Сведения о полиморфизме этих локусов у древних индивидов взяты из базы данных Allen Ancient DNA Resource (<https://reich.hms.harvard.edu/>). Значения генных потоков (долю привнесенных аллелей (M) и интенсивность генного потока (m)) рассчитаны по формулам (10.3) и (10.4) работы [19].

Для визуализации распределения частоты аллеля rs174570-*T* в географическом пространстве использовали пакет программ Surfer (Golden Software, LLC) (www.goldensoftware.com) и геоинформационную систему QGIS (<https://qgis.org/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полиморфизм локуса rs174570 гена FADS2 в современных популяциях Сибири

Результаты исследования полиморфизма локуса rs174570 в популяциях коренного населения Сибири показали, что частота аллеля rs174570-*T* и генотипа *ТТ* почти в два раза выше в популяциях Северо-Восточной Сибири в сравнении с югом Сибири (табл. 1). У эскимосов, чукчей и коряков частота варианта rs174570-*T* достигает почти 90%, что сопоставимо с аналогичными данными для эскимосов Аляски, Канады и Гренландии [2, 12, 20]. Для распределений генотипов локуса rs174570 в исследованных популяциях Сибири отклонений от равновесия Харди–Вайнберга не обнаружено (табл. 1).

Анализ межпопуляционной генетической дифференциации (в виде F_{st} -значений) показал, что по распределению аллелей локуса rs174570

популяции северной части Сибири (эскимосы, чукчи, коряки, эвены, эвенки, якуты) статистически значимо отличаются от популяций Южной Сибири (буряты, алтайцы, шорцы, тувинцы) (табл. 1 доп. материалов). Результаты пространственной интерполяции значений частоты аллеля rs174570-*T* в популяциях Северной Евразии также показали, что частота этого варианта гена *FADS2* постепенно повышается к северу, достигая максимальных значений у коренного населения Чукотки (рис. 1; табл. 2 доп. материалов).

Полиморфизм локуса rs174570 гена FADS2 в древних популяциях Сибири

Анализ результатов генотипирования локуса rs174570, представленных в базе данных Allen Ancient DNA Resource, показывает, что в восточной части Евразии вариант rs174570-*T* издревле был самым частым (табл. 3 доп. материалов). Вариант rs174570-*C* зарегистрирован только в верхнепалеолитических образцах из Янской стоянки (~32 тыс. лет), которые, как установлено ранее [21], проявляли генетическое сходство с древним населением Западной Евразии, у которого уже 38–33 тыс. лет тому назад отмечались *C*-аллели по локусу rs174570 (стоянки Костёнки, Сунгирь). У древних жителей Северо-Восточной Сибири и Приморья в широком диапазоне времени присутствовал исключительно вариант rs174570-*T*, а на юго-востоке Сибири (территория примерно соответствует этническому ареалу бурят) частота этого варианта составляла 87.3%, причем первые случаи появления аллеля *C* наблюдаются примерно 5.5 тыс. лет назад (табл. 2). У древнего населения Юго-Западной Сибири (в участке, примерно соответствующем этническим ареалам современных алтайцев и тувинцев) частота варианта rs174570-*T* составляла 55.4% (табл. 2). Таким образом, результаты показывают, что в Восточной Сибири в древности преобладал вариант rs174570-*T*, а появление *C*-аллелей у населения Байкальского региона, по всей видимости, связано с проникновением на восток Сибири, начиная с эпохи энеолита, племен афанасьевской культуры, у которых частота варианта rs174570-*C* достигала 40% (по данным для афанасьевцев Алтая [22]).

Между тем на северо-востоке Сибири появление *C*-аллелей регистрируется поздно (не раньше 600 лет назад) и связано, по всей видимости, с периодом освоения Северо-Восточной Сибири восточноевропейским по происхождению населением, начиная с XVII в. и особенно интенсивно в советское время [23]. По данным базы

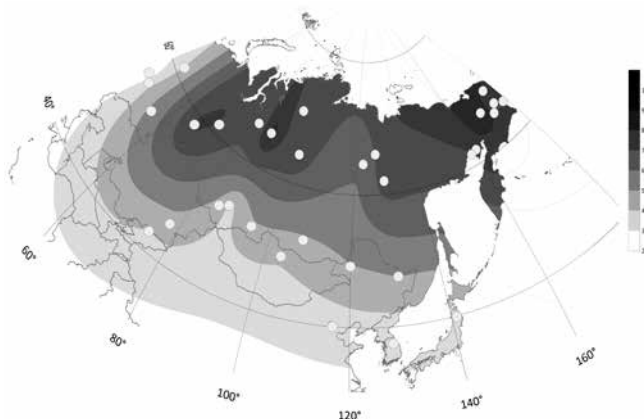


Рис. 1. Распространение варианта rs174570-*T* у населения Сибири. Белыми кружками на карте отмечены опорные точки (исследованные популяции). Сбоку показана шкала интервалов значений частоты варианта полиморфизма (в %).

ALFRED для восточных европейцев (как и русских, в частности) характерна высокая частота варианта rs174570-*C* — в среднем, 75%. Таким образом, основываясь на данных о распространении этого варианта в современных и древних популяциях Северо-Восточной Сибири (у эскимосов, чукчей, коряков и их предков), а также у пришлое восточноевропейского населения, принявшего участие в метисации с аборигенами Крайнего Севера, доля варианта rs174570-*C* у последних оценивается в 16.5%, а интенсивность генного потока составляет 1.5% на поколение. Вполне вероятно, что интенсивность генного потока еще выше, если считать, что исходная точка смешения коренных народов Северо-Восточной Сибири с пришлыми группами приходится лишь на XX в. [24]. Тогда она увеличивается до 4.4% на поколение. Для современного коренного населения Байкальского и Алтае-Саянского регионов оценить поток генов еще сложнее, поскольку приток *C*-аллелей осуществлялся в широком диапазоне времени и из разных популяционных источников. Необходимо отметить очень высокий прирост частоты варианта rs174570-*C* в Байкальском регионе — от менее 15% в промежутке от 8.8 до 0.6 тыс. лет назад до более 50% у современных бурят (табл. 1, 2).

Распределение гаплотипов по локусам rs174570, rs74771917 и rs7115739 в популяциях Сибири

Анализ полиморфизма локусов rs74771917 и rs7115739 показал отсутствие значимых различий в распределении аллелей в исследованных выборках чукчей, коряков, эвенов и бурят (табл. 4, 5 доп. материалов). Частота производных аллелей rs74771917-*T* и rs7115739-*T* в сибирских по-

Таблица 3. Частота гаплотипов по локусам rs174570, rs74771917 и rs7115739 в современных популяциях Сибири

Гаплотипы	Чукчи (<i>N</i> = 14)	Коряки (<i>N</i> = 96)	Эвены (<i>N</i> = 93)	Буряты (<i>N</i> = 112)
TCG	0.429	0.641	0.484	0.293
CCG	0.178	0.125	0.199	0.465
TTT	0.393	0.234	0.263	0.142
TCT	0	0	0.043	0.015
CCT	0	0	0.0055	0.048
TTG	0	0	0.0055	0.015
CTT	0	0	0	0.022

Таблица 4. Частота гаплотипов по локусам rs174570, rs74771917 и rs7115739 у древнего населения Сибири и Америки

Гаплотип	Юго-Восточная Сибирь, 1.9–8.8 тыс. лет назад (<i>N</i> = 39)	Северо-Восточная Сибирь, 0.6–9.8 тыс. лет назад (<i>N</i> = 22)	Америка, 0.3–3.9 тыс. лет назад (<i>N</i> = 14)
TTT	18.0	63.7	64.3
TTG	12.8	13.6	7.1
TCG	48.7	13.6	14.3
TCT	5.1	9.1	14.3
CTG	7.7	0	0
CCT	2.6	0	0
CCG	5.1	0	0

пуляциях (20–40%) находится на уровне частот, характерных для населения Восточной Азии (в среднем 25–29% по данным dbSNP). Поэтому более информативным для целей исследования представляется анализ распределения гаплотипов по локусам rs174570, rs74771917 и rs7115739, так как ранее было обнаружено, например, что у гренландских эскимосов частота гаплотипа TTT (как комбинации аллельных вариантов для указанных выше локусов) составляет почти 100% [2]. Анализ неравновесия по сцеплению между локусами rs174570, rs74771917 и rs7115739 в исследованных нами популяциях Сибири показал высокий уровень сцепления между вариантами полиморфизма, хотя наиболее значимые величины коэффициентов D' и r^2 наблюдались во всех популяциях для локусов rs74771917 и rs7115739 (табл. 6 доп. материалов).

В табл. 3 показано распределение гаплотипов по локусам rs174570, rs74771917 и rs7115739 у чукчей, коряков, эвенов и бурят. По распределению гаплотипов буряты статистически значимо отличаются от всех остальных, более северных выборок. У бурят более чем в два раза выше частота гаплотипа CCG и ниже частота гаплотипов TCG и TTT. У чукчей частота гаплотипа TTT достигает почти 40%, однако в сравнении с таковой для гренландских эскимосов (98%) она оказывается довольно умеренной, а у коряков частота гаплотипа TTT даже ниже, чем у эвенов. В табл. 4 показано распределение гаплотипов по локусам

rs174570, rs74771917 и rs7115739 у более древнего населения Сибири и прилегающих территорий Евразии и Америки. Как видно, в прошлом гаплотип TTT был самым частым (более 60%) как на северо-востоке Азии, так и в Америке, в то время как на юго-востоке Сибири (в Байкальском регионе) его частота почти не изменилась со временем. При сравнении современного и древнего населения Сибири заметно, что на северо-востоке Сибири уменьшилась частота гаплотипа TTT и выросла частота гаплотипа TCG, а также произошел приток аллеля rs174570-C в виде гаплотипа CCG (рис. 1,а доп. материалов). В Байкальском регионе в последние почти 2 тыс. лет наблюдались высокий прирост частоты гаплотипа CCG и снижение частоты гаплотипа TCG (рис. 1,б доп. материалов). Между тем у американских индейцев распространенность гаплотипа TTT осталась на высоком уровне (65–75%); в древних и современных популяциях сохраняется спектр гаплотипов, связанных с аллелем rs174570-T, хотя у современных индейских народов также наблюдается небольшой приток С-ассоциированных гаплотипов (рис. 2 доп. материалов).

Поскольку гаплотип TTT с высокой частотой был распространен в прошлом среди населения северо-восточной части Сибири и Америки, интересным представляется вопрос об истоках этого гаплотипа. Анализ данных о распределении гаплотипов по локусам rs174570, rs74771917

и rs7115739 в наиболее древних антропологических материалах (в диапазоне от 10 до 45 тыс. лет) показывает, что единичные случаи появления гаплотипа ТТТ наблюдаются у верхнепалеолитических европейцев (34 и 45 тыс. лет назад) (табл. 7 доп. материалов). Однако восточноазиатским источником этого гаплотипа, вероятнее всего, является Приамурье, где гаплотип ТТТ присутствовал еще 14–19 тыс. лет тому назад (табл. 7 доп. материалов). Более того, результаты палеогеномных исследований показали, что древнее население Приамурья стало, по всей видимости, основным генетическим источником в процессах заселения северо-востока Азии и формирования населения Берингии [25].

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что в современных популяциях коренного населения Сибири наблюдается увеличение частоты варианта rs174570-*T*, маркирующего гаплотип А, в направлении с юга на север Сибири – от около 50% у бурят, алтайцев и тувинцев до более 80% у эскимосов, чукчей и коряков. Однако у древнего населения восточной части Сибири частота варианта rs174570-*T* была еще выше (в диапазоне от более 80 до 100%), хотя на юго-западе Сибири частота этого варианта почти не изменилась на протяжении 5 тыс. лет. Таким образом, основные изменения генофондов населения Восточной Сибири обусловлены взаимодействием с популяциями, для которых характерны высокие частоты варианта rs174570-*C*. На северо-востоке Сибири это пришлое восточноевропейское по происхождению население, которое примерно с XVII в. начали осваивать Северную Сибирь, но основной период межэтнических контактов приходится, по всей видимости, на советское время [23, 24]. В результате частота варианта rs174570-*C* у современных эскимосов, чукчей и коряков достигает в среднем 16.5%. Насколько это полезное приобретение и способствует ли оно увеличению репродуктивного успеха (как предполагается в случае европейцев [11]), пока неизвестно. Примечательно, что у бурят также наблюдаются повышенные в сравнении с древним населением Байкальского региона частоты варианта rs174570-*C*, однако в этом случае, по всей видимости, прирост частоты этого аллеля связан с более широким кругом контактов с индо-европейскими народами, начиная с эпохи энеолита и бронзового века.

Интересны также результаты анализа распределения гаплотипов, сформированных вариан-

тами полиморфизма локусов rs174570, rs74771917 и rs7115739 у современного и древнего населения Восточной Азии и Америки. Как на северо-востоке Сибири, так и в Байкальском регионе приток варианта rs174570-*C* в популяции связан лишь с одним гаплотипом ССG. Гаплотип ТТТ, который рассматривался как адаптивный вариант полиморфизма у гренландских эскимосов [2], имеет, согласно палеогеномным данным, верхнепалеолитическое происхождение. Присутствие этого гаплотипа примерно 14–19 тыс. лет тому назад у населения Приамурья согласуется с гипотезой о том, что древние жители этого региона принимали участие в формировании населения Берингии, давшего начало американским индейцам [25].

Авторы заявляют, что все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00264, <https://rscf.ru/project/22-24-00264/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ameur A., Enroth S., Johansson A. et al. Genetic adaptation of fatty-acid metabolism: A human specific haplotype increasing the biosynthesis of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids // *Am. J. Hum. Genet.* 2012. V. 90. P. 809–820. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.014>
2. Fumagalli M., Moltke I., Grarup N. et al. Greenlandic Inuit show genetic signatures of diet and climate adaptation // *Science*. 2015. V. 349. P. 1343–1347. <https://doi.org/10.1126/science.aab2319>
3. Kothapalli K.S.D., Ye K., Gadgil M.S. et al. Positive selection on a regulatory insertion-deletion polymorphism in FADS2 influences apparent endogenous synthesis of arachidonic acid // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1726–1739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw049>
4. Amorim C.E., Nunes K., Meyer D. et al. Genetic signature of natural selection in first Americans // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 2195–2199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620541114>

5. Harris D.H., Ruczinski I., Yanek L.R. et al. Evolution of hominin polyunsaturated fatty acid metabolism: from Africa to the New World // *Genome Biol. Evol.* 2019. V. 11. P. 1417–1430. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz071>
6. Малярчук Б.А., Деренко М.В., Денисова Г.А. Адаптивные изменения генов десатурации жирных кислот у коренного населения Северо-Востока Сибири // *Генетика*. 2021. Т. 57. № 12. С. 1458–1464. <https://doi.org/10.31857/S0016675821120109>
7. Mathieson I. Limited evidence for selection at the FADS locus in Native American populations // *Mol. Biol. Evol.* 2020. V. 37. P. 2029–2033. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa064>
8. Mathieson S., Mathieson I. FADS1 and the timing of human adaptation to agriculture // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 2957–2970. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy180>
9. Ye K., Gao F., Wang D. et al. Dietary adaptation of FADS genes in Europe varied across time and geography // *Nat. Ecol. Evol.* 2017. V. 1. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0167>
10. Mathieson I., Lazaridis I., Rohland N. et al. Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians // *Nature*. 2015. V. 528. P. 499–503. <https://doi.org/10.1038/nature16152>
11. Mathieson I., Day F.R., Barban N. et al. Genome-wide analysis identifies genetic effects on reproductive success and ongoing natural selection at the FADS locus // *Nat. Hum. Behav.* 2023. V. 7. P. 790–801. <https://doi.org/10.1038/s41562-023-01528-6>
12. Voruganti V.S., Higgins P.B., Ebbesson S.O. et al. Variants in CPT1A, FADS1, and FADS2 are associated with higher levels of estimated plasma and erythrocyte Delta-5 desaturases in Alaskan Eskimos // *Front. Genet.* 2012. V. 3. P. 86. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00086>
13. Hsieh P., Hallmark B., Watkins J. et al. Exome sequencing provides evidence of polygenic adaptation to a fat-rich animal diet in indigenous Siberian populations // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. P. 2913–2926. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx226>
14. Малярчук Б.А., Деренко М.В. Полиморфизм генов метаболизма полиненасыщенных жирных кислот (FADS1 и FADS2) у коренного населения Сибири // *Вестник Северо-Восточного научного центра ДВО РАН*. 2018. № 3. С. 106–111.
15. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T. et al. Primer3 – new capabilities and interfaces // *Nucl. Acids Research*. 2012. V. 40. P. e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
16. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. P. 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
17. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. P. 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
18. Cardona A., Pagani L., Antao T. et al. Genome-wide analysis of cold adaption in indigenous Siberian populations // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e98076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098076>
19. Животовский Л.А. Генетика природных популяций. Йошкар-Ола: Типография «Вертикаль», 2021. 600 с.
20. Zhou S., Xie P., Quobion A. et al. Genetic architecture and adaptations of Nunavik Inuit // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. V. 116. P. 16012–16017. <https://doi.org/10.1073/pnas.181038811625>
21. Sikora M., Pitulko V., Sousa V. et al. The population history of northeastern Siberia since the Pleistocene // *Nature*. 2019. V. 570. P. 182–188. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1279-z>
22. Narasimhan V.M., Patterson N., Moorjani P. et al. The formation of human populations in South and Central Asia // *Science*. 2019. V. 365. <https://doi.org/10.1126/science.aat7487>
23. Народы Северо-Востока Сибири. Под ред. Батяновой Е.П., Тураева В.А. М.: Наука, 2010. 773 с.
24. Балановская Е.В., Богунов Ю.В., Богунова А.А. и др. Демографический портрет коряков севера Камчатки // *Вестник Московского университета. Серия XXIII. Антропология*. 2020. № 4. С. 111–122. <https://doi.org/10.32521/2074-8132.2020.4.111-122>
25. Mao X., Zhang H., Qiao S. et al. The deep population history of northern East Asia from the Late Pleistocene to the Holocene // *Cell*. 2021. V. 184. P. 3256–3266.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.040>

FADS GENE POLYMORPHISM AND THE HISTORY OF THE FORMATION OF THE INDIGENOUS POPULATIONS OF SIBERIA

B. A. Malyarchuk^{1, *}, M. V. Derenko¹, G. A. Denisova¹, A. N. Litvinov¹, I. K. Dambueva¹

¹*Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia*

**e-mail: malyarchuk@ibpn.ru*

The polymorphism of the rs174570, rs74771917, and rs7115739 *FADS*-gene loci in Siberian populations was studied. It was shown that the frequency of the rs174570-*T* variant marking haplotype A with a reduced level of fatty acid desaturase expression in the modern indigenous populations increases in the direction from the south to the north of Siberia. Similarly, an increase in the frequency of the TTT haplotype at the rs174570, rs74771917, and rs7115739 loci was observed in the northern direction. However, in ancient times, the populations of Eastern Siberia (its northeastern part, Baikal region, and Primorye) were characterized by an equally high frequency of the rs174570-*T* variant (over 80%). It was shown that the main influx of the rs174570-*C* allele (and the CCG haplotype) to northeast Siberia occurred relatively recently, over the past 300 years, as a result of mating contacts between indigenous populations and immigrant groups of predominantly eastern European origin. The gene flow intensity (for the rs174570-*C* allele) is estimated to be 1.5-4.4% per generation. The appearance of the rs174570-*C* variant in the population of the Baikal region has been registered since the Eneolithic epoch, which is apparently associated mainly with the advance of the Afanasievo culture tribes to the east of Siberia. Meanwhile, analysis of paleogenomic data showed that the TTT haplotype, with high frequency distributed in modern Eskimos and Amerindians, was present in the upper Paleolithic population of the Amur region, and therefore its carriers apparently took part in the formation of the ancient Beringian population.

Keywords: FADS genes, human populations, gene pool, adaptation of populations, Siberia.

УДК 575

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ КЛИНИЧЕСКОГО ТИПА У ПАЦИЕНТОВ С НЕЙРОФИБРОМАТОЗОМ 2-ГО ТИПА

© 2024 г. К. О. Карандашева¹, Е. С. Макашова^{2,3}, Ф. А. Агеева¹, К. И. Аношкин¹,
П. А. Спарбер¹, А. О. Боровиков¹, П. А. Васильев¹, М. С. Пашенко¹, А. С. Танас¹,
В. В. Стрельников^{1,*}

¹ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, Москва, 125047 Россия

³ Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова, Москва, 111123 Россия

*e-mail: vstrel@list.ru

Поступила в редакцию 12.09.2023 г.

После доработки 22.09.2023 г.

Принята к публикации 26.09.2023 г.

Нейрофиброматоз 2-го типа — наследственное заболевание, предрасполагающее к развитию множественных опухолей центральной и периферической нервной системы. Заболевание характеризуется значительной вариабельностью клинической картины; количество новообразований, их локализация и скорость роста во многом определяют тяжесть течения. Однако оценка скорости опухолевого роста предполагает наличие последовательного ряда инструментальных исследований, проведенных в определенном диапазоне времени, что не всегда доступно на момент первичного обращения. В настоящем исследовании на основании количественных (возраст дебюта, возраст осмотра) и качественных (большое количество интракраниальных опухолей, большое количество спинальных опухолей, тяжесть неврологической симптоматики, мозаичный статус генетического варианта) характеристик была разработана альтернативная классификация клинических подтипов нейрофиброматоза 2-го типа. Наличие статистически значимых различий (p -value = 0.037) в представленности прогностических классов по Halliday между группами, выделенными при помощи предложенной классификации, позволяет сделать заключение о возможности интеграции данного подхода в клиническую практику.

Ключевые слова: нейрофиброматоз 2-го типа, NF2, клинико-генетические корреляции.

DOI: 10.31857/S0016675824020087 **EDN:** DQQBCD

Поиск предиктивных маркеров является одним из основных направлений персонализированной медицины. При нейрофиброматозе 2-го типа (OMIM #101000), генетическом заболевании, предрасполагающего к развитию множественных опухолей центральной и периферической нервной системы, значительный интерес представляют исследования, направленные на описание клинических подтипов и поиск корреляций между ними и типом каузальной мутации [1].

Устоявшейся классификацией нейрофиброматоза 2-го типа стало разделение на клинические подтипы Wishart (тяжелый) и Gardner (умеренно-тяжелый), предложенное R. Eldridge и соавт. в 1991 году [2]. В 1992 году D. Evans с соавт. уточнили характеристики обоих подтипов: клинический дебют до 30 лет и множественные (>2) интракраниальные или спинальные опухоли характерны для более тяжелого течения заболева-

ния, в то время как умеренно-тяжелый подтип ассоциирован с более поздним появлением вестибулярных шванном (после 15 лет) и меньшей опухолевой нагрузкой (не более одной менингиомы или спинальной опухоли) [3].

Альтернативная классификация дополнительно включает подтип Lee-Abbott — наиболее тяжелый и редкий вариант течения заболевания, характеризуемый вариабельным возрастом клинического дебюта, потерей слуха, катарактой, а также менингиоматозом головного и спинного мозга [4]. Однако так как ранние исследования показали отсутствие статистически значимых различий между клиническим течением подтипов Wishart и Lee-Abbott данная классификация является наименее популярной и употребляемой [5].

В 1996 г. M.H. Ruttledge и соавт. показали статистически значимую ассоциацию мутаций,

приводящих к преждевременной терминации трансляции в гене *NF2*, с более тяжелым течением заболевания [6]. Это исследование имело революционный характер, так как продемонстрировало существование клиничко-генетических корреляций для нейрофиброматоза 2-го типа и заложило базис для серии работ, посвященных уточнению закономерностей, связывающих тип мутации с клиническими проявлениями заболевания.

Так, было показано, что мутации в канонических сайтах сплайсинга экзонов 1–5 приводят к более тяжелому клиническому течению в сравнении с мутациями сплайсинга в экзонах 11–15 [7]. При соматическом мозаицизме отмечено более легкое течение заболевания в сравнении с герминальными мутациями того же типа [8]. Протяженные делеции, захватывающие промотор или экзон 1, дают более мягкий фенотип в сравнении с теми, которые не включают данный участок [9].

В 2017 г. D. Halliday и соавт. обобщили известные клиничко-генетические корреляции при нейрофиброматозе 2-го типа и представили прогностическую шкалу, позволяющую предсказывать тяжесть течения заболевания в зависимости от типа мутации, ее положения в транскрипте и доли мутантных клеток в организме [10]. В настоящий момент ведутся исследования, направленные на оценку прогностической силы данной шкалы и возможность ее интеграции в клиническую практику [11].

Необходимо отметить, что в настоящий момент отсутствуют четкие критерии, позволяющие однозначно определить клинический подтип. Характеристики, описанные D. Evans с соавт., не могут быть использованы в современной клинической практике в качестве критериев классификации, так как с появлением магнитно-резонансной томографии (МРТ) высокого разрешения и других методов детальной нейровизуализации возросла выявляемость экстрамедуллярных новообразований малого размера, что увеличивает количество опухолей, выявляемых у пациентов с умеренно-тяжелым течением нейрофиброматоза 2-го типа [12].

В современном представлении скорость роста опухолей и скорость нарастания тяжести неврологического дефицита точнее характеризуют клинический подтип, чем общее количество опухолей [13]. Однако так как оценка скорости

опухолевого роста изначально предполагает проведение последовательного ряда инструментальных исследований в определенном диапазоне времени по-прежнему существует необходимость в методе, позволяющем спрогнозировать скорость нарастания симптоматики и определить тактику лечения и наблюдения.

В настоящий момент также остаются открытыми вопросы классификации фенотипов при нейрофиброматозе 2-го типа и прогностической силы известных клиничко-генетических корреляций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемая выборка

Когорту исследования составили пациенты с клиническим диагнозом нейрофиброматоз 2-го типа ($n = 98$), установленным в соответствии с клиническими критериями Baser [14] или Манчестерскими диагностическими критериями [15].

Для молекулярно-генетической диагностики пробандов и их родителей использовали геномную ДНК, выделенную стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из лейкоцитарной фракции периферической венозной крови или биоптатов опухолевого материала, фиксированных в формалине и заключенных в парафиновые блоки (FFPE).

Поиск точковых мутаций

Для поиска точковых мутаций использовали высокопроизводительное-параллельное секвенирование на приборах Ion PGM и Ion S5 (Life Technologies, USA) и технологию таргетного обогащения IonAmpliSeq (Life Technologies, USA). Панель праймеров включала экзоны генов *NF2*, *SMARCB1*, *LZTR1*, *NF1*, *SPRED1*, а также прилежащие к ним участки интронов (до 50 пн). Дизайн панели праймеров был разработан при помощи программного обеспечения AmpliSeqDesigner (Life Technologies).

Биоинформатический анализ данных высокопроизводительного параллельного секвенирования осуществляли при помощи программного обеспечения TorrentSuite (версия 5.12) в составе TorrentBaseCaller (TBC), TorrentMappingAlignmentProgram (TMAP) и TorrentVariantCaller (TVC) с настройками, рекомендуемыми производителем программного обеспечения (Life Technologies), а также соб-

ственного программного обеспечения AmpliSep [16]. Для функциональной аннотации генетических вариантов использовали программное обеспечение ANNOVAR. Патогенность выявленных генетических вариантов интерпретировали в соответствии с руководством по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) [17], и рекомендациями ACMG [18].

В случаях выявления вероятно-патогенного генетического варианта, не описанного в базах данных (ClinVar, LOVD, HGMD), проводили анализ сегрегации мутации в семье.

При $AF < 0.35$ генетический вариант интерпретировали как мозаичный.

Поиск протяженных делеций

Поиск протяженных делеций осуществляли методом мультиплексной лигаза-зависимой амплификации зондов (MLPA) набором SALSA MLPA Probemix P044 (MRC Holland, Netherlands) в соответствии с протоколом производителя.

Клинические характеристики

Для диагностики интракраниальных и экстракраниальных опухолей пациентам с подтвержденным молекулярно-генетическим диагнозом ($n = 64$) выполняли МРТ головного мозга ($n = 64$) и спинного мозга по всей длине ($n = 53$) в стандартных режимах T1, T2, T2 FLAIR с контрастным усилением. Пациентам с нарастанием двигательного и чувствительного дефицита, обусловленного поражением пояснично-кре-

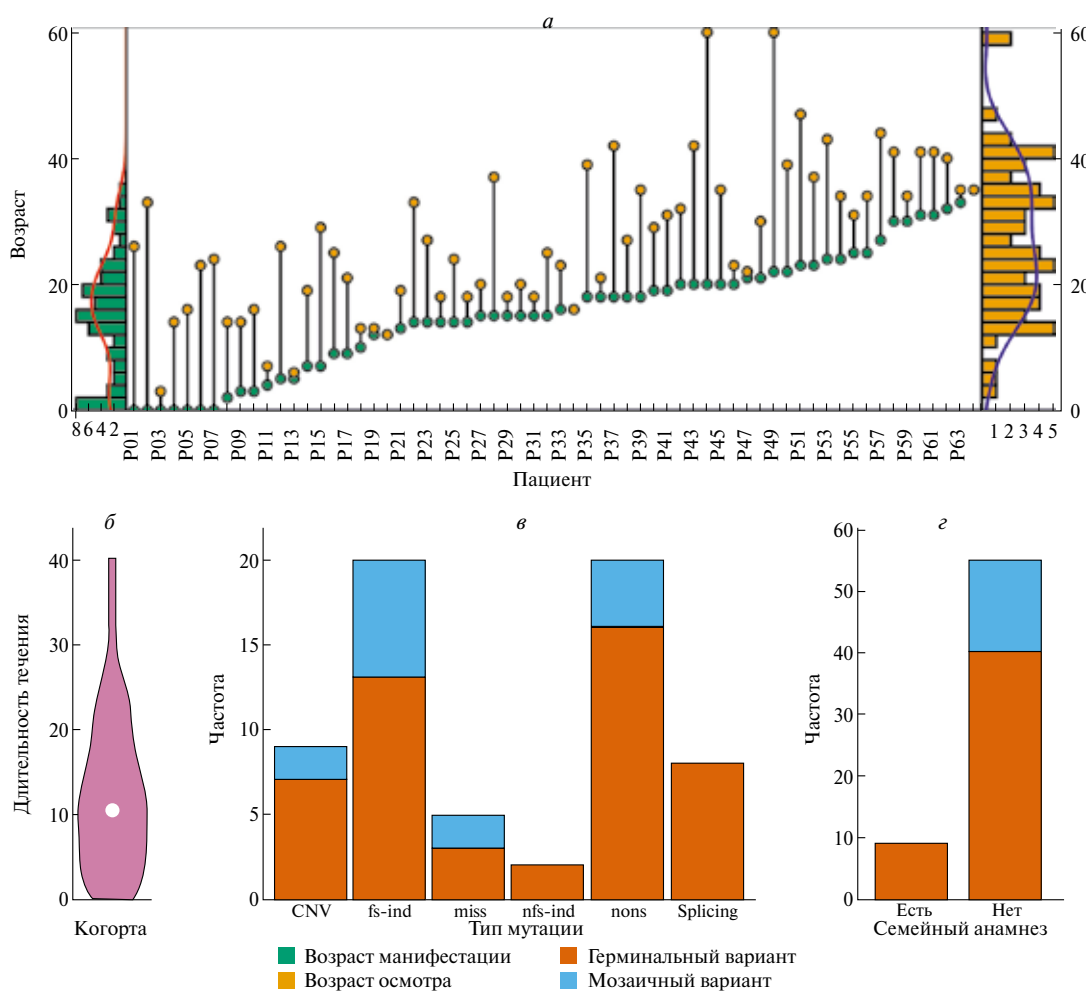


Рис. 1. Возрастная характеристика исследуемой выборки и результаты молекулярно-генетического тестирования. *a* – распределение возраста клинического дебюта (зеленым) и возраста на момент осмотра (желтым) в исследуемой выборке, длина сегмента соответствует длительности течения заболевания; *б* – плотность распределения длительности течения заболевания; *в* – частота встречаемости различных типов мутации в исследуемой выборке, включая герминальные (оранжевым) и мозаичные (синим) генетические варианты; *з* – частота семейных и спорадических случаев, включая герминальные (оранжевым) и мозаичные (синим) генетические варианты.

стцового или плечевого сплетений, проводили ультразвуковое исследование или МРТ соответствующего нервного сплетения ($n = 12$).

При наличии более 10 интракраниальных и более 10 спинальных новообразований опухольный процесс считали распространенным. Тяжелый неврологический статус присваивали пациентам с множественным поражением черепных и периферических нервов и наличием грубых мышечных атрофий, в остальных случаях неврологический статус оценивали как умеренно-тяжелый.

Семейный анамнез пациентов старше 18 лет собирали со слов пациентов, при наличии клинических проявлений нейрофиброматоза 2-го типа у родителей семейный характер заболевания подтверждали методами молекулярно-генетической диагностики ($n = 9$). Также во всех семьях, где родители пробанда не достигли возраста 40 лет, проводили анализ сегрегации мутации в семье с целью выявления семейных случаев заболевания вне зависимости от наличия клинических признаков нейрофиброматоза 2-го типа у родителей пробанда ($n = 12$).

Статистический анализ

Статистический анализ и визуализация данных выполнены средствами языка программирования R с использованием пакетов FactoMineR [19], missMDA [20], factoextra [21], ggplot2 [22], ggpubr [23].

Для проверки на нормальность распределения случайной величины использовали критерий Шапиро–Уилка. Для описательной статистики нормально распределенных величин в качестве меры центральной тенденции использовали среднее арифметическое и стандартное отклонение, для распределений отличных от нормально-го — медиану и интерквартильный размах.

В качестве метода уменьшения размерности многомерных клинических данных применяли факторный анализ смешанных данных (FAMD) с применением регуляризованного итеративного алгоритма импутации данных (функция `imputeFAMD` пакета `missMDA`). Для анализа таблиц сопряженности использовали точный тест Фишера. Для сравнения двух независимых выборок использовали p -критерий Стьюдента или U -критерий Манна–Уитни, для сравнения нескольких — однофакторный дисперсионный анализ и H -критерий Краскела–Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективность молекулярно-генетического тестирования составила 65.3% (64/98). В исследуемую выборку вошло 64 пациента с клиническим диагнозом нейрофиброматоз 2-го типа, подтвержденным методами ДНК-диагностики. Когорта исследования состояла из 24 мужчин и 40 женщин в возрасте от 3 до 60 лет. Средний возраст на момент осмотра составил 27.7 ± 11.9 лет.

Возраст клинического дебюта находился в диапазоне от 0 (признаки нейрофиброматоза 2-го типа наблюдались с рождения) до 35 лет (MED = 15.5; IQR = 12.3) (рис. 1,а). Длительность течения заболевания к моменту осмотра составила от 0 до 40 лет (MED = 10.5; IQR = 13.0) (рис. 1,б).

Для всех пациентов исследуемой выборки было получено молекулярно-генетическое подтверждение клинического диагноза — выявлена патогенная ($n = 57$) или вероятно-патогенная ($n = 7$) мутация в гене *NF2*. Мутационный спектр был представлен изменениями копийности участков ДНК ($n = 9$), а также точковыми генетическими вариантами ($n = 55$): нонсенс-мутациями ($n = 20$), инделами со сдвигом рамки считывания ($n = 20$), мутациями сплайсинга ($n = 8$), миссенс-мутациями ($n = 5$) и инделами без сдвига рамки считывания ($n = 2$) (рис. 1,в). Для всех мутаций был определен прогностический класс тяжести течения заболевания по шкале D. Halliday и соавт. [10]. Для 15 пациентов был установлен мозаичный статус каузальной мутации. Доля соматического мозаицизма в исследуемой когорте составила 23.4% от всей выборки (15/64) и 27.2% от предполагаемого числа спорадических случаев (15/55). Девять случаев являлись семейными (рис. 1,г). Список выявленных генетических вариантов и их соматический статус представлены в табл. 1.

Так как для большинства пациентов отсутствовали данные, позволяющие объективно оценить скорость прогрессии заболевания, достоверно определить клинический подтип (Wishart/Gardner) не представлялось возможным.

При манифестации заболевания до достижения пациентом возраста 25 лет, клинический дебют оценивали как “ранний” ($n = 54$), в остальных случаях — “поздний” ($n = 10$).

Для пациентов с герминальной мутацией ($n = 49$) спектры генетических вариантов при

Таблица 1. Патогенные (П) и вероятно-патогенные (ВП) генетические варианты, выявленные в исследуемой выборке

ID	Мозаицизм	Генетический вариант	Класс по Halliday	Пат.	ID	Мозаицизм	Генетический вариант	Класс по Halliday	Пат.
P01	—	c.C260G:p.S87X (экзон 3)	3	П	P34	—	c.884delT:p.L295fs (экзон 9)	3	П
P02	—	c.675+1G>A (экзон 7)	2B	П	P35	+	Делеция экзонов 1–3	2A	П
P03	—	c.G1114T:p.E372X (экзон 11)	3	П	P36	+	c.C784T:p.R262X (экзон 8)	2B	П
P04	—	c.349_351del:p.117_117del (экзон 3)	2A	П	P37	—	c.999+1G>A (экзон 10)	2A	П
P05	—	c.161dupT:p.L54fs (экзон 2)	3	П	P38	+	c.1227dupG:p.Q410fs (экзон 12)	2B	П
P06	—	c.655G>A:p.V219M (экзон 16)	2A	ВП	P39	—	c.241-9A>G (экзон 3)	2B	ВП
P07	—	c.C586T:p.R196X (экзон 6)	3	П	P40	—	c.676-1G>T (экзон 8)	2A	П
P08	—	c.C1606T:p.Q536X (экзон 15)	2B	П	P41	—	c.810dupG:p.E270fs (экзон 8)	3	П
P09	—	c.172_179del:p.R57fs (экзон 2)	3	П	P42	+	c.1503_1504insGGTGACA:p.1501fs (экзон 14)	2A	П
P10	—	Делеция экзона 1	2A	П	P43	+	c.G1340C:p.R447T (экзон 12)	2A	ВП
P11	—	Делеция экзона 7	2B	П	P44	+	c.811delT:p.F271fs (экзон 9)	2B	П
P12	—	c.70delG:p.V24X (экзон 1)	2A	П	P45	+	c.C586T:p.R196X (экзон 6)	2B	П
P13	—	c.949_962del:p.E317fs (экзон 10)	3	П	P46	—	c.1123-2A>G (экзон 12)	2A	П
P14	—	c.447G>A (экзон 4)	2B	П	P47	—	c.1447delC:p.P483fs (экзон 14)	2B	П
P15	—	c.C198G:p.Y66X (экзон 2)	3	П	P48	—	c.C1009T:p.Q337X (экзон 11)	3	П
P16	—	c.C863G:p.S288X (экзон 9)	3	П	P49	+	c.995_999del:p.K332fs (экзон 10)	2B	П
P17	—	c.757dupA:p.P252fs (экзон 8)	3	П	P50	—	Делеция экзонов 5–6	2B	П
P18	—	Делеция экзона 4	2B	П	P51	—	c.C361T:p.Q121X (экзон 3)	3	П
P19	—	Делеция экзона 1	2A	П	P52	—	c.C592T:p.R198X (экзон 6)	3	П
P20	—	c.934delA:p.K312fs (экзон 10)	3	П	P53	+	c.1580delA:p.E527fs (экзон 15)	2A	П
P21	—	c.C169T:p.R57X (экзон 2)	3	П	P54	—	c.33delC:p.F11fs (экзон 1)	2A	П
P22	—	Делеция экзонов 11–17	2B	П	P55	+	c.C592T:p.R198X (экзон 6)	2B	П
P23	—	c.374_381del:p.Q125fs (экзон 4)	3	П	P56	—	c.346_348del:p.116_116del (экзон 3)	2A	ВП
P24	—	c.C193T:p.Q65X (экзон 2)	3	П	P57	—	Делеция экзонов 5–17	2B	П
P25	—	c.C432G:p.Y144X (экзон 4)	3	П	P58	+	Делеция экзонов 15–16	2B	П
P26	—	c.781delA:p.I261fs (экзон 8)	3	П	P59	—	c.363+1G>A (экзон 3)	2B	П
P27	—	c.1058delG:p.R353fs (экзон 11)	3	П	P60	—	c.G1340A:p.R447K (экзон 12)	2A	ВП
P28	+	c.1015_1018del:p.L339fs (экзон 11)	2B	П	P61	+	c.C592T:p.R198X (экзон 6)	2B	П
P29	—	c.C784T:p.R262X (экзон 8)	3	П	P62	—	c.447G>A (экзон 4)	2B	П
P30	—	c.459delinsTG:p.D154X (экзон 5)	3	П	P63	+	c.T896C:p.L299P (экзон 10)	2A	ВП
P31	—	c.1502dupT:p.I501fs (экзон 14)	2B	П	P64	—	c.T896C:p.L299P (экзон 10)	2A	ВП
P32	+	c.519_522del:p.V173fs (экзон 6)	2B	П	Примечание. Столбец ID соответствует персональному идентификатору пациента, в столбце Мозаицизм уточнен мозаичный (+) или герминальный (–) статус генетического варианта. Все точковые мутации указаны в номенклатуре транскрипта NM_000268.				
P33	—	c.G268T:p.E90X (экзон 3)	3	П					

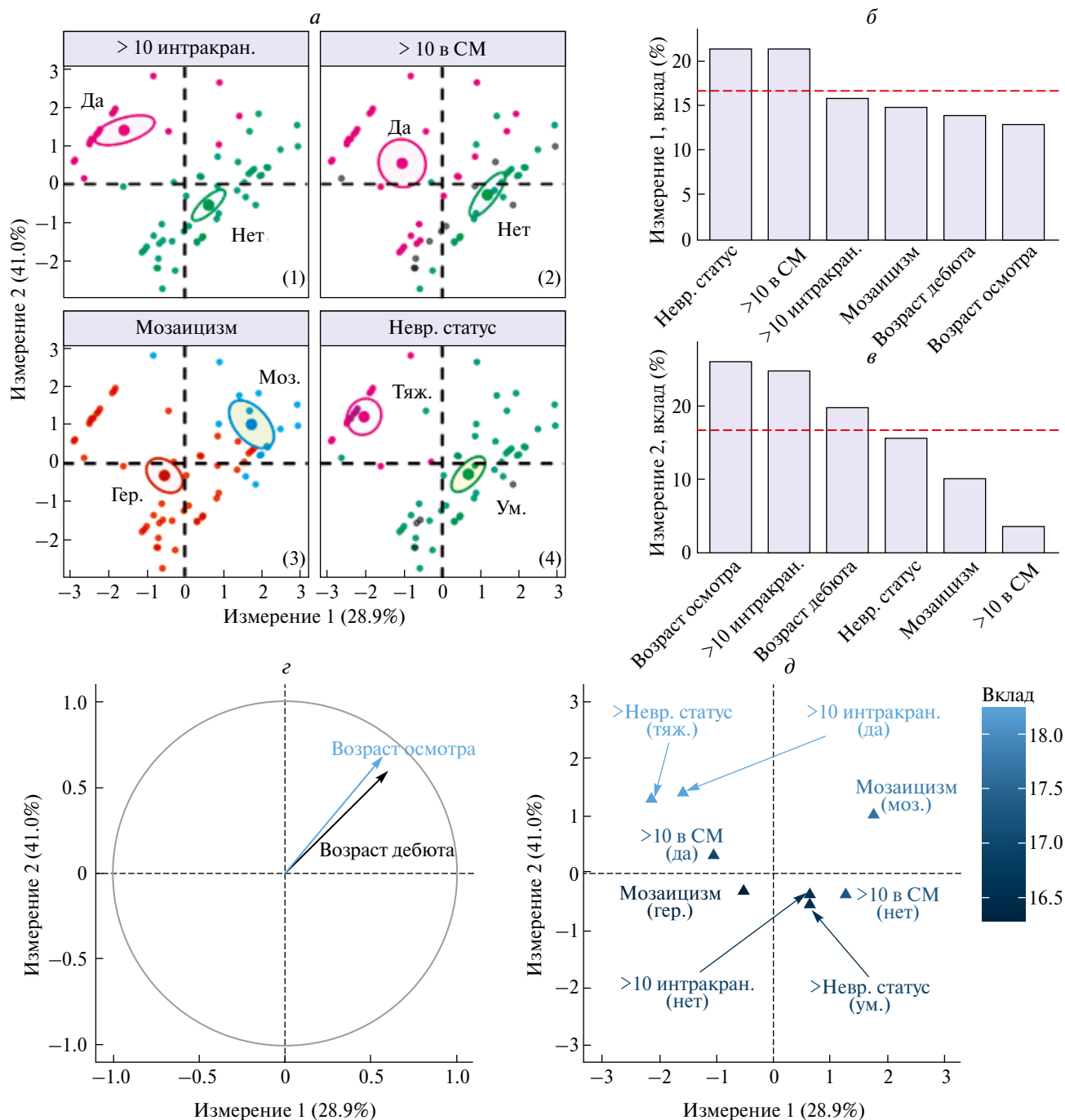


Рис. 2. FAMD клинических особенностей выборки (возраст дебюта, возраст на момент осмотра, тяжесть неврологической симптоматики, наличие более 10 интракраниальных опухолей, наличие более 10 опухолей в спинном мозге (СМ), представленность мутации в организме). *а* – каждая точка соответствует пациенту, отдельные панели характеризуют выборку (1) по наличию более 10 интракраниальных опухолей, выборку (2) – по наличию более 10 опухолей в спинном мозге, (3) – по представленности патогенного аллеля в организме, (4) – по тяжести неврологического статуса. Серые точки соответствуют отсутствию информации по конкретному признаку; *б, в* – вклад исследуемых признаков в измерения 1 и 2; *г, д*, – положение признаков в координатах проекции.

раннем и позднем клиническом дебюте имели статистически значимые различия (p -value = 0.003). Однако зависимости между непосредственно возрастом клинического дебюта и типом мутации или эффектом, оказываемым мута-

цией на транскрипт, выявлено не было (p -value = 0.58 и 0.38 соответственно). Кроме того, так как при разделении пациентов на группы с умеренно-выраженным ($n = 45$) и тяжелым ($n = 15$) неврологическим статусом и сравнении возраста

манифестации данных групп не выявлено статистически значимых различий ($p\text{-value} = 0.13$), было принято решение о разработке альтернативной клинической классификации.

В качестве критериев клинической классификации использовали характеристики: 1) количественные (возраст дебюта, возраст осмотра) и 2) качественные (большое количество интракраниальных опухолей (10 и более), большое количество спинальных опухолей (10 и более), тяжесть неврологического статуса (умеренно-выраженная или тяжелая), статус генетического варианта (герминальный или мозаичный)). В качестве метода уменьшения размерности применяли факторный анализ смешанных данных (FAMD) (рис. 2).

Вне зависимости от особенностей клинического течения пациенты с мозаичными мутациями имели более поздний возраст клинического дебюта, чем пациенты с герминальными генети-

ческими вариантами ($p\text{-value} = 0.002$). Несмотря на то что пациенты с мозаичными мутациями реже характеризовались тяжелым неврологическим дефицитом, это наблюдение не является статистически значимым ($p\text{-value} = 0.16$).

На основании распространенности опухолевого процесса было выделено три группы пациентов. Пациенты группы 1 характеризовались большим количеством (≥ 10) и интракраниальных, и спинальных опухолей ($n = 15$). К группе 2 относили пациентов с большим количеством (≥ 10) или интракраниальных, или спинальных опухолей ($n = 16$). Пациентов группы 3 определяло отсутствие большого количества опухолей и интракраниально, и в спинном мозге ($n = 22$). Часть пациентов не удалось отнести к определенной группе по причине отсутствия части клинических данных ($n = 11$) (рис. 3, а, табл. 2).

Абсолютное большинство пациентов с тяжелым неврологическим статусом относилось

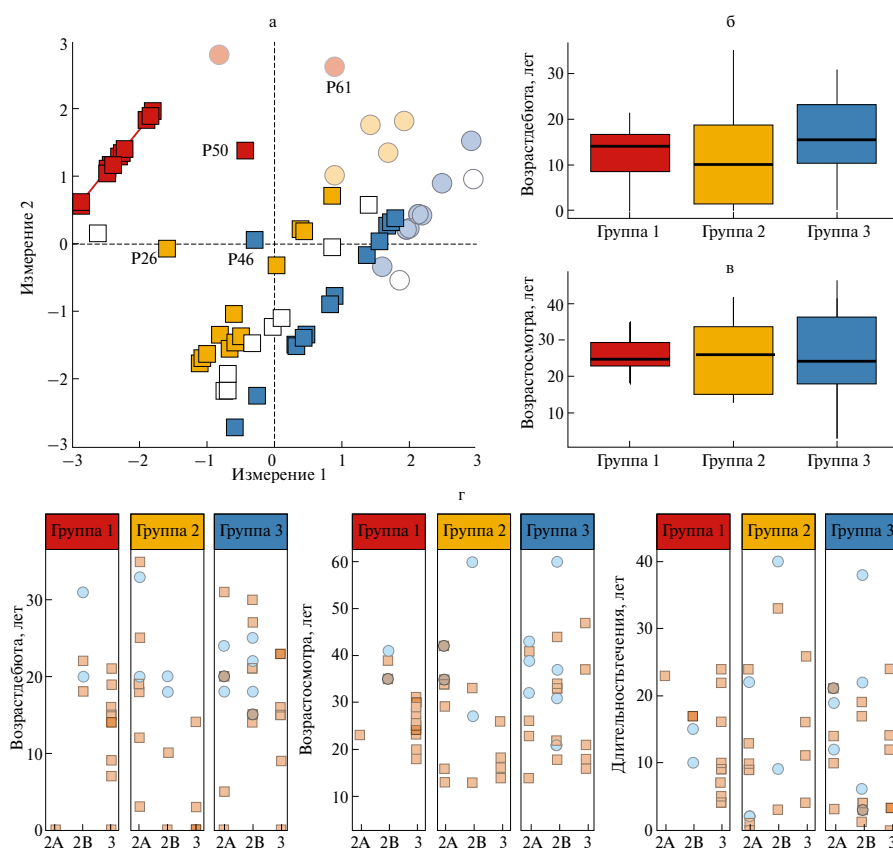


Рис. 3. Сравнение выделенных групп распространенности опухолевого процесса. *а* – FAMD клинических особенностей выборки. Красный цвет соответствует группе 1, желтый – группе 2, синий – группе 3. Квадратная форма маркера соответствует пациенту с герминальной мутацией, круглая – с мозаичной; *б* – распределение возраста дебюта в выделенных группах; *в* – распределение возраста осмотра в выделенных группах; *г* – возраст клинического дебюта, возраст осмотра, длительность течения заболевания для различных категорий по Halliday в выделенных группах. Оранжевый квадратный маркер соответствует герминальным вариантам, синий круглый – мозаичным.

к группе 1 (p -value = $2.4e-08$), за исключением двух (ID: P25, P46). Также неврологический статус двух пациентов из группы 1 (ID: P50, P61) был определен как умеренно-выраженный, несмотря на высокую опухолевую нагрузку.

Примечательно, что между пациентами вышеперечисленных групп с герминальными мутациями отсутствуют статистически значимые различия по возрасту клинического дебюта (p -value = 0.31), возрасту на момент осмотра (p -value = 0.82) или продолжительности течения заболевания (p -value = 0.71). Среди подтвержденных семейных случаев, два пациента были отнесены к группе 1, четыре пациента – к группе 3, при этом возраст клинического дебюта варьировал от 0 до 31 года (MED = 13). Данные наблюдения позволяют предположить наличие генетического модификатора, определяющего разницу в тяжести течения заболевания пациентов одинаковых возрастных групп (рис. 3,б, в).

Выявлены статистически значимые различия по представленности прогностических классов по Halliday между выделенными группами (p -value = 0.037). Большинство мутаций в группе 1 относились к прогностическому классу “3” по Halliday, ассоциированному с наиболее тяжелым течением заболевания ($n = 10$), в то же время у пациентов с мутациями класса “2В” ($n = 4$) от-

мечалось более позднее начало заболевания, а у одного пациента была выявлена мутация класса “2А” – точковая мутация p.V219M (P06). В группе 3 необходимо отметить взрослых пациентов – носителей мутации, относящихся к прогностическому классу “3” по Halliday: p.Q121X (P51) и p.R198X (P52), возраст на момент осмотра 47 и 37 лет соответственно (рис. 3,г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было проведено исследование когорты пациентов с нейрофиброматозом 2-го типа, состоящей из 64 пробандов. Распределение возраста клинического дебюта, смещенное в сторону относительно ранней манифестации (MED = 15.5), позволяет предположить, что выборку преимущественно составили пациенты с тяжелым клиническим подтипом. Данное замечание предупреждает о необходимости соблюдения осторожности при экстраполяции закономерностей, выявленных в данной работе, на генеральную совокупность пациентов с данным диагнозом.

С точки зрения клинической практики значительный интерес представляют пациенты, у которых клинический дебют заболевания произошёл в младенческом или раннем детском возрасте ($n = 10$). В некоторых случаях ранний дебют осложняет диагностический поиск. На-

Таблица 2. Характеристика выборки и выделенных клинических групп распространенности опухолевого процесса

Показатель	Всего	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p -value
N	64	15	16	22	–
Пол (муж./жен.)	24/40	7/8	6/10	5/17	0.31
Возраст дебюта, лет	0–35 MED = 15.5 IQR = 12.3	0–31 MED = 15 IQR = 8	0–35 MED = 16 IQR = 17	0–31 MED = 19 IQR = 8	0.31
Возраст осмотра, лет	3–60 MED = 26.5 IQR = 16.3	18–41 MED = 27 IQR = 9.5	13–60 MED = 28 IQR = 19	3–60 MED = 31.5 IQR = 17.5	0.82
Длительность течения, лет	0–40 MED = 10.5 IQR = 13	4–24 MED = 13 IQR = 7.5	0–40 MED = 10.5 IQR = 18.8	0–38 MED = 12 IQR = 16	0.71
Неврологический статус (тяж./ум./н.д.)	15/45/4	13/2/0	1/13/2	1/21/0	$2.39e-08$
Семейный анамнез (есть/нет)	9/55	2/13	0/16	4/18	0.22
Соматический мозаицизм (есть/нет)	15/49	2/13	4/12	7/15	0.47
Эффект мутации (терм./альт./н.д.)*	40/7/17	12/1/2	6/4/6	15/2/5	0.13
Класс по Halliday (2А/2В/3)	17/23/24	1/4/10	8/4/4	7/9/6	0.037

Примечание. * – Эффект, оказываемый мутацией на транскрипт. Сокращения: терм. – преждевременная терминация транскрипции (нонсенс-мутации, инсерции и делеции со сдвигом рамки считывания), альт. – изменение аминокислотной последовательности (миссенс-мутации, инсерции и делеции без сдвига рамки считывания), н.д. – эффект, оказываемый мутацией на транскрипт, неизвестен (протяженные делеции, мутации в сайтах сплайсинга).

пример, в связи с наличием кожных проявлений в совокупности с подкожными шванномами, диагнозом, предполагаемым изначально для пациента P03, являлся нейрофиброматоз 1-го типа. У данного пациента необходимо также отметить наличие двусторонних вестибулярных шванном к трехлетнему возрасту при сохранном слухе. Данный клинический признак не является исключительно редким явлением среди педиатрических пациентов с нейрофиброматозом 2-го типа [24], что свидетельствует о необходимости регулярных контрольных исследований для пациентов детского возраста. Однако в настоящее время единого мнения о тактике наблюдения и старта терапии в этой группе пациентов не существует, также не исследована безопасность и отдаленная эффективность существующих методов лечения, а также влияние раннего старта терапии на риск развития неврологического дефицита.

Доля соматического мозаицизма в исследуемой выборке составила 23.4%, что согласуется с ожидаемой частотой данного явления при нейрофиброматозе 2-го типа [25]. Пациенты с соматическим мозаицизмом характеризовались более поздним возрастом клинического дебюта, чем пациенты с герминальной мутацией. Однако в некоторых случаях пациенты с мозаичной мутацией имели высокую опухолевую нагрузку (40.0%) или выраженный неврологический дефицит (6.6%), что свидетельствует о необходимости осторожной оценки мозаичного статуса мутации в качестве предиктора благоприятного прогноза.

Наиболее значимой является корреляция распространенности опухолевого процесса и тяжелого неврологического статуса (p -value = $2.4e-08$). В случаях, противоречащих данному правилу (P25, P46), тяжесть неврологического статуса предположительно обусловлена большими интрамедуллярными новообразованиями, а также отсутствием своевременной терапии (на момент первичного обращения у обоих пациентов уже присутствовал тяжелый неврологический дефицит с развитием нижнего парапареза и проводниковых чувствительных расстройств).

В современном представлении клинический подтип определяется возрастом клинического дебюта и скоростью роста новообразований. Для оценки последнего необходимо проведение последовательного ряда инструментальных исследований в определенном диапазоне времени, что

часто отсутствует на момент первичного обращения пациента в медицинскую организацию. Кроме того, в настоящий момент отсутствуют четкие критерии классификации на клинические подтипы Wishart и Gardner и их дифференциация во многом остается субъективной оценкой.

На основании данных о возрасте дебюта, возрасте осмотра, наличии соматического мозаицизма, распространенности опухолевого процесса и тяжести неврологической симптоматики нами разработан альтернативный подход, основанный только на использовании данных о распространенности опухолевого процесса на момент осмотра для клинической классификации нейрофиброматоза 2-го типа, который может быть применен на этапе первичного осмотра с целью выбора оптимальной частоты контрольных исследований. Наличие статистически значимых различий (p -value = 0.037) в представленности прогностических классов по Halliday между группами, выделенными при помощи альтернативной классификации, позволяет предположить, что данный подход может быть интегрирован в клиническую практику.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №21-15-00262 и в рамках Государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ МГНЦ

Авторы благодарят Центр коллективного пользования (ЦКП) “Геном” ФГБНУ МГНЦ за помощь в выполнении высокопроизводительного секвенирования ДНК.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coy S., Rashid R., Stemmer-Rachamimov A., Santagata S. An update on the CNS manifestations of neurofibromatosis

- type 2 // *Acta Neuropathologica*. 2020. V. 139. P. 643–665.
<https://doi.org/10.1007/s00401-019-02029-5>
2. *Eldridge R., Parry D.M., Kaiser-Kupfer M.I.* Neurofibromatosis 2 (NF2): Clinical heterogeneity and natural history based on 39 individuals in 9 families and 16 sporadic cases // *Am. J. Hum. Genet.* 1991. V. 49. № 4. P. 133–133.
 3. *Evans D.G., Huson S.M., Donnai D. et al.* A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness, and confirmation of maternal transmission effect on severity // *J. Med. Genet.* 1992. V. 29. № 12. P. 841–846.
<https://doi.org/10.1136/jmg.29.12.841>
 4. *Ragge N.K.* Clinical and genetic patterns of neurofibromatosis 1 and 2 // *British J. Ophthalmology*. 1993. V. 77. № 10. P. 662–672.
 5. *Parry D.M., Eldridge R., Kaiser-Kupfer M.I. et al.* Neurofibromatosis 2 (NF2): Clinical characteristics of 63 affected individuals and clinical evidence for heterogeneity // *Am. J. Med. Genet.* 1994. V. 52. № 4. P. 450–461.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.1320520411>
 6. *Rutledge M.H., Andermann A.A., Phelan C.M. et al.* Type of mutation in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) frequently determines severity of disease // *Am. J. Med. Genet.* 1996. V. 59. № 2. P. 331–342.
 7. *Baser M.E., Kuramoto L., Woods R. et al.* The location of constitutional neurofibromatosis 2 (NF2) splice site mutations is associated with the severity of NF2 // *J. Med. Genet.* 2005. V. 42. № 7. P. 540–546.
<https://doi.org/10.1136/jmg.2004.029504>
 8. *Baser M.E., Wallace A.J., Strachan T., Evans D.G.* Clinical and molecular correlates of somatic mosaicism in neurofibromatosis 2 // *J. Med. Genet.* 2000. V. 37. № 7. P. 542–543.
<https://doi.org/10.1136/jmg.37.7.542>
 9. *Selvanathan S.K., Shenton A., Ferner R. et al.* Further genotype–phenotype correlations in neurofibromatosis 2 // *Clin. Genet.* 2010. V. 77. № 2. P. 163–170.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01315.x>
 10. *Halliday D., Emmanouil B., Pretorius P. et al.* Genetic Severity Score predicts clinical phenotype in NF2 // *J. Med. Genet.* 2017. V. 54. № 10. P. 657–664.
<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104519>
 11. *Bettegowda C., Upadhyaya M., Evans D.G. et al.* Genotype–phenotype correlations in neurofibromatosis and their potential clinical use // *Neurology*. 2021. V. 97. № 7. Suppl. 1. P. S91–S98.
<https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000012436>
 12. *Ahlawat S., Fayad L.M., Khan M.S. et al.* Current whole-body MRI applications in the neurofibromatoses: NF1, NF2, and schwannomatosis // *Neurology*. 2016. V. 87. № 7. Suppl. 1. P. S31–S39.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002929>
 13. *Gugel I., Grimm F., Teuber C. et al.* Management of NF2-associated vestibular schwannomas in children and young adults: Influence of surgery and clinical factors on tumor volume and growth rate // *J. Neurosurgery: Pediatrics*. 2019. V. 24. № 5. P. 584–592.
<https://doi.org/10.3171/2019.6.PEDS1947>
 14. *Baser M.E., Friedman J.M., Joe H. et al.* Empirical development of improved diagnostic criteria for neurofibromatosis 2 // *Genet. in Medicine*. 2011. V. 13. № 6. P. 576–581.
<https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e318211faa9>
 15. *Evans D.G.* Neurofibromatosis type 2 // *Handbook Clin. Neurology*. 2015. V. 132. P. 87–96.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62702-5.00005-6>
github.com/kkarandasheva/AmpliSep
 16. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) // *Мед. генетика*. 2019. Т. 18. № 2. С. 3–23.
<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23>
 17. *Richards S., Aziz N., Bale S. et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // *Genet. in Medicine*. 2015. V. 17. № 5. P. 405–423
<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
 18. *Lê S., Josse J., Husson F.* FactoMineR: An R package for multivariate analysis // *J. Stat. Software*. 2008. V. 25. P. 1–18.
<https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
 19. *Josse J., Husson F.* missMDA: A package for handling missing values in multivariate data analysis // *J. Stat. Software*. 2016. V. 70. P. 1–31.
<https://doi.org/10.18637/jss.v070.i01>
<https://cran.r-project.org/package=factoextra>
 20. *Wickham H.* ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. N. Y.: Springer-Verlag. 2016. 213 p. ISBN 978-3-319-24277-4
<https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
 21. *Godel T., Bäumer P., Farschtschi S. et al.* Peripheral nervous system alterations in infant and adult neurofibromatosis type 2 // *Neurology*. 2019. V. 93. № 6. P. e590–e598.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007898>
 22. *Louvrier C., Pasmant E., Briand-Suleau A. et al.* Targeted next-generation sequencing for differential diagnosis of neurofibromatosis type 2, schwannomatosis, and meningioma // *Neuro-Oncology*. 2018. V. 20. № 7. P. 917–929.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noy009>

ROLE OF MOLECULAR GENETIC FACTORS IN FORMATION OF THE CLINICAL TYPE OF NEUROFIBROMATOSIS TYPE 2

K. O. Karandasheva¹, E. S. Makashova^{2,3}, F. A. Ageeva¹, K. I. Anoshkin¹, P. A. Sparber¹,
A. O. Borovikov¹, P. A. Vasiluev¹, M. S. Pashchenko¹, A. S. Tanas¹, V. V. Strelnikov¹, *

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

² Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, 125047 Russia

³ Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow, 111123 Russia

*e-mail: vstrel@list.ru

Neurofibromatosis type 2 is a hereditary disease with predisposition to the development of multiple tumors of the central and peripheral nervous system. The disease is characterized by significant variability in the clinical picture; the number of neoplasms, their location and growth rate largely determine the severity of the course. However, assessing the rate of tumor growth requires the availability of a consistent series of instrumental studies conducted within a certain time range, which is not always available at the time of initial treatment. In this study, based on quantitative (age of onset, age of examination) and qualitative (large number of intracranial tumors, large number of spinal tumors, severity of neurological symptoms, mosaic status of the genetic variant) characteristics, an alternative classification of clinical subtypes of neurofibromatosis type 2 was developed. We have revealed statistically significant differences (p -value = 0.037) in the representation of Halliday prognostic classes between the groups identified using the proposed classification which allows us to suggest the possibility of integrating this approach into clinical practice.

Keywords: neurofibromatosis type 2, *NF2*, genotype-phenotype correlations.

УДК 619:636.2:636.234.1:577.21

РАЗРАБОТКА НАБОРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГОЛШТИНСКИХ ГАПЛОТИПОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ННЗ, НН6, НН7) МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

© 2024 г. В. Д. Зубарева¹, М. В. Бытов¹, О. С. Зайцева¹, О. В. Соколова^{1, *}

¹Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620142 Россия

*e-mail: nauka_sokolova@mail.ru

Поступила в редакцию 07.09.2023 г.

После доработки 15.09.2023 г.

Принята к публикации 19.09.2023 г.

Молочная селекция крупного рогатого скота направлена на повышение продуктивных признаков, в основном за счет использования ограниченного числа племенных быков-производителей. В результате наблюдается рост инбридинга, приводящий к накоплению гетерозигот – носителей рецессивных летальных мутаций. Повышение числа носителей рецессивных летальных аллелей снижает рентабельность животноводческих хозяйств, поскольку увеличивается частота эмбриональной и постэмбриональной смертности, снижается фертильность коров. В данной статье представлены результаты разработок тест-систем для быстрой и недорогой диагностики значимых для животноводства генетически детерминированных заболеваний крупного рогатого скота, а именно для голштинских гаплотипов 3, 6 и 7. Технология диагностики представляет собой ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов. Носителей голштинского гаплотипа 3 не было обнаружено ни в одной из исследованных популяций. Частоты носителей для НН6 и НН7 составили 0.95 и 1.92% соответственно. Полученные значения совпадают с результатами мировых исследований, однако стоит отметить, что в настоящее время проведено мало масштабных скринингов, поскольку казуальные локусы картированы относительно недавно.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, голштинские гаплотипы, летальные мутации, SNP, делеция, ПЦР, TaqMan.

DOI: 10.31857/S0016675824020091 **EDN:** DQPVZA

Особенностью селекции крупного рогатого скота голштинской породы является использование ограниченного числа племенных быков-производителей. Один бык может являться отцом нескольких тысяч дочерей (эффект основателя), что служит причиной увеличения инбридинга в популяции [1]. Такой принцип разведения крупного рогатого скота вызывает быстрое накопление в популяции рецессивных аллелей, в том числе аллелей аутосомно-рецессивных LoF-мутаций (LoF – loss of function), приводящих к утрате функций генов. Появление LoF-мутаций влечет за собой либо ухудшение качества жизни животного, либо эмбриональную или постэмбриональную смертность, принося значительный экономический ущерб животноводческим предприятиям [2].

О возникновении LoF-мутаций при инбридинге известно уже давно [3], однако картирование локусов казуальных мутаций продолжает выполняться [4–6], в том числе и для новых гаплотипов [7–10].

Голштинский гаплотип 3 (OMIAID 001824-9913) открыт в 2014 г. при помощи чипов BovineSNP50 (Illumina, США) и представляет собой миссенс мутацию на хромосоме 8 в 24-ом экзоне гена *SMC2*, кодирующего хромосом-ассоциированный полипептид E [11]. Голштинский гаплотип 6 (OMIA ID 002149-9913) обнаружен после анализа данных генотипирования по той же технологии и картирован к участку размером 1.1 Мб на 16-й хромосоме в виде SNP мутации в гене *SDE2* (кодирует гомолог обслуживания теломер) [5]. Голштинский гаплотип 7 (OMIA ID 001830-9913) обнаружен в результате анализа геномных данных на 27-ой хромосоме в интервалах 13.0–14.4 Мб в виде делеции четырех оснований гена *CENPU* (кодирует центромерный белок U) [6].

Актуальность настоящей разработки обусловлена отсутствием коммерческих тест-систем для диагностики голштинских гаплотипов 3, 6 и 7. Несмотря на то, что данные аутосомно-рецессивные мутации картированы уже несколько лет

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в исследовании

Последовательность 5'–3'	Размер ампликона, пн
Holstein haplotype 3	
F: TCGATGCAGCCCTGGATCTTT R: GCCTCTTTCCTTCTGGAACCAT Probe_A: [HEX]ATGTGTGAAATGAGTACGTA[BHQ2] Probe_G: [ROX]ATGTGTGGAATGAGTACG[BHQ2]	240
Holstein haplotype 6	
F:GCAGTGTGACGGATAAA R:CGAGCTTACGTCATCAAGATA Probe_T: [HEX]TGG [LNA-G]TGAGATGGC[LNA-G]GA[BHQ2] Probe_C: [ROX]TGG GTG AGA CGG CGG A[BHQ2] Cotrol_T: GCAGTGTGACGGATAAAATCCGCCATCTCACCCAATATCTTGATGACGTAAGCTCG Control_C: GCAGTGTGACGGATAAAATCCGCCGTCTCACCCAATATCTTGATGACGTAAGCTCG	193 57 57
Holstein haplotype 7	
F:GTGGTGCTCAAATGTTTACA R:GCTGCGATTAAATCCCTATTTT Probe_del: [FAM]AA[LNA_T]TTCGATATTACTG[LNA_A]AGCA[BHQ1] Probe_pr_WT: [ROX]ATTTCGATATTACTTACTGAAGCA[BHQ2] Cotrol_del:GTGGTGCTCAAATGTTTACAGTGCTTCAGTAATATCGAAATTGAAAATAGGGATTAAATCG CAGC Control_TTAC:GTGGTGCTCAAATGTTTACAGTGCTTCAGTAAGTAATATCGAAATTGAAAATAGGGAT TTAATCGCAGC	165 65 69

назад, методы их диагностики являются дорогостоящими и трудоемкими в использовании. Например для скрининга голштинских гаплотипов 3 и 6 применяется метод ПЦР-ПДРФ с использованием дорогостоящих эндонуклеаз рестрикции. Для голштинского гаплотипа 7 ПЦР-методов диагностики в литературе не описано.

Цель проекта – разработка новых тест-систем ПЦР для диагностики летальных генетических мутаций крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДНК животных выделяли из крови, законсервированной в ЭДТА, с использованием набора “DiatomDNAprep-400” (Изоген, Россия). Отбор крови осуществляли из хвостовой вены. Проведение исследований было одобрено Комитетом по институциональной этике ФГБНУ “Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук” (протокол № 566 от 5 сентября 2023 г.). Детекцию проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-RadLaboratories, Inc., США). Для диагностики на носительства мутаций использовали специфические олигонуклеотидные праймеры, синтезированные компанией Lumiprobe (Россия) (табл. 1). Дизайн олигонуклеотидов, положительных и от-

рицательных контрольных образцов выполнен с помощью FastPCR 6.8 [12, 13]. Определение температур плавления и отжига праймеров проведено с использованием PrimerBLAST [14] и IDT-DNAOligoAnalyser [15], а проверка на наличие димеров – с помощью ThermoFisherMultiplePrimerAnalyzer [16]. Для контроля эффективности протекания ПЦР при каждом запуске использовали разработанные нами комплекты положительных химических контрольных образцов для мутантного и здорового аллелей. Амплификацию ДНК проводили с помощью экстра-микса HS-Taq ПЦР (2×) (diaGene, Россия).

Температурные режимы, оптимальные для протекания реакций, представлены в табл. 2. Скрининг на наличие голштинских гаплотипов 3, 6 и 7 был проведен на 360, 423 и 417 особях соответственно, включая 89 быков-производителей, чья сперма используется на территории Свердловской области. Оценку специфичности разработанных реакций проводили с использованием гель-электрофореза и системы капиллярного электрофореза Qsep100 (BiOptic, Тайвань). Для капиллярного электрофореза использованы картриджи S2 (BiOptic, Тайвань), выравнивающий маркер 20 пн – 1 Кб и маркер длин ДНК от 15 до 622 пн. С помощью специализированного ПО Q-Analyzer выбраны условия электрофореза

Таблица 2. Режимы амплификации, используемые в исследовании

Гаплотип	Режим амплификации		
	Начальная денатурация	Денатурация, отжиг, элонгация	Окончательная элонгация
	1 цикл	45 циклов	1 цикл
НН3	95° – 10 мин	95° – 15 с, 59° – 30 с, 72° – 30 с 📷*	72° – 10 мин
	1 цикл	40 циклов	1 цикл
НН6	95° – 5 мин	95° – 20 с, 60° – 30 с, 72° – 20 с 📷*	72° – 10 мин
	1 цикл	40 циклов	1 цикл
НН7	95° – 5 мин	95° – 20 с, 57° – 30 с, 72° – 20 с 📷*	72° – 10 мин

* – сканирование.

для наиболее точного анализа и проведена интерпретация результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Каждая из разработанных тест-систем была проверена на специфичность с помощью пластинчатого гель-электрофореза и капиллярного гель-электрофореза (рис. 1). Наблюдается соответствие длины ампликонов с результатами анализа по базе данных Primer BLAST.

Всего на носительство голштинского гаплотипа 3 было исследовано 360 особей крупного рогатого скота Свердловской и Пермской областей, а также Удмуртии. Носителей данной мутации не выявлено. В схожем скрининговом исследовании в выборке из 390 голштинских коров китайской популяции при помощи конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP, kompetitiveallele-specific PCR) была определена доля носительства данной летальной мутации – 2.6% [17].

В ходе работы проведен скрининг 423 особей крупного рогатого скота Свердловской и Пермской областей, а также Удмуртии на носительство голштинского гаплотипа 6. Обнаружено четыре носителя данной аутосомно-рецессивной генетической мутации, что составляет 0.95% от общего исследованного поголовья. Доля носителей в данной выборке не превышает значения в группе быков, сперма которых используется на территории Уральского региона [18]. Полученные данные также совпадают с исследованием китайских ученых, которые проводили скрининг 1633 коров голштинской породы на носительство восьми летальных генетических мутаций при помощи метода KASP, средняя доля носительства составила 1.86% [19].

Кроме того, нами подобрана тест-система для диагностики голштинского гаплотипа 7. Было разработано два комплекта олигонуклеотидов (праймеры и зонды), для каждого из которых проведена оценка эффективности с целью выбора оптимального. С помощью созданной

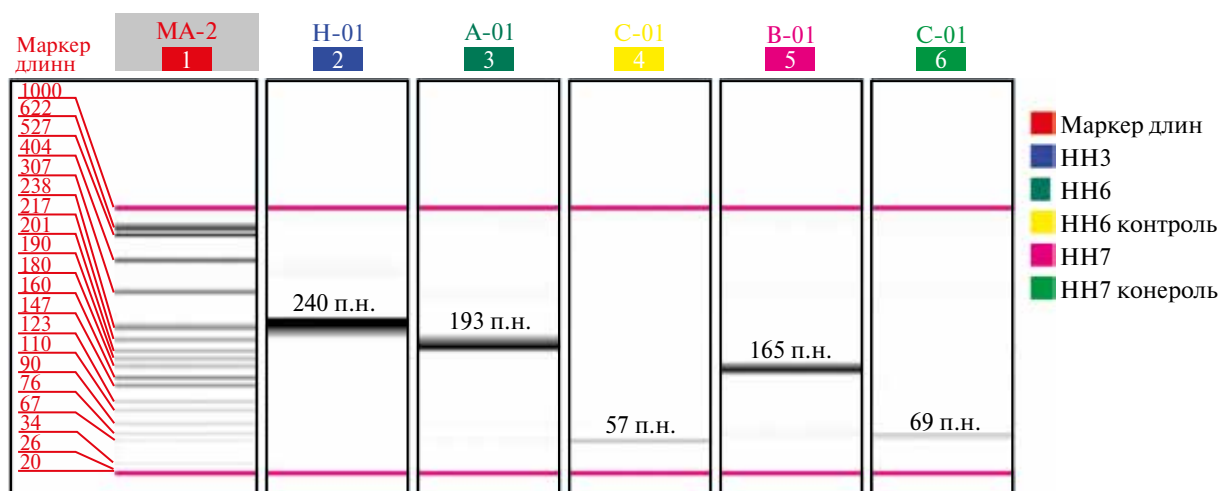


Рис. 1. Результаты капиллярного электрофореза.

ПЦР-системы проведен скрининг 417 особей крупного рогатого скота Свердловской, Пермской и Кировской областей. Всего обнаружено восемь носителей генетического заболевания, то есть 1.92% от общего поголовья. В 2023 г. шведскими учеными исследованы геномные данные более 24000 коров для поиска аллелей летальных мутаций. Частота встречаемости генотипов с HH7 составила 0.29%, и сделан вывод, что носителями данного генетического заболевания являются исключительно потомки голштинских быков [20]. Согласно Решению Коллегии Евразийской экономической комиссии от 2 июня 2020 г. № 74, голштинский гаплотип 7 не подлежит обязательному скринингу, в связи с чем наблюдается накопление данной генетической мутации в популяциях крупного рогатого скота России.

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые были созданы тест-системы для детекции аллелей голштинских гаплотипов 3, 6, 7 в режиме реального времени. Наша разработка позволяет проводить быструю диагностику данных рецессивных летальных мутаций без использования дорогих коммерческих наборов (KASP) или эндонуклеаз рестрикции (ПЦР-ПДРФ).

Носителей голштинского гаплотипа 3 не было обнаружено ни в одной из исследованных популяций. HH6 выявлен только у представителей голштинской породы крупного рогатого скота. Носители HH7 обнаружены среди коров голштинской породы, а также быков-производителей, чья сперма используется на территории Свердловской обл. Кроме того, носительство летальной мутации выявлено в локальной популяции тагильской черно-пестрой породы, что вероятно связано с использованием быков голштинской породы в селекционных программах. Ранее было показано, что в Уральском регионе наблюдается крайне низкое генетическое разнообразие черно-пестрого голштинизированного крупного рогатого скота [21]. Таким образом, использование испытывающих инбредную депрессию популяций крупного рогатого скота для селекции аборигенных пород может способствовать накоплению генетически детерминированных заболеваний.

В связи с высокой частотой распространения голштинского гаплотипа 7 в уральской популяции крупного рогатого скота желательно проводить мониторинговые исследования племенных

производителей и доноров эмбрионов животных для обеспечения устойчивого развития животноводства в регионе.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России по теме № 0532-2022-0004 “Разработка технологии для маркер-ориентированной селекции крупного рогатого скота по генам, ассоциированным с устойчивостью к заболеваниям”.

Работа выполнена при поддержке Фонда им. Геннадия Комиссарова.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдельманова А.С., Волкова В.В., Доцев А.В. и др. Характеристика генетического разнообразия современной и архивной популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы с использованием микросателлитных маркеров // Достиж. науки и техники АПК. 2020. № 34-2. С. 34–38. <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2020-10207>
2. Зиновьева Н.А. Гаплотипы фертильности голштинского скота // С.-хоз. биология. 2016. Т. 51. № 4. С. 423–435. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.4.423rus>
3. Van Raden P.M., Olson K.M., Null D.J. et al. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes // J. Dairy Sci. 2011. V. 94. № 12. P. 6153–6161. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4624>
4. Ortega M.S., Derek M.B., Kelsey N.L. et al. Truncation of IFT80 causes early embryonic loss in cattle // bioRxiv. 2022. <https://doi.org/10.1101/2021.07.02.450952>
5. Fritz S., Hoze C., Rebours E. et al. An initiator codon mutation in SDE2 causes recessive embryonic lethality in Holstein cattle // J. Dairy Sci. 2018. V. 101. № 7. P. 6220–6231. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14119>
6. Hoze C., Escoufflaire C., Mesbah-Uddin M. et al. Short communication: A splice site mutation in CENPU is associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle // J. Dairy Sci. 2020. V. 103. № 1. P. 607–612. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17056>
7. Hafliger I.M., Spengeler M., Seefried F.R. et al. Four novel candidate causal variants for deficient homozygous haplotypes in Holstein cattle // Sci. Rep. 2022. V. 12. № 1. Article 5435. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09403-6>
8. Wu X., Mesbah-Uddin M., Guldbrandtsen B. et al. Novel haplotypes responsible for prenatal death in Nordic Red and Danish Jersey cattle // J. Dairy Sci. 2020. V. 103. № 5. P. 4570–4578.

- <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17831>
9. Dechow C.D., Frye E., Maunsell F.P. Identification of a putative haplotype associated with recumbency in Holstein calves // *JDS Commun.* 2022. V. 3. № 6. P. 412–415. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2022-0224>
 10. Wu X., Mesbah-Uddin M., Guldbrandsen B. et al. Haplotypes responsible for early embryonic lethality detected in Nordic Holsteins // *J. Dairy Sci.* 2019. V. 102. № 12. P. 11116–11123. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16651>
 11. McClure M.C., Bickhart D., Null D. et al. Bovine exome sequence analysis and targeted SNP genotyping of recessive fertility defects BH1, HH2, and HH3 reveal a putative causative mutation in SMC2 for HH3 // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092769>
 12. Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis // *Genomics*. 2011. V. 98. № 2. P. 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.04.009>
 13. Kalendar R., Khassenov B., Ramankulov Y. et al. Fast PCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis // *Genomics*. 2017. V. 109. № 3–4. P. 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>
 14. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics*. 2012. V. 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
 15. Owczarzy R., Tataurov A.V., Wu Y. et al. IDT SciTools: A suite for analysis and design of nucleic acid oligomers // *Nucl. Ac. Res.* 2008. V. 36. Article W163–W169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>
 16. Breslauer K.J., Frank R., Blocker H. et al. Predicting DNA duplex stability from the base sequence // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1986. V. 83. № 11. P. 3746–3750. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.3746>
 17. Zhang Y., Liang D., Huang H. et al. Technical note: Development and application of KASP assays for rapid screening of 8 genetic defects in Holstein cattle // *J. Dairy Sci.* 2020. V. 103. № 1. P. 619–624. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16345>
 18. Модоров М.В., Мартынов Н.А., Шкуратова И.А. и др. Распространение рецессивных генетических нарушений в уральской популяции крупного рогатого скота // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 4. С. 429–437. <https://doi.org/10.31857/S0016675822040105>
 19. Khan M.Y.A., Omar A.I., He Y. et al. Prevalence of nine genetic defects in Chinese Holstein cattle // *Vet. Med. Sci.* 2021. V. 7. № 5. P. 1728–1735. <https://doi.org/10.1002/vms3.525>
 20. Bengtsson C., Stalhammar H., Thomasen J.R. et al. Mating allocations in Holstein combining genomic information and linear programming optimization at the herd level // *J. Dairy Sci.* 2023. V. 106. № 5. P. 3359–3375. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22926>
 21. Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А. и др. Генетическая структура популяции голштинизированного черно-пестрого скота на территории Урала // *Генетика*. 2021. Т. 57. № 4. С. 437–444. <https://doi.org/10.31857/S001667582104010X>

NOVEL REAL-TIME PCR METHODS FOR BOVINE HAPLOTYPES HH3, HH6, HH7 DIAGNOSIS

V. D. Zubareva¹, M. V. Bytov¹, O. S. Zaitseva¹, O. V. Sokolova¹, *

¹Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620142 Russia

*e-mail: nauka_sokolova@mail.ru

Dairy cattle breeding is aimed at improving the productivity, mainly through the use of a limited number of breeding bulls. As a result, an increase in inbreeding is observed causing accumulation of heterozygotes-carriers of recessive lethal mutations. A rise in the number of carriers reduces the profitability of dairy farms, since the frequency of embryonic and post-embryonic mortality increases, and the fertility of cows decreases. This paper presents the results of the development of test systems for rapid and inexpensive diagnostics of genetically determined cattle diseases that are significant for animal husbandry, namely for Holstein haplotypes 3, 6 and 7. The diagnostic technology is real-time PCR using TaqMan probes. Carriers of the Holstein haplotype 3 were not found in any of the studied populations. The carrier frequencies for HH6 and HH7 were 0.95 and 1.92%, respectively. Carrier frequencies are consistent with the results of studies worldwide, however, it is worth noting that only few large-scale screening studies have been carried out, since causative loci have been mapped relatively recently.

Keywords: cattle, Holstein haplotypes, lethal mutations, SNP, deletion, PCR, TaqMan.

УДК 577.21:616.895

ПОИСК ЭТНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РИСКА РАЗВИТИЯ ПАРАНОИДНОЙ ШИЗОФРЕНИИ У БАШКИР ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ПОЛНОГЕНОМНОГО АНАЛИЗА АССОЦИАЦИИ

© 2024 г. А. Э. Гареева^{1, 2, 3 *}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Кемеровский государственный университет Минобрнауки России, Кемерово, 650000 Россия

³Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, 125993 Россия

*e-mail: annagareeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.07.2023 г.

После доработки 21.08.2023 г.

Принята к публикации 24.08.2023 г.

В настоящее время известно, что шизофрения является многофакторным заболеванием, в развитии которого играют роль как генетические, так и факторы окружающей среды. В последние годы, главным образом благодаря использованию полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), были выявлены многие молекулярно-генетические процессы, повышающие предрасположенность к шизофрении. Целью настоящего исследования явилось изучение генетических факторов риска развития шизофрении при проведении полногеномного анализа ассоциации (GWAS) у башкир из Республики Башкортостан. Исследованная выборка состояла из 139 больных параноидной шизофренией и 204 здоровых индивидов. Полногеномное гено-типирование образцов ДНК было проведено на биочипе PsychChip, включавшим 610000 однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОНП).

Ключевые слова: генетика, шизофрения, полногеномный анализ ассоциаций, этническая принадлежность, этноспецифические маркеры, Республика Башкортостан, международный консорциум по психиатрической генетике PGC.

DOI: 10.31857/S0016675824020103 EDN: DQNDHI

Шизофрения — тяжелейшее психическое заболевание. Распространенность шизофрении в течение жизни в общей популяции составляет примерно 1%. Высокая заболеваемость и смертность делают шизофрению серьезной проблемой для здравоохранения [1]. Коэффициент наследуемости шизофрении составляет 81%, что указывает на важную роль генетической компоненты в патогенезе данного заболевания [1]. Полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) улучшили наше понимание о вкладе специфических генетических факторов в риск развития шизофрении. GWAS предоставили убедительные доказательства важной роли распространенных генетических вариантов в определении индивидуального фона уязвимости к шизофрении [2]. На сегодняшний день было проведено несколько крупномасштабных GWAS в различных популяциях мира, и были идентифицированы сотни полиморфных локусов риска для шизофрении [3–6]. Крупнейший GWAS на сегодняшний день идентифицировал 287 независимых полиморфных локусов риска развития шизофрении [6].

С целью выявления этноспецифических генетических факторов риска развития параноидной шизофрении нами проведен полногеномный анализ ассоциации у башкир из Республики Башкортостан (рис. 1). Объект исследования — 139 пациентов (70 мужчин, 69 женщин) башкирской этнической принадлежности с диагнозом параноидная шизофрения (ПШ) F20.0 согласно с международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10), находящихся на лечении в Республиканской клинической психиатрической больнице № 1 Министерства здравоохранения Республики Башкортостан. Средний возраст больных составил 24.9 ± 8.9 лет. Средний возраст начала заболевания составил 22.4 ± 7.3 лет. Информацию по этнической принадлежности до третьего поколения получали путем опроса.

Контрольная группа, состояла из 204 здоровых индивидов (108 мужчин, 96 женщин) той же возрастной группы, не состоявших на учете у психиатра и нарколога и отрицавшие у себя отя-

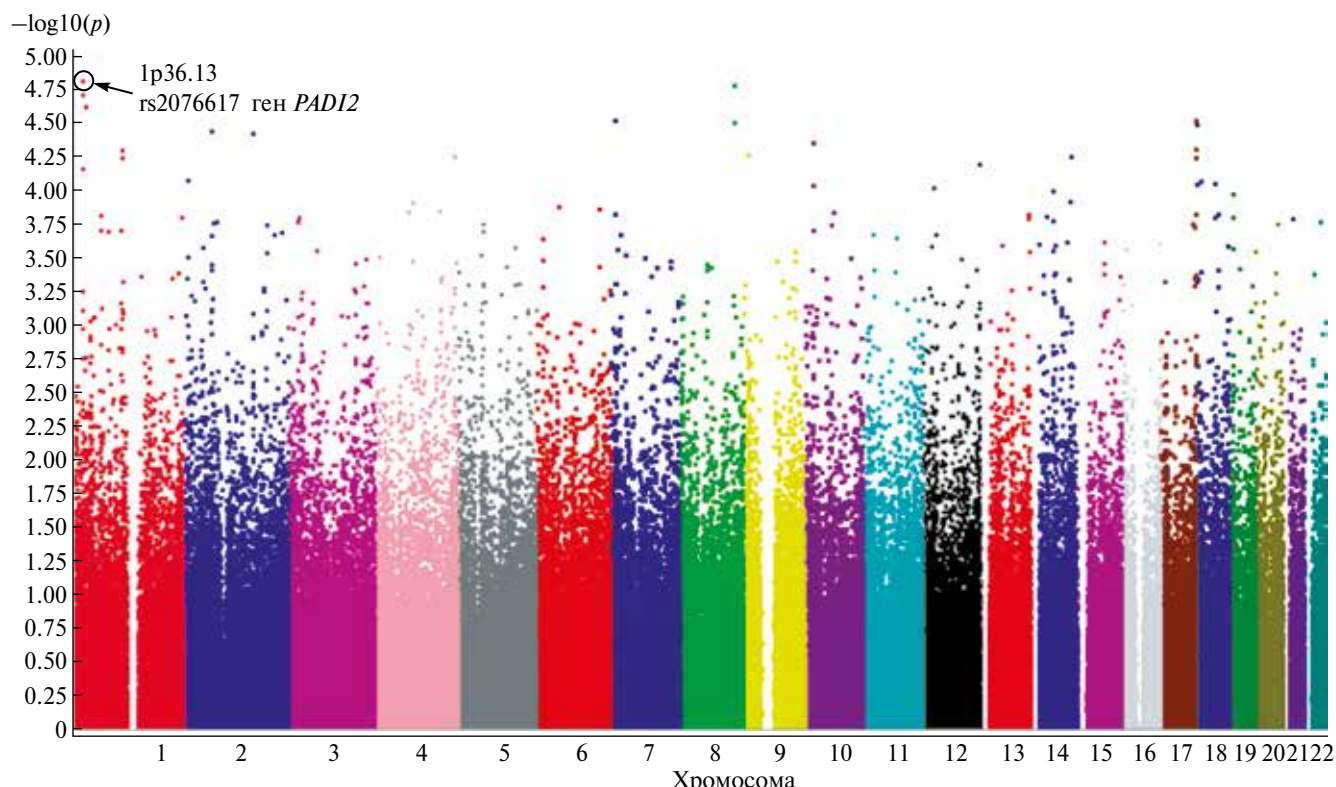


Рис. 1. Графическое изображение результатов полногеномного анализа ассоциации 395832 ОНП с параноидной шизофренией у башкир (Manhattanplot). На оси X указана хромосомная локализация ОНП, на оси Y – значения отрицательного десятичного логарифма уровня значимости p -value.

гощенную наследственность по психическим заболеваниям. Средний возраст здоровых доноров составил 32.4 ± 12.4 года.

Полногеномное генотипирование образцов ДНК было проведено на биочипе IlluminaHuman 610-QuadPsychChip, включавшее 610000 однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОНП). Полногеномный анализ ассоциации ОНП выполнен с помощью пакета программ PLINK 2.0 [7]. Подробное описание полногеномного ассоциативного анализа было опубликовано ранее [8].

Для снижения ошибки первого рода была применена поправка FDR-BH (FalseDiscoveryRateBengamini-Hochberg) на число множественных сравнений [9].

9WAS, выполненный у индивидов башкирской этнической принадлежности, выявил наиболее выраженные различия между больными ПШ и контрольной группой по полиморфным локусам, локализованным в области 1p36.13, которая по результатам ряда проведенных полногеномных исследований сцеплена с риском развития шизофрении (рис. 1, табл. 1) [10, 11]. В ряде ранее проведенных исследований была установлена ас-

социация хромосомной области 1p36.13 с развитием шизофрении [10, 11]. Так, анализ сцепления с двенадцатью эндофенотипами в ходе крупномасштабного GWAS выявил ассоциацию хромосомной области 1p36.13 (*PAX7*, *UBR4*, *ALDH4A1*, *NBL1*, *HTR6*, *EPHA8*, *EPHB2*) с тестом распознавания эмоций, достигшую полногеномного уровня значимости с LOD-баллом равным 3.5 (1p36) у 1004 больных шизофренией [12, 13].

Наиболее высокий уровень ассоциации ПШ обнаружен с полиморфным вариантом rs2076617, расположенным в гене *PADI2* ($p = 1.53E-05$) (табл. 1). Ген *PADI2* кодирует фермент семейства пептидил-аргинин деиминазы второго типа и состоит из 16 экзонов, охватывая около 53 тпн геномной ДНК, длина его мРНК составляет 4363 пн [14]. Расщепление аргинина до цитруллина – это процесс, катализируемый ферментом пептидил-аргинин деиминазой (**PAD**), при котором аминокислота аргинин преобразуется в цитруллин. В процессе модификации положительно заряженная NH_2 -группа отщепляется с присоединением кислорода. Циклические цитруллинированные белки постоянно обнаруживаются в синовиальной ткани у пациентов с ревматоидным артритом. Ген *PADI2* ши-

Таблица 1. Однонуклеотидные полиморфные варианты, локализованные в области 1p36.13 и ассоциированные с параноидной шизофренией у башкир

Ген	№ rs	ОНП	Аллель 1	Частота аллеля 1 больные, %	Частота аллеля 1 контроль, %	<i>p</i>	OR	<i>p</i> _{fidr}
PADI2	rs2076617	g.17409017G>A	A	0.2662	0.4338	1.53E-05	0.472	0.768
PADI2	rs2016693	g.17397704A>C	A	0.2806	0.4485	1.95E-05	0.484	0.768
PADI2	rs2057096	g.17405809G>A	G	0.3309	0.4902	6.86E-05	0.522	0.806
PADI2	rs2057094	g.17405949C>T	C	0.3309	0.4902	6.86E-05	0.522	0.806
PADI1	rs3003406	g.17557133A>C	C	0.4209	0.2966	5.59E-04	1.833	0.814
PADI2	rs2076598	g.17395521G>A	G	0.3345	0.4681	7.73E-04	0.582	0.814
PADI1	rs11203339	g.17560972C>T	T	0.3669	0.25	1.06E-03	1.774	0.817
PADI1	rs4268393	g.17559196T>C	C	0.2842	0.1814	1.74E-03	1.809	0.824
PADI2	rs2076614	g.17413459G>A	A	0.2482	0.3529	3.69E-03	0.597	0.824
SDHB	rs4920653	g.17366871T>C	C	0.2806	0.3922	3.74E-03	0.618	0.824
PADI1	rs114209578	g.17541929C>A	A	0.2518	0.07108	0.011	0.336	0.849

роко экспрессируется в ЦНС, включая нейроны, глиальные клетки, астроциты, микроглию и олигодендроциты. Дерегулированная экспрессия *PADI2* вызывает aberrантное цитруллинирование глиального фибриллярного кислого белка (**GFAP**) и в конечном итоге приводит к возникновению неврологических заболеваний [14].

В последние годы было обнаружено, что аномальная активация белков семейства PAD является причиной накопления большого количества цитруллинированных белков у больных с различными нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз и болезнь Гентингтона, по предположению, чрезмерное цитруллинирование белков приводит к возникновению и развитию этих [15] и других нейропсихиатрических заболеваний с нейродегенерацией [16]. Цитруллинирование, дезаминирование остатков пептидиларгинина в пептидилцитруллин, вовлечено в этиологию ряда заболеваний. При рассеянном склерозе цитруллинирование является ведущим звеном патогенеза из-за гиперцитруллинирования и дестабилизации миелина. В результате чего, в качестве стратегии терапии рассеянного склероза, было предложено ингибирование цитруллинирования [17]. А.М. Falcao с соавт., напротив, показали, что цитруллинирование пептидил-аргинин дезиминазой 2 (**PADI2**) способствует нормальной дифференцировке олигодендроцитов, миелинизации и двигательной активности. Этой научной группой идентифицировано несколько мишеней для *PADI2*, включая миелин и связанные с хроматином белки, вовлекающие фермент в участие в эпигеномной регуляции. Они также установили,

что ингибирование *PADI2* и его нокаут влияют на доступность хроматина и предотвращают активацию генов дифференцировки олигодендроцитов. Более того, у мышей с недостаточностью *PADI2* наблюдалась двигательная дисфункция и уменьшением количества миелинизированных аксонов мозолистого тела. Исследование А.М. Falcao с соавт. свидетельствует о том, что цитруллинирование способствует правильному образованию олигодендроцитов и миелинизации [17]. На основании этих данных можно предположить, что ген *PADI2* возможно является геном-кандидатом шизофрении, поскольку известно, что дисфункция олигодендроцитов и миелина приводит к изменениям в формировании и функционировании синапсов, что может приводить к когнитивной дисфункции – основному симптому шизофрении [6].

По данным проекта “1000 геномов”, частота встречаемости аллеля *rs2076617*А* в популяциях мира варьирует: 26.3% – у европейцев (CEU), 39.5% – у африканцев (AFR), 57.3% – у китайцев (CHB) генотипов и аллелей по данному полиморфному локусу *rs2016693* оказались статистически не значимыми (табл. 2).

При анализе распределения частот генотипов и аллелей вариантов *rs2057096* и *rs2057094* выявлены идентичные значения частот по этим полиморфным локусам, в связи с чем далее будут подробно изложены результаты анализа ассоциации только по ОНП *rs2057096* (табл. 2). Вариант *rs2057096* в исследуемой нами выборке больных и в контроле у башкир показал высокий уровень ассоциации с ПШ (табл. 1).

Таблица 2. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов, локализованных в хромосомной области 1p36.13 в выборках больных параноидной шизофренией и в контрольных группах у башкир

Генотип/ Аллель	Больные		Контроль		<i>p</i>	<i>p</i> _{fidr}	OR (CI95%)
	<i>n</i>	<i>p</i> ± spCI (%)	<i>n</i>	<i>p</i> ± sp CI (%)			
rs2076617							
A/A	11	7.91 ± 2.29 4.02–13.72	37	18.14 ± 2.7 13.1–24.12	7.4E-03	0.841	0,39 (0,19–0,79)
A/G	52	37.41 ± 4.1 29.36–46.01	103	50.49 ± 3.5 43.42–57.54	0.017	0.862	0,59 (0,38–0,92)
G/G	76	54.68 ± 4.22 46.02–63.13	64	31.37 ± 3.25 25.07–38.22	1.6E-05	0.752	2,64 (1,69–4,12)
A	74	26.62 ± 2.65 21.52 – 32.23	177	43.38 ± 2.45 38.51–48.35	1.53E-05	0.864	0,47 (0,34–0,65)
G	204	73.38 ± 2.65 67.77–78.48	231	56.62 ± 2.45 51.65–61.49	1.53E-05	0.864	2,11 (1,52–2,94)
rs2016693							
A/A	11	7.91 ± 2.29 4.02–13.72	42	20.59 ± 2.83 15.26–26.79	1.4E-05	0.988	0,33 (0,16–0,67)
A/C	56	40.29 ± 4.16 32.06–48.94	99	48.53 ± 3.5 41.49–55.61	0.132	0.931	
C/C	72	51.8 ± 4.24 43.17–60.35	63	30.88 ± 3.23 24.62–37.71	9.9E-05	0.822	2.41 (1.54–3.76)
A	78	28.06 ± 2.69 22.86–33.73	183	44.85 ± 2.46 39.96–49.82	1.95E-05	0.689	0.48 (0.35–0.67)
C	200	71.94 ± 2.69 66.27–77.14	225	55.15 ± 2.46 50.18–60.04	1.95E-05	0.689	2.09 (1.51–2.9)
rs2057096							
G/G	16	11.51 ± 2.71 6.72–18.02	50	24.51 ± 3.01 18.77–31	2.7E-03	0.838	0.4 (0.22–0.74)
G/A	60	43.17 ± 4.2 34.8–51.83	100	49.02 ± 3.5 41.97–56.1	0.286	0.969	
A/A	63	45.32 ± 4.22 36.87–53.98	54	26.47 ± 3.09 20.55–33.08	3.0E-04	0.803	2.3 (1.46–3.63)
G	92	33.09 ± 2.82 27.59–38.96	200	49.02 ± 2.47 44.07–53.98	6.86E-05	0.744	0,51 (0.37–0.7)
A	186	66.91 ± 2.82 61.04–72.41	208	50.98 ± 2.47 46.02–55.93	6.86E-05	0.744	1.94 (1.41–2.66)
rs2057094							
C/C	16	11.51 ± 2.71 6.72–18.02	50	24.51 ± 3.01 18.77–31	2.7E-03	0.837	0.4 (0,22–0.74)
C/T	60	43.17 ± 4.2 34.8–51.83	100	49.02 ± 3.5 41.97–56.1	0.286	0.969	
T/T	63	45.32 ± 4.22 36.87–53.98	54	26.47 ± 3.09 20.55–33.08	3.0E-04	0.822	2.3 (1.46–3.63)
C	92	33.09 ± 2.82 27.59–38.96	200	49.02 ± 2.47 44.07–53.98	6.86E-05	0717	0.51 (0.37–0.7)
T	186	66.91 ± 2.82 61.04–72.41	208	50.98± 2.47 46.02–55.93	6.86E-05	0.717	1.94 (1.41–2.66)

У больных параноидной шизофренией частота гомозиготного генотипа *rs2057096*G/G* (11.51%) была значительно ниже таковой в контрольной группе (24.51%) ($p = 2.7E-03$, OR = 0.41, CI95% 0.22–0.74). Генотип *rs2057096*A/A* чаще встречался у больных ПШ – 45.32%, чем в контроле (26.47%) ($p = 3.0E-04$, OR = 2.3, CI95%

1.46–3.63). Частота аллеля *rs2057096*G* в группе здоровых была значительно выше (49.02%), чем у больных (33.09%) ($p = 6.86E-05$, OR = 0.51, CI95% 0.37–0.7). Частота аллеля *rs2057096*A* у больных ПШ (66.91%) превышала его частоту в контрольной группе, где составила 50.98% (OR = 1.94, CI95% 1.41–2.66). Однако при введении

поправки FDR-BH отличия в распределении частот генотипов и аллелей по полиморфному локусу rs2057096 оказались статистически не значимыми (табл. 2).

Таким образом, проведенный полногеномный анализ ассоциации показал отсутствие ассоциации параноидной шизофрении у индивидов башкирской этнической принадлежности с ОНП rs2076617 гена *PADI2*, расположенного в области 1p36.13, несмотря на имеющиеся литературные данные, демонстрирующие ассоциацию хромосомной области 1p36.13 [10–13] и гена *PADI2* [16] с развитием шизофрении в различных популяциях. Данные различия могут быть связаны как с недостаточной численностью выборки для подобного рода исследований, так и свидетельствовать о межпопуляционных различиях в формировании наследственной предрасположенности к параноидной шизофрении. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

Автор выражает огромную благодарность сотрудникам Департамента психиатрической медицины и клинических нейронаук Кардиффского университета г. Кардифф (Великобритания) М. О'Donovan, V. Escott-Price, М. Owen, G. Leonenko за советы по генерации и анализу данных и участию в проекте.

Также выражаю благодарность директору ИБГ УФИЦ РАН проф. Хуснутдиновой Э.К. за научное консультирование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J., Liu J., Li S. et al. Genetic regulatory and biological implications of the 10q24.32 schizophrenia risk locus // *Brain*. 2023. V. 146. № 4. P. 1403–1419. <https://doi.org/10.1093/brain/awac352>
2. Dennison C.A., Legge S.E., Pardiñas A.F., Walters J. Genome-wide association studies in schizophrenia: Recent advances, challenges and future perspective // *Schizophr. Res.* 2020. V. 217. P. 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.10.048>
3. O'Donovan M.C., Craddock N., Norton N. et al. Molecular genetics of schizophrenia collaboration. identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. № 9. P. 1053–1055. <https://doi.org/10.1038/ng.201. PMID: 18677311>
4. Ripke S., Neale B.M., Corvin A. et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci // *Nature*. 2014. V. 511. № 7510. P. 421–427. <https://doi.org/10.1038/nature13595>
5. Lam M., Chen C.Y., Li Z. et al. Comparative genetic architectures of schizophrenia in East Asian and European populations // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 12. P. 1670–1678. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0512-x>
6. Trubetskoy V., Pardiñas A.F., Qi T. et al. Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia // *Nature*. 2022. V. 604. № 7906. P. 502–508. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5>
7. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: A toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 3. P. 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
8. Гареева А.Э. Полногеномное ассоциативное исследование риска развития шизофрении в Республике Башкортостан // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 8. С. 954–963. <https://doi.org/10.31857/S0016675823080076>
9. Benjamini Y., Drai D., Elmer G., Kafkafi N., Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research // *Behav. Brain Res.* 2001. V. 125. № 1–2. P. 279–284. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00297-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00297-2)
10. Abecasis G.R., Burt R.A., Hall D. et al. Genomewide scan in families with schizophrenia from the founder population of Afrikaners reveals evidence for linkage and uniparental disomy on chromosome 1 // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. № 3. P. 403–417. <https://doi.org/10.1086/381713>
11. Escamilla M.A., Ontiveros A., Nicolini H. et al. A genome-wide scan for schizophrenia and psychosis susceptibility loci in families of Mexican and Central American ancestry // *Am. J. Med. Genet.* 2007. V. 144B. № 2. P. 193–199. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30411>
12. Greenwood T.A., Swerdlow N.R., Gur R.E. et al. Genome-wide linkage analyses of 12 endophenotypes for schizophrenia from the Consortium on the Genetics of Schizophrenia // *Am. J. Psychiatry*. 2013. V. 170. № 5. P. 521–532. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2012.12020186>
13. Greenwood T.A., Lazzeroni L.C., Calkins M.E. et al. Genetic assessment of additional endophenotypes from the Consortium on the Genetics of Schizophrenia Family Study // *Schizophr. Res.* 2016. V. 170. № 1. P. 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.11.008>
14. Wang L., Chen H., Tang J. et al. Peptidylarginine deiminase and Alzheimer's disease // *J. Alzheimers Dis.* 2022. V. 85. № 2. P. 473–484. <https://doi.org/10.3233/JAD-215302>
15. Bradford C.M., Ramos I., Cross A.K. et al. Localisation of citrullinated proteins in normal appearing white matter and lesions in the central nervous system in multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 2014. V. 273. № 1–2. P. 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.05.007>
16. Watanabe Y., Nunokawa A., Kaneko N. et al. A two-stage

case-control association study of PADI2 with schizophrenia // J. Hum. Genet. 2009. V. 54. № 7. P. 430–432. <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.52>

17. Falcão A.M., Meijer M., Scaglione A. et al. PAD2-Mediated

citruination contributes to efficient oligodendrocyte differentiation and myelination // Cell Rep. 2019. V. 27. № 4. P. 1090–1102. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.108>

SEARCH FOR ETHNOSPECIFIC RISK MARKERS FOR THE DEVELOPMENT OF PARANOID SCHIZOPHRENIA IN BASHKIRS BASED ON THE RESULTS OF A GENOME-WIDE ASSOCIATION ANALYSIS

E. Gareeva^{1, 2, *}

¹*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. Ufa, 450054 Russia*

²*Kemerovo State University, Kemerovo, 650000 Russia*

³*Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Health of Russia, Moscow, 125993 Russia*

**e-mail: annagareeva@yandex.ru*

Schizophrenia is now known to be a multifactorial disease in which both genetic and environmental factors play a role. In recent years, mainly through the use of genome-wide association studies (GWAS), many molecular genetic processes have been identified that increase susceptibility to schizophrenia. The aim of this study was to study genetic risk factors for the development of schizophrenia in a genome-wide association analysis (GWAS) in Bashkirs from the Republic of Bashkortostan. The studied sample consisted of 139 patients with paranoid schizophrenia and 204 healthy individuals. Whole genome genotyping of DNA samples was carried out on the PsychChip biochip, which included 610,000 single nucleotide polymorphic variants (SNPs).

Keywords: genetics, schizophrenia, genome-wide association analysis, ethnicity, ethnospecific markers, Republic of Bashkortostan, international consortium for psychiatric genetics PGC.

ПАМЯТИ ОЛЬГИ ЛЕОНИДОВНЫ КУРБАТОВОЙ (20.04.1949–09.02.2024)



9 февраля 2024 г. после многолетней мужественной борьбы с тяжелой болезнью на 75-м году ушла из жизни Ольга Леонидовна Курбатова — выдающийся ученый-генетик, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории популяционной генетики им. академика Ю.П. Алтухова Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, автор более 110 работ по популяционной и демографической генетике человека.

Ольга Леонидовна родилась 20 апреля 1949 г. в Ленинграде. С 1966 по 1971 гг. училась в Москве на Биолого-почвенном факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, окончила кафедру генетики и селекции. В 1971 г. поступила в аспирантуру на кафедру антропологии биофака МГУ, сразу после ее окончания, в 1974 г., начала трудовую деятельность в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова АН СССР (ИОГен АН СССР, впоследствии ИОГен РАН). В 1977 г. она защитила кандидатскую диссертацию по теме “Генетические процессы в городском населении (опыт генодемографического исследования популяции г. Москвы)”, руководитель — проф. Ю.Г. Рычков.

Ольга Леонидовна была ярким талантливым ученым, внесла неоценимый вклад в науку, соз-

дав совместно с академиком Ю.П. Алтуховым уникальное направление популяционной генетики человека — демографическую генетику. Она организовала комплексное изучение генетико-демографических процессов в популяциях мегаполисов, объединив усилия ряда специалистов, а в последние десятилетия руководила специализированной группой в своем институте. В 1995 г. была награждена премией РАН им. И.И. Шмальгаузена за цикл работ “Стабилизирующий отбор и сопряженная изменчивость моногенных и полигенных признаков в популяциях”.

О.Л. Курбатова была в числе авторов коллективной монографии “Динамика генофондов при антропогенных воздействиях” (2004 г., ред. Ю.П. Алтухов), где в разделе, написанном совместно с ее многолетним соавтором Е.Ю. Победоносцевой, сформулированы основополагающие положения демографической генетики. С 2010 г. О.Л. Курбатова читала курс лекций на Биологическом факультете МГУ. В 2014 г. защитила докторскую диссертацию “Демографическая генетика городского населения”. Результаты работ Ольги Леонидовны широко известны в стране и за рубежом, подготовленные ею материалы в числе наиболее значимых научных достижений ИОГен РАН неоднократно пред-

ставлялись высшему руководству страны. Многочисленные публикации в журнале “Генетика” РАН — итоги многолетней работы по демографическим процессам мегаполисов России.

О.Л. Курбатова, будучи блестящим исследователем и настоящим интеллигентом, сочетала научную деятельность с изучением генеалогии своей семьи, имевшей глубокие исторические корни. Она содействовала публикации воспоминаний прадеда — земского врача Рязанской губернии, благодаря ее усилиям увидели свет юношеские мемуары Н.П. Анциферова — одного из основоположников краеведения, с которым она была знакома с раннего детства. Кроме того, О.Л. Курбатова получила в наследство от племянницы искусствоведа Г.К. Вагнера, Кузнецовой Ксении Ксанфиевны, его личный архив. По этим материалам было сделано немало докладов,

один из обзоров был опубликован в коллективной монографии об этом крупном исследователе Древней Руси. Осознавая высокую ценность семейных и наследственных реликвий, Ольга Леонидовна в разное время передала их в ряд музеев Рязани и Рязанской области.

ИОГен РАН и лаборатория популяционной генетики им. академика Ю.П. Алтухова понесли невосполнимую утрату, потеряв в лице Ольги Леонидовны не только основателя демографической генетики и лидера этого направления, но и личность с уникальными человеческими качествами. Отзывчивость и доброта нашей дорогой Ольги, внимание к проблемам коллег, мудрость, неподражаемый юмор, умение вовремя прийти на помощь, ободрить и поддержать в трудную минуту запомнятся коллегам навсегда. Светлая память дорогой Ольге Леонидовне!