

Том 60, Номер 8

ISSN 0016-6758

Август



ГЕНЕТИКА



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 8, 2024

Обзорные и теоретические статьи

Полногеномный анализ в изучении патогенетики задержки роста плода

М.М. Гавриленко, Е.А. Трифонова, В.А. Степанов

3

Генетика микроорганизмов

Молекулярно-генетическая характеристика мутантного штамма

В-162/2 бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

К.С. Бондарева, А.И. Левданская, Н.П. Максимова, Е.Г. Веремеенко

18

Генетика растений

Дифференциация и таксономическая идентификация робуроидных дубов

крымско-кавказского региона по ядерным микросателлитным маркерам

С.А. Семерикова, Х. У. Алиев, В.Л. Семериков

28

Генетика животных

Изучение изменчивости полиморфизма генов кальпастина *CAST*

и андрогенового рецептора *AR* как потенциальных факторов

мясной продуктивности *Rangifer tarandus*

Е.А. Конов, К.А. Курбаков, М.Т. Семина, Ю.А. Столповский, К.А. Лайшев

48

Анализ генетической структуры 29 пород лошадей российской селекции по STR-маркерам

Н.В. Блохина, Л.А. Храброва

54

Полиморфизм российских популяций *Rhopalosiphum padi* L. по ДНК-маркерам

Е.Е. Радченко, И.Н. Анисимова, Н.В. Алпатьева

66

Генетика человека

Исследование полиморфного варианта гена холодового рецептора *TRPM8* (rs7593557)

в 15 популяциях Алтае-Саянского региона, Западной Сибири и Дальнего Востока

М.А. Губина, В.Н. Бабенко, Е.Ю. Губина

74

Роль межгенных взаимодействий в формировании предрасположенности к преэклампсии

А. А. Бабовская, Е. А. Трифонова, В. Н. Сереброва, В. А. Степанов

82

Сходство спектров нуклеотидных замен митохондриальной ДНК человека, реконструированных через одно и многие поколения

Б.А. Малярчук

92

Динамика популяционной структуры населения юга центральной России за 130-летний период.
Миграционные процессы

К.Н. Сергеева, С.Н. Соколов, И.В. Батлуцкая, И.Н. Сорокина

100

Краткие сообщения

Секвенирование и аннотация хлоропластного генома *Triticum militinae* —
“естественного мутанта” тетраплоидной пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk.

А.Р. Кулуев, Р.Т. Матниязов, Б.Р. Кулуев, Л.Ю. Привалов, А.В. Чемерис

118

Генетическая характеристика серой горной кавказской пчелы *Apis mellifera caucasica*

М. Д. Каскинова, Л.Р. Гайфуллина, Е.С. Салтыкова

122

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ В ИЗУЧЕНИИ ПАТОГЕНЕТИКИ ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА

© 2024 г. М. М. Гавриленко¹, *, Е. А. Трифонова¹, В. А. Степанов¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального
исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

*e-mail: maria.gavrilenko@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 19.12.2023 г.

После доработки 06.02.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Задержка роста плода — осложнение беременности, определяемое как неспособность плода реализовать свой генетически обусловленный потенциал роста. Несмотря на высокую социальную и медицинскую значимость этой проблемы, к настоящему времени точный патогенез задержки роста плода не известен, поэтому несомненный интерес представляет анализ молекулярно-генетических механизмов данной патологии в рамках подходов, использующих современные высокопроизводительные технологии массового параллельного секвенирования. В настоящем обзоре мы сконцентрировались на анализе данных, полученных в исследованиях генетической компоненты задержки роста плода, авторами которых использованы технологии массового параллельного секвенирования и осуществлено полнотранскриптомное профилирование. Результаты полногеномного анализа экспрессии генов плацентарной ткани позволяют выделить 1430 дифференциально экспрессирующихся при задержке роста плода и физиологической беременности генов, из которых только 1% найден хотя бы в двух работах. Эти дифференциально экспрессирующиеся гены вовлечены в сигнальный путь Wnt/ β -катенина, который играет важную роль в миграции клеток, формировании нейронных паттернов и органогенезе во время эмбрионального развития. Общие гены ассоциированы как с акушерскими и гинекологическими заболеваниями, так и с различными соматическими состояниями из групп нейродегенеративных, сердечно-сосудистых заболеваний, психических расстройств, что, вероятно, отражает их вовлеченность в развитие постнатальных последствий задержки роста плода. Результаты нашей работы не только указывают на потенциальные молекулярные механизмы и ключевые гены, лежащие в основе задержки роста плода, но также свидетельствует о важной роли ген-генных коммуникаций в механизмах реализации этой патологии: около 30% продуктов всех идентифицированных дифференциально экспрессирующихся генов взаимодействуют между собой в рамках одной генной сети. В целом, полногеномное секвенирование РНК в совокупности с анализом белок-белковых взаимосвязей, представляет собой перспективное направление в исследованиях развития и функционирования плаценты, а также идентификации молекулярно-генетических механизмов заболеваний, связанных с плацентарной недостаточностью, в том числе с задержкой роста плода.

Ключевые слова: задержка роста плода, плацента, полногеномный анализ, массовое параллельное секвенирование, NGS, RNA-seq.

DOI: 10.31857/S0016675824080015 **EDN:** BGELPT

Задержка роста плода (ЗРП) — осложнение беременности, определяемое как неспособность плода реализовать свой генетически обусловленный потенциал роста, имеет высокий удельный вес (более 20%) в структуре акушерских заболеваний и большую социально-экономическую значимость за счет снижения демографических показателей [1]. ЗРП является значимым фактором, обуславливающим материнскую заболеваемость и смертность, более частые случаи недоношенности, мертворождения и неонатальной смертности.

Этиология ЗРП многофакторна и включает в себя широкий спектр различных материнских, фетальных, плацентарных и/или генетических причин [2, 3]. Предполагается, что центральной ролью в патогенезе недостаточного роста плода является снижение маточно-плацентарного кровотока, приводящее к уменьшению площади обмена кислородом и питательными веществами между матерью и плодом как на поверхности ворсинок, так и на поверхности капилляров плода. ЗРП имеет значительные последствия для здоровья и развития

новорожденного. Доказано, что младенцы с ограничением роста восприимчивы к повышенному риску развития респираторного дистресс-синдрома, легочной гипертензии, гипогликемии, гипокальциемии, гипофосфатемии и могут страдать от задержки когнитивных функций, неврологических и психических расстройств в более позднем возрасте [4]. В дальнейшем онтогенезе взрослые склонны к ожирению, гипертензии, диабету 2-го типа, иммунной дисфункции, сокращению продолжительности жизни, а также неврологическим, сердечно-сосудистым, почечным, печеночным и респираторным осложнениям [5].

Несмотря на высокую социальную значимость и серьезные постнатальные последствия, на сегодняшний день точный патогенез ЗРП и биомаркеры, которые могли бы быть использованы для выявления и прогнозирования этого заболевания, изучены недостаточно.

Согласно базе данных DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>, дата обращения 12.10.2023) [6], на сегодняшний день исследовано 1037 генов-кандидатов ЗРП, вовлеченных в различные патофизиологические процессы, включая пролиферацию клеток и апоптоз, транскрипцию, а также механизмы с участием факторов роста, вазоактивных белков и ферментов. Генами с наиболее высоким уровнем ассоциации с ЗРП (score ≥ 0.3) являются *IGF2*, *IGF1R*, *NOS3*, *AGT*, *COMT*, *SAMD9*.

Анализ ассоциаций случай–контроль для ЗРП в различных работах продемонстрировал связь данной акушерской патологии с такими генами, как *IGF2* [7], *IGFBP1* [8], *LRP8* [9], *MMP2*, *MMP9* [10], *STOX1* [11], *SERPINA3* [12], *SNAT2* [13], которые участвуют в дифференцировке клеток эндодермы, имплантации эмбриона и его морфогенезе, позитивной регуляции клеточной пролиферации и физиологическом течении беременности.

Более мощным методом исследования молекулярных механизмов данной патологии беременности являются широкогеномные исследования варибельности РНК и ДНК на микрочипах. На сегодняшний день с целью изучения ЗРП были проведены восемь исследований на РНК-чипах, объектом изучения в которых стала плацентарная ткань [14–21]. При анализе результатов данных работ количество генов, которые изменяют свою экспрессию в группе с ЗРП в сравнении с контрольной группой (далее по тексту ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены), составило 975, из них общими хотя бы для двух исследований были 33 гена (*ACPP*, *ADAMTS19*, *AFF1*, *AREG*, *CHST2*, *CPOX*, *ENG*, *F5*, *FGG*, *FOS*, *FPR3*, *HSD11B1*, *IFNG*, *IGFBP1*, *LEP*, *LGALS14*, *LGR5*, *LRP2*, *MUC15*, *NFE2L3*, *PAPPA2*, *PCDH11X*, *PTPRB*, *RBP1*, *RBP4*, *SH3TC2*, *SLC43A2*, *SPOCK1*, *TCL6*, *TMEM136*, *TREM1*, *UNC13D*, *ZNF554*), связанных

с такими биологическими процессами, как регуляция различных метаболических процессов и иммунный ответ. Стоит отметить, что из этих 33 генов 11 ДЭГ ассоциированы с ЗРП согласно базе данных DisGeNet. Некоторые из этих ДЭГ (*ENG* [22, 23], *F5* [24, 25], *IGFBP1* [26–28], *LEP* [29–31], *PAPPA2* [32]) и их продукты ассоциированы не только с ЗРП, но и с другими патологиями беременности, такими как преэклампсия (ПЭ), спонтанные аборты, отслойка плаценты, преждевременные роды, которые входят в группу больших акушерских синдромов (БАС) [33, 34].

Зачастую результаты исследований ассоциаций полиморфных маркеров генов с ЗРП и анализ варибельности экспрессии не в полной мере отражают представление о молекулярном патогенезе заболевания. Поэтому несомненный интерес в контексте изучения молекулярно-генетических механизмов ЗРП представляет обобщенный анализ данных, полученных с помощью более современной и многообещающей технологии массового параллельного секвенирования (next generation sequencing – NGS).

В настоящее время методы NGS активно используются в области молекулярной медицины и позволяют проводить масштабные разноуровневые исследования, включающие в себя секвенирование всего генома, секвенирование всего экзона с фокусом на белок-кодирующие области, таргетное секвенирование определенных областей, секвенирование РНК для изучения экспрессии генов и идентификации новых транскриптов и эпигенетическое профилирование, которое включает в себя секвенирование паттернов метилирования ДНК или модификаций гистонов, что позволяет получить представление о регуляции экспрессии генов. Данные методы также можно комбинировать с другими генетическими и геномными подходами, например, такими как полногеномные ассоциативные исследования (GWAS).

Массовое параллельное секвенирование, особенно в рамках полногеномного или полнотранскриптомного профилирования, позволяет достаточно быстро и с относительно низкими затратами исследовать большое количество образцов и биомаркеров, предоставляя множество данных, которые могут быть использованы для выявления молекулярных механизмов, а также поиска новых предиктивных РНК-маркеров и геномных вариантов, существенно повышающих риск развития многофакторных заболеваний.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА

В настоящей работе проведен анализ данных, полученных в исследованиях генетической

компоненты ЗРП, авторами которых использована технология массового параллельного секвенирования. Использованы следующие варианты сочетания запросов в поисковой строке баз данных PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, дата обращения 22.02.2023) и Cochrane (<https://www.cochranelibrary.com/>, дата обращения 22.02.2023): “fetal growth restriction”, “fetal growth retardation”, “intrauterine growth restriction”, “next-generation sequencing”, “whole exome sequencing”, “whole genome sequencing”, “human”, “RNA-seq”, “задержка роста плода”, “массовое параллельное секвенирование”, “РНК-секвенирование”. Поиск в PubMed выдал 26 статей, Cochrane – 2. Дальнейшие критерии выбора публикаций были следующими: 1) экспериментальное исследование; 2) материалом является кровь беременной женщины или ее плацента; 3) методом исследования является технология массового параллельного секвенирования; 4) одной из целей авторов была идентификация ДЭГ между профилями экспрессии при физиологической беременности и беременности, окончившейся развитием задержки роста плода.

Данные о проведении секвенирования полного генома, экзоса и метилома при изучении молекулярных механизмов ЗРП не представлены в базах данных, поэтому в дальнейший анализ включены результаты четырех работ, в которых сообщалось о полнотранскриптомном секвенировании плацентарной ткани у пациенток с ЗРП (табл. 1).

При анализе результатов данных работ важно отметить, что количество ДЭГ значительно варьировало (от 28 до 1094). Суммарно в описанных выше исследованиях идентифицировано 1430 плацентарных ДЭГ. При поиске общих генов между этими работами показано практически полное отсутствие репликации результатов. Не обнаружены общие гены для трех и всех четырех исследований, что видно из рис. 1, на котором представлена диаграмма Венна, демонстрирующая всего 16 пересекающихся ДЭГ.

Отсутствие репликации результатов, а также большая вариабельность количества идентифицированных ДЭГ, на наш взгляд, могут быть обусловлены рядом факторов, к которым можно отнести

Таблица 1. Исследования, в которых проведен полнотранскриптомный анализ плацентарной ткани при ЗРП

№	Количество образцов	Материал	Платформа	Анализ дифференциальной экспрессии	Результаты	Топовые гены	Ссылка
1	Контроль = 21, ЗРП = 18	Плацента (ворсины хориона)	HiSeq 2000 (Illumina)	DESeq2, edgeR, ALDEx2	144 ДЭГ (77↑, 67↓)	<i>FSTL3, INHA, NOS2, CILP, TGFB1, FAM26D, GPR34, VANG2, HPGDS, TOX</i>	[35]
2	Контроль = 5, ЗРП = 5	Плацента	HiSeq 4000 (Illumina)	DESeq2, edgeR	28 ДЭГ (10↑, 18↓)	<i>ARMS2, PHBP5, ADAM2, TCHHL1, BTNL9, THEMIS, PTPRN, ADGRE4P, FNDC4, TRAC</i>	[36]
3	Контроль = 2, ЗРП = 5	Плацента* (монохориальная двойня)	HiSeq 2500 (Illumina)	U-критерий Манна – Уитни	1094 ДЭГ (491↑, 603↓)	<i>HBA2, RPL18A, CD164, CANX, CLIP1, RASA1, CSF3R, TCL6, PSMC1P5, CRYAB</i>	[37]
4	Контроль = 155, ЗРП = 56	Плацента	HiSeq 2500, HiSeq 4000 (Illumina)	DESeq2	182 ДЭГ (117↑, 65↓)	<i>IL2RB, CP, NR4A2, NOG, CXCL8, PROK1, SGCA, SLC24A4, POTEF, ABCB1</i>	[38]

так как в работе Awamleh и соавт. использован уровень значимости < 0.01 , тогда как в исследованиях Majewska и Gong p -value составил менее 0.05, в работе Li и соавт. для U -критерия Манна–Уитни за уровень значимости принят $p < 0.05$. В работах Awamleh, Majewska и Gong использована поправка на множественное сравнение Бенджамини – Хохберга, а также учтено изменение кратности $FC > 2$. В исследовании Li и соавт. не была введена поправка, но значение FC также играло роль как и в других работах.

Также отсутствие репликации может быть связано с различными фенотипическими подтипами ЗРП, включенными в эти исследования, которые могут иметь разную молекулярно-генетическую основу. Так, в работе Gong и соавт. [38] авторы классифицировали ЗРП на пять следующих подтипов:

НТ – ребенок с ЗРП, у матери которого было какое-либо гипертензивное расстройство (41 ДЭГ).

РАРРА – ребенок с ЗРП от нормотензивной матери, у которой выявлен аномальный уровень РАРР-А (0 ДЭГ – минимальный показатель среди подтипов).

GV – ребенок с ЗРП, демонстрирующий аномальную скорость роста плода, от нормотензивной матери (67 ДЭГ – максимальный показатель среди подтипов).

UAD – ребенок с ЗРП от нормотензивной матери, у которой наблюдался аномальный маточный кровоток (42 ДЭГ).

UBD – ребенок с ЗРП, у которого наблюдался аномальный кровоток в пуповине, от нормотензивной матери (40 ДЭГ).

Используя DESeq2, авторы идентифицировали суммарно 182 ДЭГ при задержке роста плода, причем в группе РАРРА не обнаружены гены, изменяющие свою экспрессию в сравнении с контролем. Стоит отметить, что три группы из пяти (GV, НТ, UBD) имели только один общий ген – *HLA-DRB5*, продукт которого играет центральную роль в иммунной системе, предоставляя ей пептиды, полученные из внеклеточных белков. Также группа GV и группа UAD имели четыре общих ДЭГ (*DEFA3*, *DIO2*, *HTRA4*, *IL2RB*), группы GV и UBD – один общий ген (*EGLN3*), группы НТ и UBD – один общий ДЭГ (*DNAJC27*). Таким образом, авторы продемонстрировали вариабельность экспрессии генов в подтипах ЗРП, что свидетельствует о важности указанных выше характеристик при сборе материала для формирования однородной выборки.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЩИХ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ГЕНОВ И ИХ РОЛИ В РАЗВИТИИ ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА

Как уже отмечалось выше, в проведенном нами анализе обобщения данных идентифицированы только 16 общих ДЭГ, полученных в полнотранскриптомных исследованиях ЗРП. Нами проведен анализ этих генов, их продуктов и функций в таких базах данных, как Entrez [42] и UniProt (<https://www.uniprot.org/>) [43] (табл. 2).

Из представленных 16 общих ДЭГ только один locus является белок-некодирующим, это ген *MALAT1*, также известный как *NEAT2*, представляющий собой редко подвергающуюся сплайсингу некодирующую РНК, которая высоко консервативна среди млекопитающих и высоко экспрессируется в ядре; продукты остальных ДЭГ являются трансмембранными белками, рецепторами, интегральными белками и др.

Для поиска репродуктивных заболеваний, которые могут быть связаны с общими генами, мы провели анализ литературных данных. Результаты свидетельствуют, что 12 из 16 общих ДЭГ (*BTNL9*, *C7*, *CST6*, *FAT2*, *MALAT1*, *MYH10*, *PLEC*, *PTPRF*, *RBPJ*, *SEMA6D*, *TMC6*, *TUBA1C*) ассоциированы с такими влияющими на репродукцию заболеваниями как синдром поликистозных яичников, преждевременная недостаточность яичников, эндометриоз, рак яичников (рис. 2). И только для пяти генов показана связь с патологическим течением беременности в других работах, краткое обсуждение результатов которых будет представлено ниже. Интересным также представляется тот факт, что, согласно базе данных DisGeNet, 13 из 16 общих ДЭГ имеют ассоциации с различными соматическими патологиями, а именно чаще всего с раками различной локализации (желудка, молочных желез, печени, пищевода, предстательной железы), аутоиммунными и дерматологическими заболеваниями, а также с врожденными пороками развития, что согласуется с исследованиями о наличии сердечно-сосудистых, неврологических и психических осложнений во взрослом возрасте у рожденных с ЗРП [4, 5].

Ген *BTNL9* обеспечивает активность связывания сигнальных рецепторов и вероятно участвует в сигнальном пути Т-клеточных рецепторов и регуляции выработки цитокинов. Этот ген ассоциирован с ЗРП в работе, посвященной изучению плацентарной ткани на микрочипах [44], и с ПЭ в полнотранскриптомном исследовании плаценты [45]. Ген компонента комплемента *C7* вносит вклад в развитие ранней ПЭ, согласно исследованию Nevalainen и коллег [46], которые сравнивали на микрочипах дифференциальную экспрессию генов ворсин хориона, полученных от женщин с

ранней и поздней ПЭ и физиологическим течением беременности. Интересным представляется транскрипт-1 аденокарциномы легкого, ассоциированный с метастазированием (*MALAT1*), – длинная некодирующая РНК, которая функционирует как ключевой регулятор разнообразных клеточных процессов. В исследовании Wang и соавт. 2019 г. [47] обнаружена взаимосвязь между сниженным уровнем *MALAT1* и привычным невынашиванием беременности; также продемонстрировано, что как

функциональная lncRNA *MALAT1* контролирует клеточную пролиферацию, апоптоз, миграцию, инвазию и модулирует образование кровеносных сосудов [48]. В работе Ou и соавт. показано, что *MALAT1* способствует развитию гипертензии, вызванной беременностью, усиливая окислительный стресс и воспаление посредством регуляции микроРНК [49]. В ряде исследований обнаружена ассоциация с инвазией цитотрофобласта и децидуализацией эндометрия, что может играть роль

Таблица 2. Общие идентифицированные ДЭГ и их продукты в полнотранскриптомных исследованиях при ЗРП и физиологической беременности

Ген (локализация)	Продукт	Основные функции
<i>BTNL9</i> (5q35.3)	Бутирофилиноподобный белок 9	Участвует в сигнальном пути Т-клеточных рецепторов и регуляции выработки цитокинов
<i>C7</i> (5p13.1)	Компонент C7 системы комплемента	Играет значимую роль в иммунном ответе
<i>CST6</i> (11q13.1)	Ингибитор цистеиновой протеазы	Участвует в регуляции ороговения эпидермиса и ингибировании онкогенеза
<i>FAT2</i> (5q33.1)	Белок суперсемейства кадгеринов	Участвует в регуляции миграции клеток
<i>IL36RN</i> (2q14.1)	Антагонист рецептора интерлейкина 36	Ингибирует активность воспалительного интерлейкина-36
<i>MALAT1 (NEAT2)</i> (11q13.1)	Транскрипт-1, ассоциированный с метастазированием аденокарциномы легкого	Действует как регулятор транскрипции генов, включая участвующие в онкогенезе
<i>MYH10</i> (17p13.1)	Тяжелая цепь миозина	Играет роль в реорганизации цитоскелета, формировании фокальных контактов
<i>OS9</i> (12q13.3-q14.1)	Лектин эндоплазматического ретикулума	Участвует в контроле качества эндоплазматического ретикулума
<i>PLEC</i> (8q24.3)	Плектин	Связывает промежуточные нити с микротрубочками и микрофиламентами
<i>PTPRF</i> (1p34.2)	Рецепторная тирозинпротеинфосфатаза	Обладает внутренней активностью белковой тирозинфосфатазы
<i>RBPJ</i> (4p15.2)	Белок, связывающий сигнал рекомбинации для области иммуноглобулина Карпа J	Транскрипционный регулятор, который играет центральную роль в передаче сигналов Notch
<i>SEMA6D</i> (15q21.1)	Семафорин 6D	Участвует в поддержании и ремоделировании нейронных связей
<i>SLC1A6</i> (19p13.12)	Транспортер глутамата	Натрий-зависимый, высокоаффинный переносчик аминокислот
<i>SMIM5</i> (17q25.1)	Малый интегральный белок	Вероятный неотъемлемый компонент мембраны
<i>TMC6</i> (17q25.3)	Трансмембранный каналоподобный белок	Вероятный ионный канал
<i>TUBA1C</i> (12q13.12)	Цепь альфа-1С тубулина	Тубулин является основным компонентом микротрубочек

Литературные данные		DisGeNet (заболевание, score ≥ 0.300)	
Акушерские заболевания	Задержка роста плода	<i>BTNL9, RBPJ</i>	<i>C7, IL36RN, RBPJ</i> Аутоиммунные заболевания
	ПНБ	<i>MALAT1, MYH10, RBPJ</i>	<i>MYH10, RBPJ, PTPRF</i> Врожденные пороки
	Преэклампсия	<i>BTNL9, C7, MALAT1</i>	<i>IL36RN, PLEC, TMC6</i> Дерматологические заболевания
Гинекологические заболевания	Лейомиома	<i>CST6</i>	<i>CST6, FAT2, MALAT1, PTPRF, TUBA1C</i> Онкологические заболевания
	ПНЯ	<i>SEMA6D</i>	<i>SEMA6D, SLC1A6</i> Психические расстройства
	СПКЯ	<i>MALAT1, TUBA1C</i>	<i>C7, SEMA6D</i> Цирроз печени
	Эндометриоз	<i>MALAT1</i>	<i>MYH10</i> Болезни почек
Онкогинекология	Рак шейки матки	<i>CST6, RBPJ, TMC6</i>	<i>FAT2</i> Нейродегенеративные заболевания
	Рак эндометрия	<i>FAT2</i>	<i>TUBA1C</i> Сердечно-сосудистые заболевания
	Рак яичников	<i>MALAT1, MYH10, PLEC, PTPRF</i>	

Наиболее часто встречающиеся

Наименее часто встречающиеся

Рис. 2. Анализ ассоциаций 16 ДЭГ с различными заболеваниями согласно литературным данным и базе данных DisGeNet. ПНБ – привычное невынашивание беременности; ПНЯ – преждевременная недостаточность яичников; СПКЯ – синдром поликистозных яичников. Оценка score DisGeNET учитывает количество источников, сообщающих об ассоциации, тип кураторства каждого из этих источников, модели животных, на которых изучалась ассоциация, и количество подтверждающих публикаций. Оценка варьируется от 0 до 1 и дает наивысшую ценность ассоциациям, о которых сообщают несколько баз данных и с большим количеством вспомогательных публикаций. Высоким считается score > 0.3 .

в патогенезе преэклампсии [50–52]. Ген *MYH10* способствует опосредованной миграции клеток и инвазии цитотрофобласта при взаимодействии с предимплантационным фактором PIF [53]. Наиболее интересным представляется ген *RBPJ*, продукт которого является ключевым фактором транскрипции в сигнальном пути всех четырех Notch-рецепторов млекопитающих. Есть исследования, которые демонстрируют участие этого гена и его белка в морфогенезе плаценты [54], имплантации [55], а также показана связь с привычным невынашиванием беременности [56]. Стоит отметить, что в исследовании, проведенном Chi и соавт. в 2017 г., показано снижение экспрессии транскрипционного фактора *RBPJ* в плаценте, подверженной ЗРП [57].

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ БАЗ ДАННЫХ

Необходимо отметить, что подробная аннотация кластера дифференциально экспрессирующихся генов была представлена только в работах Majewska и Gong, поэтому с помощью ресурса WebGestalt (<https://www.webgestalt.org/>) [58] и базы

данных GeneOntology (<https://geneontology.org/>) [59] мы провели анализ обогащения категорий биологических процессов, в которые вовлечены ДЭГ, идентифицированные в каждой из рассматриваемых работ, и сопоставили их между собой. Мы обнаружили совершенно различные сигнальные пути, представленные в табл. 3. Так, ДЭГ из исследования Awamleh и соавт. связаны с клеточной секрецией и вовлечены в эмбриогенез, ассоциацию с которым продемонстрировали и гены из работы Gong и соавт. ДЭГ из работы Li и соавт. активно участвуют в процессах сборки и локализации белков. В работе Majewska и соавт. гены вовлечены в Т-клеточный иммунный ответ, который играет важную роль в поддержании физиологической беременности. Примечательно, что при анализе патологических путей с помощью базы данных KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) [60] установлена связь с дифференцировкой Т-хелперов 1-го, 2-го и 17-го типов (*hsa04658*, *hsa04659*) для ДЭГ, идентифицированных в двух работах из четырех [35, 36]. Известно, что Т-хелперы 1-го типа (Th1), характеризующиеся иммунно-воспалительными реакциями, способствуют инвазии цитотрофобласта, а вскоре после имплантации на передний план выходят противовоспалительные Т-хелперы 2-го типа

(Th2), в то время как Т-хелперы 17-го типа (Th17) индуцируют защитный иммунитет против вирусов и бактерий во время беременности [61].

Затем с помощью ресурса WebGestalt мы осуществили дополнительный анализ функциональной обогащенности кластера генов, объединив в один массив все 1430 ДЭГ, ассоциированных с ЗРП в рассматриваемых работах. На рис. 3 показаны результаты анализа обогащения 1430 ДЭГ согласно базе данных GeneOntology.

Для всех генов выявлено десять значимых биологических путей ($FDR < 0.05$), в шести из них задействованы несколько из обнаруженных нами 16 общих ДЭГ (*MYH10*, *OS9*, *TUBA1C*), связанных с локализацией клеточных макромолекул (GO:0070727), катаболическим процессом макромолекул (GO:0009057) и внутриклеточным транспортом (GO:0046907). Известно, что в различных клетках плацентарной ткани постоянно происходят процессы биосинтеза, метаболизма и транспортировки биологических молекул, например, таких как холестерин [62]. Показано, что накопление

холестерина в синцитиотрофобласте и дефекты в его транспортировке ухудшают лизосомальную и митохондриальную функции клеток, что может привести к окислительному стрессу, который является важным фактором многих осложнений беременности, включая преэклампсию и задержку роста плода [63, 64]. Стоит отметить, что только в трех значимых биологических путях из десяти задействованы гены из всех четырех исследований. Этими путями являются симбиотический процесс (GO:0044403), межвидовое взаимодействие между организмами (GO:0044419) и вирусный процесс (GO:0016032), которые также имеют максимальные коэффициенты обогащения в проведенном нами анализе. Вероятнее всего, все три данные категории ассоциированы с молекулярными механизмами ЗРП, связанными с влиянием вирусных инфекций на течение беременности и развитие плода. Вирусы редко проникают через плацентарный барьер, но когда вирус все же достигает плода, это может привести к серьезным врожденным дефектам, таким как микроцефалия или даже гибель

Таблица 3. Биологические пути для ДЭГ, идентифицированных в полнотранскриптомных исследованиях при ЗРП и физиологической беременности*

Автор, год	Источник	Основные биологические процессы GeneOntology, топ-5 для каждого из исследований
Awamleh et al., 2019	[35]	GO:0046903: Секреция
		GO:0032940: Клеточная секреция
		GO:0001775: Активация клеток
		GO:0008654: Процесс биосинтеза фосфолипидов
		GO:0060029: Конвергенция при эмбриональном органогенезе
Majewska et al., 2019	[36]	GO:0030217: Дифференцировка Т-клеток
		GO:0050852: Сигнальный путь Т-клеточного рецептора
		GO:0042110: Активация Т-клеток
		GO:0050851: Сигнальный путь, опосредованный антигенным рецептором
		GO:0030098: Дифференцировка лимфоцитов
Li et al., 2020	[37]	GO:0070727: Локализация клеточных макромолекул
		GO:0034613: Локализация клеточного белка
		GO:0046907: Внутриклеточный транспорт
		GO:0016071: Метаболический процесс мРНК
		GO:0006886: Внутриклеточный транспорт белка
Gong et al., 2021	[38]	GO:0048754: Ветвящийся морфогенез эпителиальной трубки
		GO:0035239: Морфогенез трубок (эпителиальных и эндотелиальных)
		GO:0048514: Морфогенез кровеносных сосудов
		GO:0006928: Перемещение клетки или субклеточного компонента
		GO:0061138: Морфогенез ветвящегося эпителия

Примечание. * Приводятся категории, для которых уровень значимости составил $p < 0.01$.

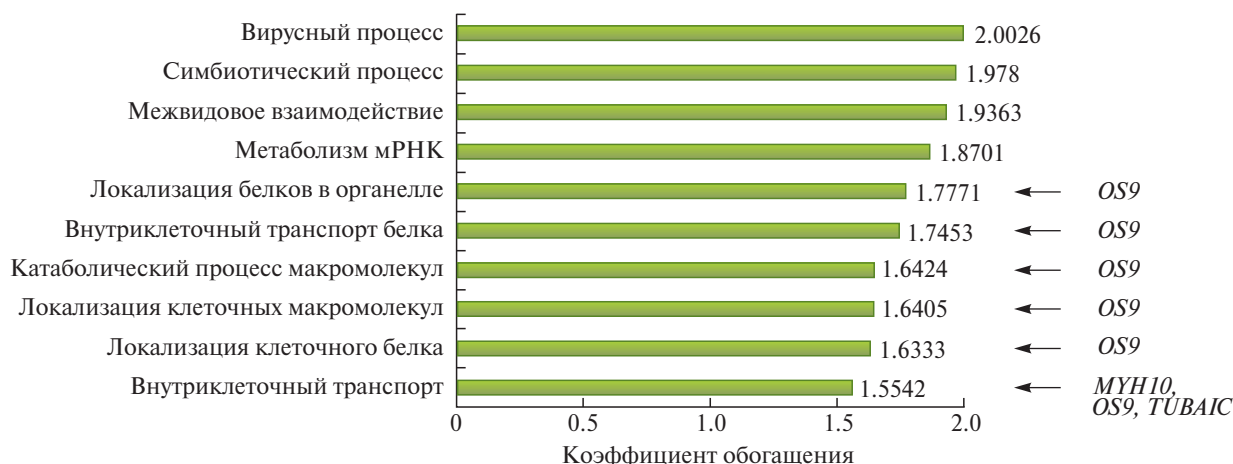


Рис. 3. Анализ обогащения для общего массива из 1430 ДЭГ полнотранскриптомных исследований ЗРП.

плода. Хорошо известно, что вирусная инфекция, затронувшая клетки на границе раздела мать—плод, может повлиять на функционирование плаценты и привести к осложнениям беременности, включая ЗРП. Наиболее распространенными вирусами, выявленными на сегодняшний день на границе между матерью и плодом, являются цитомегаловирус, вирус простого герпеса и аденоассоциированный вирус. Цитотрофобласт первого триместра беременности, инфицированный одним из вышеуказанных вирусов, демонстрирует сниженную клеточную инвазию в децидуальную оболочку, повышенный апоптоз, снижение секреции хорионического гонадотропина человека, что впоследствии может привести к ЗРП, ПЭ и спонтанному аборт [65]. Стоит отметить, что только в одной из рассматриваемых нами работ [35] строго прописывалось исключение каких-либо инфекций у обследованных пациентов, поэтому существует вероятность того, что в трех других исследованиях развитие ЗРП ассоциировано с персистенцией какого-либо вируса.

АНАЛИЗ СЕТЕВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ

Анализ реконструированной с использованием программ STRING (<https://string-db.org/>) [66] и NetworkAnalyst (<https://www.networkanalyst.ca/>) [67] белок-белковой сети (рис. 4), включающей 424 продукта 1430 ДЭГ, свидетельствует о высокой степени их взаимодействий (более 500 парных взаимодействий имеют значения коэффициента *combined_score* ≥ 0.99). Центральное место в построенной сети с максимальным числом и силой взаимодействий (*node_degree* ≥ 30 , *score* ≥ 0.99) занимают следующие семь генов: *UBC*, *RPS3*, *RACK1*, *RPS9*, *RPL4*, *CDC42*, *FAU*, ассоциированные согласно аннотации сигнальных путей в базах данных KEGG и Reactome (<https://reactome.org/>) [68]

с элонгацией и терминацией трансляции у эукариот, сигнальным путем VEGF, различными вирусными и бактериальными инфекционными путями, а также с регуляцией экспрессии белков Slit и Robo, модулирующих ангиогенез и адгезию клеток, опосредованную Е-кадгеринами [69]. Примечательно, что ДЭГ всех четырех исследований взаимодействуют между собой не только в одной генной сети в целом, но и в отдельно взятом кластере в частности. Например, в кластере, выделенном на рис. 4, между собой взаимодействуют: ген *CDC42* [39], участвующий в ингибировании пролиферации и миграции цитотрофобласта [70]; ген *MUC1* [37], продукт которого является компонентом гликокаликса в эндометрии и может играть важную роль в формировании “окна имплантации” эмбриона [71]; белок, кодируемый геном *LCK* [38], является ключевой сигнальной молекулой в отборе и созревании развивающихся Т-лимфоцитов [72]; и рецептор интерлейкина 2 — *IL2RB* [40], участвует в опосредованных Т-клетками иммунных реакциях [73]. Нарушение экспрессии продуктов этих генов может приводить к различным патологиям беременности, в том числе спонтанному аборт, привычному невынашиванию беременности, преэклампсии и задержке роста плода через механизмы инвазии цитотрофобласта и регуляции Т-клеточного иммунитета.

Интересным представляется то, что гены, являющиеся звеньями описанной выше сети, а также некоторые биологические пути соотносятся с данными ранее проведенного исследования [74], в котором был изучен ландшафт событий альтернативного сплайсинга транскриптома децидуальных клеток плацентарной ткани пациенток с физиологическим течением беременности. В указанной работе гены, кодирующие большие и малые субединицы рибосомного белка (RPL и RPS соответственно), также заняли значимое место в сети

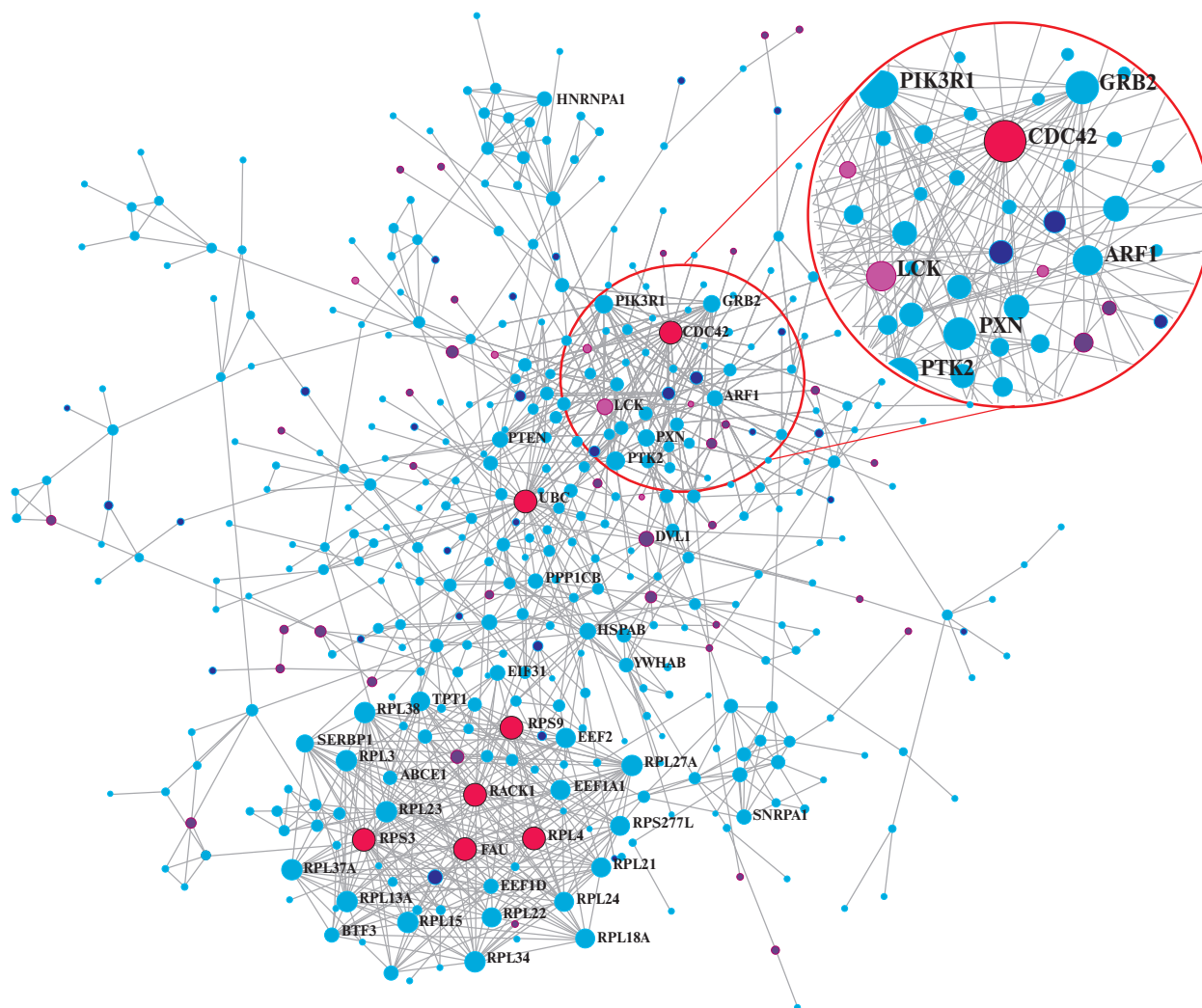


Рис. 4. Сеть белок-белковых взаимодействий продуктов дифференциально экспрессирующихся генов в плацентарной ткани при ЗРП (красный цвет — центральные гены сети; фиолетовый, сиреневый, голубой и синий цвета — гены из исследований Awamleh [35], Majewska [36], Li [37], Gong [38] соответственно).

белок-белковых взаимодействий, но все они кодируют другие белковые подсубъединицы, за исключением гена *RPS9*, являющегося центральным в сети как описываемого исследования, так и в сети взаимодействий настоящей работы. Также имеет место быть совпадение сигнальных путей, ассоциированных с элонгацией трансляции у эукариот, а также регуляцией белков Slit и Robo, упоминаемых выше. Можно предположить, что альтернативный сплайсинг играет важную роль в развитии ЗРП и последующие работы могут внести вклад в более полное понимание такого молекулярного механизма патогенеза.

Таким образом, использование генных сетей является эффективным методом анализа как ген-генных, так и белок-белковых взаимодействий [75]. Эффективный сетевой анализ позволил выявить неочевидные на первый взгляд взаимодействия между ДЭГ, выявленными в

полнотранскриптомных работах, объектом исследования в которых стала плацентарная ткань при ЗРП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье впервые приводятся обобщенные данные о полученных с помощью технологии NGS результатах в исследованиях, посвященных изучению молекулярно-генетических механизмов задержки роста плода. Работы, в которых генетическая архитектура ЗРП исследована с помощью полноэкзомного или полногеномного секвенирования, на данный момент отсутствуют, но проведены единичные полнотранскриптомные исследования плацентарной ткани, что свидетельствует о необходимости расширения исследований с применением технологии массового параллельного секвенирования в данной области.

Результаты четырех полнотранскриптомных исследований при ЗРП очень разнятся, среди 1430 идентифицированных ДЭГ только 1.12% генов (*BTNL9*, *C7*, *CST6*, *FAT2*, *IL36RN*, *MALAT1*, *MYH10*, *OS9*, *PLEC*, *PTPRF*, *RBPJ*, *SEMA6D*, *SLC1A6*, *SMIM5*, *TMC6*, *TUBA1C*) между рассматриваемыми работами пересекаются, что может быть связано с разными критериями включения и исключения, отличиями в анализируемых плацентарных регионах, подходом к проведению секвенирования и строгостью критериев при статистическом анализе. Таким образом, при проведении полногеномного экспрессионного анализа немаловажно учитывать подтипы ЗРП и формировать максимально близкие по клиническим параметрам группы, что обуславливает значимость разработок детальных критериев определения пациентов в ту или иную когорту в данных работах. Стоит отметить, что при формировании выборок необходимо учитывать наличие вирусных инфекций у матери из-за их негативного влияния как на развитие плаценты, так и на рост плода.

Показано, что клеточная гетерогенность плаценты является весьма высокой, в связи с чем последующие полнотранскриптомные исследования плацентарной ткани должны быть сфокусированы в области анализа транскриптома одиночных клеток (Single-cell RNA sequencing). Более того, транскриптомное профилирование отдельных субпопуляций клеток материнской крови в сочетании с анализом экспрессии генов клеток плацентарной ткани может быть гораздо более эффективным для выявления как плацентарных, так и материнских молекулярных факторов, определяющих развитие ЗРП и характеризующих ее клинические фенотипы.

Необходимо подчеркнуть, что использование метода NGS позволяет выявлять новые гены-кандидаты, которые ранее не рассматривались как ассоциированные с ЗРП. Так, проведя анализ результатов четырех полнотранскриптомных исследований, мы выявили, что количество идентифицированных в них генетических маркеров составило 1430, из которых только 95 генов ассоциированы с ЗРП согласно базе данных DisGeNET, включая такие известные биомаркеры акушерских патологий как *ENG*, *HIF1A*, *IGF2*, *INHA*, *NOS3*, *PIGF*. Стоит отметить, что 14 из 16 общих ДЭГ (*C7*, *CST6*, *FAT2*, *IL36RN*, *MALAT1*, *MYH10*, *OS9*, *PLEC*, *PTPRF*, *SEMA6D*, *SLC1A6*, *SMIM5*, *TMC6*, *TUBA1C*) в анализируемых работах являются совершенно новыми маркерами для ЗРП и ассоциированы с иммунологическими, дерматологическими и психоневрологическими заболеваниями, а также раком различных локализаций. Интересным представляется тот факт, что ДЭГ всех четырех исследований взаимодействуют между собой в одной генной сети, которая включает в себя 424 звена. Анализ

сети регуляции генов представляется актуальным инструментом, который описывает биологические взаимодействия между генами и обеспечивает систематическое понимание клеточных сигнальных и регуляторных процессов. Нами показано, что дифференциально экспрессирующиеся гены из включенных в анализ работ участвуют в процессах воспаления и иммунном ответе, ассоциированы с эмбриональным развитием, активно участвуют в процессах сборки и локализации белков. Примечательно, что совпадающих категорий биологических процессов между работами нет, но если оценивать патологические пути в целом для единого массива генов, то общие ДЭГ задействованы, в первую очередь, в сигнальном пути Wnt/ β -катенина, который играет критическую роль в миграции клеток, формировании нейронных паттернов и органогенезе во время эмбрионального развития. Несмотря на то что дизайн нашего исследования построен на изучении исследований с изолированной ЗРП, некоторые гены ранее были идентифицированы как дифференциально экспрессирующиеся при других патологиях беременности, таких как преэклампсия и привычное невынашивание беременности, а также с такими онкогинекологическими заболеваниями, как рак яичников и рак шейки матки.

Анализ плацентарного транскриптома методами NGS в совокупности с другими современными подходами, например, такими как изучение метилома и протеома, представляет собой перспективное направление в исследованиях плаценты, ее развития и функционирования, а также в идентификации молекулярно-генетических механизмов, приводящих к возникновению заболеваний, связанных с плацентарной недостаточностью, в том числе и к задержке роста плода.

Исследование выполнено за счет средств Государственного задания по теме ФНИ № 122020200083-8.

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. Sharma D., Shastri S., Sharma P. Intrauterine growth restriction: antenatal and postnatal aspects // Clin. Med. Insights: Pediatrics. 2016. V. 10. P. 67–83. <https://doi.org/10.4137/CMPed.S40070>
2. Leftwich H.K., Stetson B., Sabol B. et al. Growth restriction: Identifying fetuses at risk // J. Maternal-Fetal and Neonatal Med. 2018. V. 31. № 15. P.

- 1962–1966.
<https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1332040>
3. *Salmeri N., Carbone I.F., Cavoretto P.I. et al.* Epigenetics beyond fetal growth restriction: A comprehensive overview // *Mol. Diagnosis and Therapy*. 2022. V. 26. № 6. P. 607–626.
<https://doi.org/10.1007/s40291-022-00611-4>
 4. *Yzydorczyk C., Armengaud J.B., Peyter A.C. et al.* Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: Cardiovascular and renal consequences and preventive approaches // *J. Developmental Origins Health and Disease*. 2017. V. 8. № 4. P. 448–464.
<https://doi.org/10.1017/S2040174417000265>
 5. *Bendix I., Miller S.L., Winterhager E.* Causes and consequences of intrauterine growth restriction // *Front. Endocrinol.* 2020. V. 11. P. 205.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00205>
 6. *Piñero J., Ramírez-Anguita J.M., Saüch-Pitarch J. et al.* The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. № D1. P. D845–D855.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz1021>
 7. *Antonazzo P., Alvino G., Cozzi V. et al.* Placental IGF2 expression in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancies // *Placenta*. 2008. V. 29. № 1. P. 99–101.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.06.010>
 8. *Gupta M.B., Abu Shehab M., Nygard K. et al.* IUGR is associated with marked hyperphosphorylation of decidual and maternal plasma IGFBP-1 // *The J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*. 2019. V. 104. № 2. P. 408–422.
<https://doi.org/10.1210/jc.2018-00820>
 9. *Wang L., Wang X., Laird N. et al.* Polymorphism in maternal LRP8 gene is associated with fetal growth // *The Am. J. Human Genet.* 2006. V. 78. № 5. P. 770–777.
<https://doi.org/10.1086/503712>
 10. *Gremlich S., Nguyen D., Reymondin D. et al.* Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk // *J. Reproductive Immunol.* 2007. V. 74. № 1–2. P. 143–151.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.02.001>
 11. *Berends A.L., Bertoli-Avella A.M., De Groot C.J.M. et al.* STOX1 gene in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction // *BJOG: An Intern. J. Obstetrics and Gynaecol.* 2007. V. 114. № 9. P. 1163–1167.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2007.01414.x>
 12. *Chelbi S.T., Wilson M.L., Veillard A.C. et al.* Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA3 expression and its association with placental diseases // *Human Mol. Genet.* 2012. V. 21. № 9. P. 1968–1978.
<https://doi.org/10.1093/hmg/dds006>
 13. *Mandò C, Tabano S., Pileri P. et al.* SNAT2 expression and regulation in human growth-restricted placentas // *Pediatric Res.* 2013. V. 74. № 2. P. 104–110.
<https://doi.org/10.1038/pr.2013.83>
 14. *McMinn J., Wei M., Schupf N. et al.* Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction // *Placenta*. 2006. V. 27. № 6–7. P. 540–549.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.07.004>
 15. *Sitras V., Paulssen R., Leirvik J. et al.* Placental gene expression profile in intrauterine growth restriction due to placental insufficiency // *Reproductive Sci.* 2009. V. 16. № 7. P. 701–711.
<https://doi.org/10.1177/1933719109334256>
 16. *Struwe E., Berzl G., Schild R. et al.* Microarray analysis of placental tissue in intrauterine growth restriction // *Clin. Endocrinology*. 2010. V. 72. № 2. P. 241–247.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03659.x>
 17. *Nishizawa H., Ota S., Suzuki M. et al.* Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction // *Reproductive Biol. and Endocrinol.* 2011. V. 9. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-107>
 18. *Guo L., Tsai S.Q., Hardison N.E. et al.* Differentially expressed microRNAs and affected biological pathways revealed by modulated modularity clustering (MMC) analysis of human preeclamptic and IUGR placentas // *Placenta*. 2013. V. 34. № 7. P. 599–605.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.04.007>
 19. *Sabri A., Lai D., D'silva A. et al.* Differential placental gene expression in term pregnancies affected by fetal growth restriction and macrosomia // *Fetal Diagnosis and Therapy*. 2014. V. 36. № 2. P. 173–180.
<https://doi.org/10.1159/000360535>
 20. *Madeleneau D., Buffat C., Mondon F. et al.* Transcriptomic analysis of human placenta in intrauterine growth restriction // *Ped. Research*. 2015. V. 77. № 6. P. 799–807.
<https://doi.org/10.1038/pr.2015.40>
 21. *Medina-Bastidas D., Guzmán-Huerta M., Borboa-Olivares H. et al.* Placental microarray profiling reveals common mRNA and lncRNA expression patterns in preeclampsia and intrauterine growth restriction // *Intern. J. Mol. Sciences*. 2020. V. 21. № 10.
<https://doi.org/10.3390/ijms21103597>
 22. *Margioulas-Siarkou G., Margioulas-Siarkou S., Petousis S. et al.* The role of endoglin and its soluble form in pathogenesis of preeclampsia // *Mol. and Cell. Biochemistry*. 2022. V. 477. № 2. P. 479–491.
<https://doi.org/10.1007/s11010-021-04294-z>
 23. *Jeyabalan A., McGonigal S., Gilmour C. et al.* Circulating and placental endoglin concentrations in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and preeclampsia // *Placenta*. 2008. V. 29. № 6. P. 555–563.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.03.006>
 24. *Khidri F.F., Waryah Y.M., Ali F.K. et al.* MTHFR and F5 genetic variations have association with

- preeclampsia in Pakistani patients: A case control study // BMC Med. Genetics. 2019. V. 20. № 1. P. 163.
https://doi.org/10.1186/s12881-019-0905-9
25. *Kujovich J.L.* Factor V Leiden thrombophilia // Genetics in Medicine. 2011. V. 13. № 1. P. 1–16.
https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181faa0f2
 26. *Peng X., He D., Peng R. et al.* Associations between IGFBP1 gene polymorphisms and the risk of preeclampsia and fetal growth restriction // Hypertension Res. 2023. V. 46. № 9. P. 2070–2084.
https://doi.org/10.1038/s41440-023-01309-8
 27. *Tchirikov M., Schlabritz-Loutsevitch N., Maher J. et al.* Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome // J. Perinatal Med. 2018. V. 46. № 5. P. 465–488.
https://doi.org/10.1515/jpm-2017-0027
 28. *Dogić L.M., Mičić D., Omeragić F. et al.* IGFBP-1 marker of cervical ripening and predictor of preterm birth // Med. Glasnik. 2016. V. 13. № 2. P. 118–124.
https://doi.org/10.17392/856-16
 29. *Aisagbonhi O., Bui T., Nasamran C.A. et al.* High placental expression of FLT1, LEP, PHYHIP and IL3RA—In persons of African ancestry with severe preeclampsia // Placenta. 2023. V. 144. P. 13–22.
https://doi.org/10.1016/j.placenta.2023.10.008
 30. *Chen S., Ke Y., Chen W. et al.* Association of the LEP gene with immune infiltration as a diagnostic biomarker in preeclampsia // Frontiers in Mol. Biosciences. 2023. V. 10.
https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1209144
 31. *Trifonova E.A., Gabidulina T.V., Ershov N.I. et al.* Analysis of the placental tissue transcriptome of normal and preeclampsia complicated pregnancies // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 2. P. 71–83.
 32. *Macintire K., Tuohey L., Ye L. et al.* PAPP2 is increased in severe early onset pre-eclampsia and upregulated with hypoxia // Reproduction, Fertility and Development. 2014. V. 26. № 2. P. 351–357.
https://doi.org/10.1071/RD12384
 33. *Brosens I., Pijnenborg R., Vercruysse L. et al.* The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation // Am. J. Obstetrics and Gynecology. 2011. V. 204. № 3. P. 193–201.
https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.08.009
 34. *Di Renzo G.C.* The great obstetrical syndromes // The J. Maternal-Fetal and Neonatal Med. 2009. T. 22. № 8. P. 633–635.
https://doi.org/10.1080/14767050902866804
 35. *Awamleh Z., Gloor G.B., Han V.K.M.* Placental microRNAs in pregnancies with early onset intrauterine growth restriction and preeclampsia: Potential impact on gene expression and pathophysiology // BMC Med. Genomics. 2019. V. 12. № 1. P. 91.
https://doi.org/10.1186/s12920-019-0548-x
 36. *Majewska M., Lipka A., Pauksto L. et al.* Placenta transcriptome profiling in intrauterine growth restriction (IUGR) // Intern. J. Mol. Sciences. 2019. V. 20. № 6. P. 1510.
https://doi.org/10.3390/ijms20061510
 37. *Li W., Chung C.Y.L., Wang C.C. et al.* Monochorionic twins with selective fetal growth restriction: Insight from placental whole-transcriptome analysis // Am. J. Obstetrics and Gynecology. 2020. V. 223. № 5. P. 749.e1–749.e16.
https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.05.008
 38. *Gong S., Gaccioli F., Dopierala J. et al.* The RNA landscape of the human placenta in health and disease // Nat. Communications. 2021. V. 12. № 1. P. 2639.
https://doi.org/10.1038/s41467-021-22695-y
 39. *Sood R., Zehnder J.L., Druzin M.L. et al.* Gene expression patterns in human placenta // Proc. Nat. Acad. Sci. 2006. V. 103. № 14. P. 5478–5483.
https://doi.org/10.1073/pnas.0508035103
 40. *Suryawanshi H., Morozov P., Straus A. et al.* A single-cell survey of the human first-trimester placenta and decidua // Sci. Advances. 2018. V. 4. № 10. P. eaau4788.
https://doi.org/10.1126/sciadv.aau4788
 41. *Love M.I., Huber W., Anders S.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biology. 2014. V. 15. № 12. P. 1–21.
https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8
 42. *Maglott D., Ostell J., Pruitt K.D. et al.* Entrez gene: Gene-centered information at NCBI // Nucl. Acids Res. 2005. V. 35. P. D54–D58.
https://doi.org/10.1093/nar/gkl193
 43. *Apweiler R., Bairoch A., Wu C.H. et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. D115–D119.
https://doi.org/10.1093/nar/gkw91099
 44. *Dunk C.E., Roggensack A.M., Cox B. et al.* A distinct microvascular endothelial gene expression profile in severe IUGR placentas // Placenta. 2012. V. 33. № 4. P. 285–293.
https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.12.020
 45. *Kaartokallio T., Cervera A., Kyllönen A. et al.* Gene expression profiling of pre-eclamptic placentae by RNA sequencing // Sci. Reports. 2015. V. 5.
https://doi.org/10.1038/srep14107
 46. *Nevalainen J., Skarp S., Savolainen E.R. et al.* Intrauterine growth restriction and placental gene expression in severe preeclampsia, comparing early-onset and late-onset forms // J. Perinatal Med. 2017. V. 45. № 7. P. 869–877.
https://doi.org/10.1515/jpm-2016-0406
 47. *Wang Y., Liu H.Z., Liu Y. et al.* Disordered p53-MALAT1 pathway is associated with recurrent miscarriage // The Kaohsiung J. Med. Sciences. 2019. V. 35. № 2. P. 87–94.
https://doi.org/10.1002/kjm2.12013

48. *Chen H., Meng T., Liu X. et al.* Long non-coding RNA MALAT-1 is downregulated in preeclampsia and regulates proliferation, apoptosis, migration and invasion of JEG-3 trophoblast cells // *Intern. J. Clin. and Experim. Pathology*. 2015. V. 8. № 10. P. 12718.
49. *Ou M., Zhao H., Ji G. et al.* Long noncoding RNA MALAT1 contributes to pregnancy-induced hypertension development by enhancing oxidative stress and inflammation through the regulation of the miR-150-5p/ET-1 axis // *The FASEB J.* 2020. V. 34. № 5. P. 6070–6085.
<https://doi.org/10.1096/fj.201902280r>
50. *Feng C., Cheng L., Jin J. et al.* Long non-coding RNA MALAT1 regulates trophoblast functions through VEGF/VEGFR1 signaling pathway // *Arch. Gynecology and Obstetrics*. 2021. V. 304. № 4. P. 873–882.
<https://doi.org/10.1007/s00404-021-05987-y>
51. *Wu H.Y., Wang X.H., Liu K. et al.* LncRNA MALAT1 regulates trophoblast cells migration and invasion via miR-206/IGF-1 axis // *Cell Cycle*. 2020. V. 19. № 1. P. 39–52.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1691787>
52. *Shi L., Zhu L., Gu Q. et al.* LncRNA MALAT1 promotes decidualization of endometrial stromal cells via sponging MiR-498-3p and targeting histone deacetylase 4 // *Cell Biology Intern.* 2022. V. 46. № 8. P. 1264–1274.
<https://doi.org/10.1002/cbin.11814>
53. *Yang M., Yang Y., She S. et al.* Proteomic investigation of the effects of preimplantation factor on human embryo implantation // *Mol. Med. Reports*. 2018. V. 17. № 3. P. 3481–3488.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8338>
54. *Lu J., Wu W., Xin Q. et al.* Spatiotemporal coordination of trophoblast and allantoic Rbpj signaling directs normal placental morphogenesis // *Cell Death and Disease*. 2019. V. 10. № 6. P. 438.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1683-1>
55. *Robinson J.F., Fisher S.J.* Rbpj links uterine transformation and embryo orientation // *Cell Research*. 2014. V. 24. № 9. P. 1031–1032.
<https://doi.org/10.1038/cr.2014.110>
56. *Strug M.R., Su R.W., Kim T.H. et al.* RBPJ mediates uterine repair in the mouse and is reduced in women with recurrent pregnancy loss // *The FASEB J.* 2018. V. 32. № 5. P. 2452.
<https://doi.org/10.1096/fj.201701032r>
57. *Chi L., Ahmed A., Roy A.R. et al.* G9a controls placental vascular maturation by activating the Notch Pathway // *Development*. 2017. V. 144. № 11. P. 1976–1987.
<https://doi.org/10.1242/dev.148916>
58. *Liao Y., Wang J., Jaehnig E.J. et al.* WebGestalt 2019: Gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № W1. P. W199–W205.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz401>
59. *Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A. et al.* Gene ontology: Tool for the unification of biology // *Nat. Genetics*. 2000. V. 25. № 1. P. 25–29.
<https://doi.org/10.1038/75556>
60. *Kanehisa M., Goto S.* KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. № 1. P. 27–30.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
61. *Wang W., Sung N., Gilman-Sachs A. et al.* T helper (Th) cell profiles in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh cells // *Frontiers in Immunol.* 2020. V. 11.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02025>
62. *Yañez M.J., Leiva A.* Human placental intracellular cholesterol transport: A focus on lysosomal and mitochondrial dysfunction and oxidative stress // *Antioxidants*. 2022. V. 11. № 3.
<https://doi.org/10.3390/antiox11030500>
63. *Cuffe J.S.M., Holland O., Salomon C. et al.* Placental derived biomarkers of pregnancy disorders // *Placenta*. 2017. V. 54. P. 104–110.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.119>
64. *Kimura C., Watanabe K., Iwasaki A. et al.* The severity of hypoxic changes and oxidative DNA damage in the placenta of early-onset preeclamptic women and fetal growth restriction // *The J. Maternal-fetal and Neonatal Med.* 2013. V. 26. № 5. P. 491–496.
<https://doi.org/10.3109/14767058.2012.733766>
65. *Racicot K., Mor G.* Risks associated with viral infections during pregnancy // *The J. Clin. Investigation*. 2017. V. 127. № 5. P. 1591–1599.
<https://doi.org/10.1172/JCI87490>
66. *Mering C., Huynen M., Jaeggi D. et al.* STRING: A database of predicted functional associations between proteins // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 1. P. 258–261.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg034>
67. *Zhou G., Soufan O., Ewald J. et al.* NetworkAnalyst 3.0: A visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № W1. P. W234–W241.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz240>
68. *Fabregat A., Jupe S., Matthews L. et al.* The reactome pathway knowledgebase // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № D1. P. D649–D655.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1132>
69. *Tong M., Jun T., Nie Y. et al.* The role of the Slit/Robo signaling pathway // *J. Cancer*. 2019. V. 10. № 12. P. 2694.
<https://doi.org/10.7150/2Fjca.31877>
70. *Shilei B., Lizi Z., Lijun H. et al.* Downregulation of CDC42 inhibits the proliferation and stemness of human trophoblast stem cell via EZRIN/YAP inactivation // *Cell and Tissue Res.* 2022. V. 389. № 3. P. 573–585.
<https://doi.org/10.1007/s00441-022-03653-6>

71. Wu F., Chen X., Liu Y. et al. Decreased MUC1 in endometrium is an independent receptivity marker in recurrent implantation failure during implantation window // *Reproductive Biol. and Endocrinol.* 2018. Vol. 16. № 1. P. 60.
<https://doi.org/10.1186/s12958-018-0379-1>
72. Rossy J., Williamson D.J., Gaus K. How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism // *Frontiers in Immunol.* 2012. V. 3. P. 167.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00167>
73. Campbell T.M., Bryceson Y.T. IL2RB maintains immune harmony // *J. Experim. Med.* 2019. V. 216. № 6. P. 1231–1233.
<https://doi.org/10.1084/jem.20190546>
74. Трифонова Е.А., Гавриленко М.М., Бабовская А.А. и др. Ландшафт альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты при физиологической беременности // *Генетика.* 2022. Т. 58. № 10. С. 1210–1220.
<https://doi.org/10.31857/S0016675822100101>
75. Колчанов Н.А., Игнатьева Е.В., Подколюдная О.А. и др. Генные сети // *Вавиловский журн. генетики и селекции.* 2015. Т. 17. № 4/2. С. 833–850.

Genome-Wide Analysis in the Study of the Fetal Growth Restriction Pathogenetics

M. M. Gavrilenko^{1, *}, E. A. Trifonova¹, V. A. Stepanov¹

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, 634050 Russia
*e-mail: maria.gavrilenko@medgenetics.ru

Fetal growth restriction is a complication of pregnancy that defined as the inability of the fetus to realize its genetically determined growth potential. Despite the high social and medical significance of this problem the exact pathogenesis of fetal growth restriction is not known by now. Therefore, the analysis of the molecular genetics mechanisms of this pathology within the framework of approaches using modern high-performance technologies of next generation sequencing is of undoubted interest. In this review we focused on the analysis of data obtained in studies of the fetal growth restriction genetics component. The authors of these researches used next generation sequencing technologies and carried out whole transcriptome profiling. The results of the genes expression genome-wide analysis in placental tissue allow us to identify 1430 differentially expressed genes between fetal growth restriction and normal pregnancy, of which only 1% were found in at least two studies. These differentially expressed genes are involved in the Wnt/ β -catenin signaling pathway that plays an important role in cell migration, neural pattern formation and organogenesis during embryonic development. Common genes are associated with both obstetric and gynecological diseases, as well as with various somatic conditions from the groups of neurodegenerative, cardiovascular diseases and mental disorders, which probably reflects their involvement in the development of postnatal consequences of fetal growth restriction. The results of our work don't point only to potential molecular mechanisms and key genes underlying fetal growth restriction, but also indicate the important role of gene-gene communications in this pathology implementation: about 30% of all identified differentially expressed genes products interact with each other within the same gene network. In general, genome-wide RNA sequencing combined with the analysis of protein-protein interactions represents a promising direction in research on the development and functioning of the placenta, as well as the identification of placental insufficiency diseases genetics mechanisms, including fetal growth restriction.

Keywords: Fetal growth restriction, placenta, genome-wide analysis, mass parallel sequencing, NGS, RNA-seq.

УДК 579:252.2

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНОГО ШТАММА В-162/2 БАКТЕРИЙ *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*© 2024 г. К. С. Бондарева^{1, *}, А. И. Левданская¹, Н. П. Максимова¹, Е. Г. Веремеенко¹¹Белорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь

*e-mail: BKristinaSav@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.02.2024 г.

После доработки 28.02.2024 г.

Принята к публикации 29.02.2024 г.

Получение микроорганизмов-продуцентов биологически активных соединений для сельского хозяйства, химической, ветеринарной и фармацевтической промышленности, а также для защиты окружающей среды по-прежнему является актуальным направлением микробной биотехнологии. Одним из наиболее эффективных подходов создания продуцентов выступает химический мутагенез, который в совокупности с грамотной стратегией селекции позволяет получить высокопродуктивные штаммы. Существенным недостатком химического мутагенеза является большое количество индуцируемых мутаций в геномах штаммов-мутантов, что затрудняет идентификацию генов и соответственно биосинтетических путей, задействованных в продукции того или иного соединения. Решением данной проблемы стали современные технологии секвенирования и анализа генома, что позволило идентифицировать новые гены и неизвестные биохимические пути, принимающие участие в формировании биологически активных соединений. Цель работы — геномный анализ мутантного штамма В-162/2 бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, способного к повышенной продукции биологически активных соединений фенозинового ряда и демонстрирующего устойчивость к пероксиду водорода. При анализе полноразмерного генома штамма В-162/2 было идентифицировано 6482 кодирующие последовательности и 64 последовательности, кодирующие РНК. Сравнение генома штамма В-162/2 с геномом штамма дикого типа В-162 позволило идентифицировать 39 мутаций, пять из которых локализованы в межгенных областях, а 34 затрагивали кодирующие последовательности. Среди обнаруженных мутаций 14 приводили к радикальным заменам аминокислот в белках, а две привели к формированию преждевременных стоп-кодонов (сенсор метильных групп и транспортер MFS-типа). Обнаружено несколько замен с высокими значениями коэффициента Grantham, которые потенциально могли привести к изменению активности соответствующих белков. Определено наличие в геноме штамма В-162/2 трех регионов, содержащих фаговые гены.

Ключевые слова: фенозиновые соединения, секвенирование, мутации, расстояние Grantham, радикальные замены.

DOI: 10.31857/S0016675824080024 **EDN:** BGDMAB

Современные методы NGS-секвенирования стали незаменимым инструментом для специалистов-генетиков в таких областях, как палеонтология, медицина, криминалистика, ветеринария и экология. Данный подход сегодня с успехом используется для диагностики наследственных и инфекционных заболеваний, определения таксономической принадлежности и паспортизации ценных сельскохозяйственных культур и пород [1]. В микробной биотехнологии секвенирование ДНК помогает идентифицировать штаммы микроорганизмов, которые разрушают широкий спектр токсичных веществ или синтезируют биотехнологически ценные соединения.

Несмотря на разработку большого количества генно-инженерных методов создания микробных продуцентов промышленно ценных метаболитов, химический мутагенез и последующая селекция по-прежнему остаются крайне эффективными подходами в микробной биотехнологии. Это обусловлено тем, что данная стратегия позволяет получить и закрепить множественные изменения генома, которые, в свою очередь, являются причиной масштабных изменений в метаболизме бактериальной клетки [2]. Существенным минусом в применении этой методики является сложность в идентификации генов, продукты которых могут внести наибольший вклад в образование целевого

метаболита. Однако применение NGS-методов секвенирования совместно с биоинформатическими подходами позволяет выполнить сборку протяженных скаффолдов или цельных бактериальных геномов, а также произвести аннотацию рассматриваемого генома [3].

Бактерии рода *Pseudomonas* способны синтезировать широкий спектр вторичных метаболитов, таких как витамины, токсины, пигменты и антибиотики. Среди соединений последней группы особое место занимают феназины. Большинство феназиновых соединений — твердые, кристаллические окрашенные вещества, обладающие слабыми основными свойствами. По своей химической структуре они относятся к ароматическим гетероциклам. На сегодняшний день известно около 200 природных соединений, основой структуры которых является феназиновое ядро. Три конденсированных ароматических кольца, составляющих основу ядра, связываются с разнообразными заместителями, формируя большое количество производных, обладающих различными физическими и химическими свойствами и биологическими активностями (рис. 1). Благодаря наличию ароматических колец и атомов азота феназины легко вступают в окислительно-восстановительные реакции, являясь как донорами, так и акцепторами электронов [4, 5].

Антибиотическое действие феназинов обусловлено образованием активных форм кислорода (АФК), а также способностью некоторых феназинов к интеркаляциям в ДНК и подавлению активности топоизомераз. Благодаря своей способности принимать и отдавать электроны феназины активно применяются для производства биосенсорных устройств, микробных топливных элементов и многого другого [7]. Кроме того, антибиотики этого ряда применяют в медицине, сельском хозяйстве, нанотехнологиях, а также в научно-исследовательской деятельности [8].

В высоких концентрациях феназины могут быть токсичны и для самих продуцентов. Однако в клетках продуцентов, по-видимому, происходят глобальные перестройки метаболических путей, что позволяет им синтезировать данные соединения на достаточно высоком уровне. Сейчас известно лишь о небольшом количестве генов, напрямую задействованных в продукции феназинов

в бактериальной клетке [9]. Эффективное же создание сверхпродуцентов требует наличия детальной информации о различных, не всегда очевидных, биосинтетических путях, задействованных в сверхпродукции феназинов. Идентификация новых генов-кандидатов, задействованных в синтезе феназинов, позволяет оптимизировать стратегии создания продуцентов.

Цель данной работы — геномный анализ и молекулярно-генетическая характеристика мутантного штамма-сверхпродуцента *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162/2 и его сравнение со штаммом дикого типа В-162 для обнаружения потенциально новых генов-кандидатов, продукты которых могут принимать участие в обеспечении сверхпродукции феназиновых соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штаммы бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* дикого типа (В-162) и мутантный штамм (В-162/2), полученный в результате ступенчатого мутагенеза с использованием *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидана (НГ) по методике, описанной ранее [10], и последующей селекции на устойчивость к пероксиду водорода [11].

Культивирование бактерий проводили на среде ПСА (1%-ная глюкоза, 2%-ный ферментативный пептон, 0.1% KNO_3 , 0.5% NaCl), при температуре 28 °С без аэрации [12].

Геномную ДНК бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit K0881 (Thermo Scientific). Секвенирование генома проводили с использованием Illumina MiSeq и MiSeq Reagent Kit v2 на базе ГНУ “Институт генетики и цитологии НАН Беларуси”. Сборка генома проводилась с помощью программы SPAdes 3.13.1, аннотирование генома выполняли в специальном сервисе для аннотации геномов прокариот RAST (<http://rast.nmpdr.org/>). Для поиска генов в секвенированном геноме использовали программу SnapGene 4.2.11 DNA (<https://www.snapgene.com>), для поиска элементов фаговых геномов в составе генома штамма В-162/2 — онлайн-ресурс PHASTER (<https://phaster.ca/>). Продуктивность штаммов представляли в мг феназинов/л культуральной жидкости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее на кафедре генетики Биологического факультета БГУ с помощью ступенчатого химического мутагенеза с использованием нитрозогуанидина и последующей селекции на устойчивость к пероксиду водорода был получен мутантный штамм

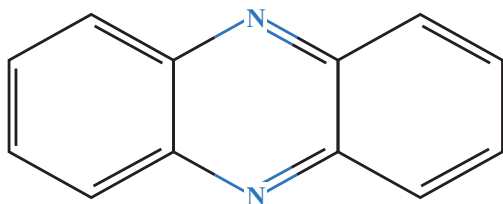


Рис. 1. Структурная формула ядра феназина [6].

В-162/2 бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* (рис. 2).

Уровень продукции феназина в клетках штамма В-162/2 составил 2850 ± 67 мг/л на среде ПСА, что в 38 раз выше, чем у штамма дикого типа (75 ± 15 мг/л). Для определения мутаций, которые могли стать причинами такой высокой продуктивности полученного мутантного штамма, на

следующем этапе было проведено полногеномное секвенирование.

В результате секвенирования были получены парные риды, которые при помощи программы SPAdes 3.13.1 впоследствии были собраны в 64 контига и 54 скаффолда. Последние были объединены в хромосомную последовательность с использованием двух референсных геномов: *P. chlororaphis*



Рис. 2. Схема мутагенеза бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* [13].

Обзор организма
Pseudomonas chlororaphis subsp. *aurantiaca* (6666666.929904 пн)

Геном	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>
Домен	Bacteria
Таксономия	Bacteria; <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>
Размер, пн	7.092.819
Содержание GC, %	62.9
N50	1126991
L50	2
Количество контигов (с PEGs)	1
Количество подсистем	401
Количество кодирующих последовательностей	6482
Количество РНК	64

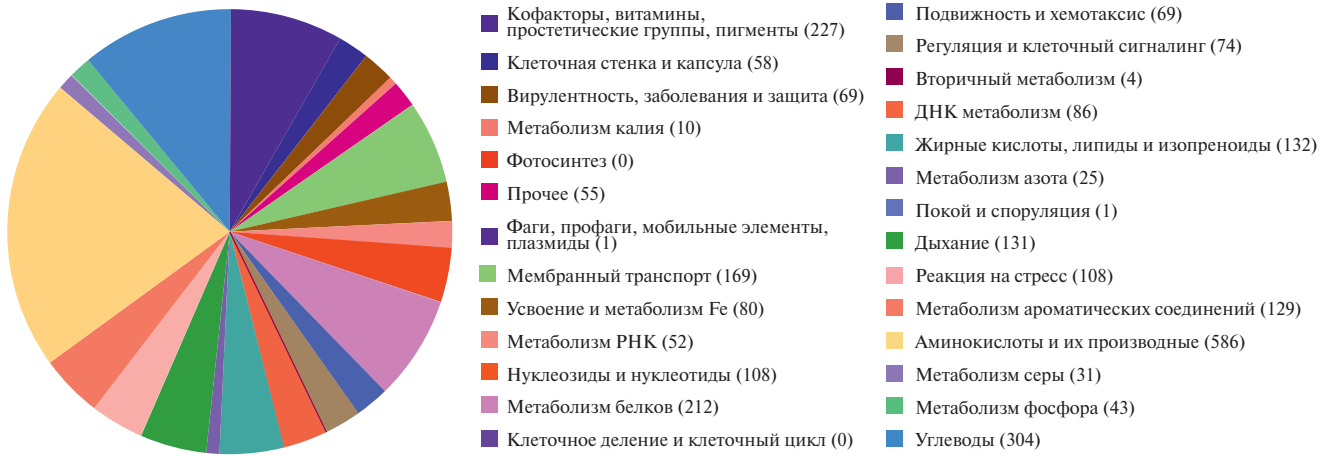


Рис. 3. Данные аннотации генома штамма В-162/2 при помощи RASTtk.

Таблица 1. Мутации в геноме штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162/2

Продукт	Позиция мутации в геноме	Вариант замены	Тип аминокислотной замены	Положение измененной аминокислоты	Расстояние Grantham
Гипотетический белок	988926	c→g	Нет изменений (Ser)	143	—
MreC-белок	1011705	t→c	Радикальная (Ser→Pro)	40	74
Межгенная область	1142628	g→a	—	—	—
Транскрипционный регулятор AraC-семейства	1115875	t→c	Консервативная (His→Arg)	197	29
Домен GGDEF	1538586	g→a	Радикальная (His→Tyr)	464	83
Белок-порин OprDfam OссK5	1547626	g→a	Нет изменений (Arg)	209	—
HD-GYP домен	1551174	g→a	Нет изменений (Pro)	68	—
Сигма-фактор RpoE	1555836	g→a	Радикальная (Ser→Asn)	162	65
Анти-сигма-фактор RseA	1556061	g→a	Радикальная (Val→Met)	33	87
Предшественник белка RseB	1556999	g→a	Радикальная (Gly→Ser)	147	56
HtrA-белок	1558359	g→a	Радикальная (Ser→Asn)	197	65
Роданезоподобный белок	1560871	g→a	Нет изменений (Leu)	22	—
T1SSсекретируемый агглютинин RTX	1570955	g→a	Нет изменений (Ala)	2783	—
	1571449	g→a	Радикальная (Leu→Phe)	2619	22
Гипотетический шаперон по сборке пили	1582886	g→a	Радикальная (Val→Met)	155	21
Карбоангидраза (b	1598795	g→a	Консервативная (Ala→Val)	103	64
Межгенная область	1622148	g→a	—	—	—
Межгенная область	1624299	g→a	—	—	—
Аллофанатгидролаза 2 (суб-ца 2)	1620627	g→a	Радикальная (Gly→Asp)	99	94
Гипотетический белок	1621804	g→a	Нет изменений (Phe)	255	—
Межгенная область	1637823	g→a	—	—	—

Таблица 1. Окончание

Продукт	Позиция мутации в геноме	Вариант замены	Тип аминокислотной замены	Положение измененной аминокислоты	Расстояние Grantham
HrpA-белок	1638014	g→a	Нет изменений (Glu)	255	—
	1639086	g→a	Радикальная (Ala→Trh)	613	58
Транспортер типа MFS	1653836	g→a	Нет изменений (Leu)	325	—
MadN-протеин	1663982	g→a	Нет замены (Gly)	40	—
ДНК-3-метиладенингликозилаза II	2756691	g→a	Радикальная (Ser→Phe)	187	155
Регуляторная область гена RhtA	5002201	g→a	—	—	—
	5002219	g→a	—	—	—
	5002240	c→t	—	—	—
AlaC (ГПАТ)	5424702	g→a	Нет изменений (Glu)	162	—
Транспортер MFS-типа	5431492	g→a	Trp→stop-codonom	35	—
Алкансульфонат (ABC транспортер, субстрат-связывающий белок)	5438254	g→a	Нет изменений (Arg)	120	—
Датчик Fe ²⁺ -дицитрата (мембранный)	5443233	g→a	Нет изменений (Leu)	189	—
N-ацилглюкозамин 2-эпимераза	5473072	g→a	Нет изменений (Leu)	336	—
Фосфоглюконатдегидраза	5478516	g→a	Нет изменений (Phe)	347	—
Сенсор метильных групп	5487658	g→a	Trp→stop-codonom	125	—
Белок TadB	5514106	g→a	Нет изменений (Ile)	142	—
TadZ/СраЕ (система секреции АТ-Фазы II/IV типа)	5517021	g→a	Радикальная (Pro→Ser)	58	74
Альдоза-1-эмпипаза	5525807	g→a	Нет изменений (Arg)	7	—
2,5-диоксвалератдегидрогеназа	5532515	g→a	Нет изменений (Gly)	224	—
Гипотетический белок	5542643	g→a	Нет изменений (Thr)	632	—
TolQ-белок системы Tol-Pal	5551346	g→a	Радикальная (Pro→Ser)	106	74

subsp. *aurantiaca* В-162 (код доступа SRX11183367) и *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603 (код доступа CP027746).

Установлено, что размер генома мутантного штамма В-162/2 бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* составляет 7129212 пн. Аннотация, выполненная с помощью алгоритма RASTtk, обнаружила 6482 кодирующие последовательности и 64 последовательности, кодирующие тРНК и рРНК (рис. 3). Содержание ГЦ-пар в геноме составило 62.9%, что соответствует таковому для представителей рода *Pseudomonas* [14]. Большинство генов (586) в геноме штамма В-162/2 кодируют аминокислоты и их производные, продукты 304 генов участвуют в метаболизме углеводов, 227 генов задействованы в метаболизме кофакторов, витаминов и пигментов (рис. 3).

Последующий анализ и сравнение генома штамма В-162/2 с геномом штамма дикого типа В-162 позволили идентифицировать 39 мутаций, пять из которых локализовались в межгенных областях, а 34 затрагивали кодирующие последовательности (см. табл. 1).

Среди обнаруженных мутаций 14 приводили к радикальным заменам аминокислот в белках, а две привели к формированию преждевременных стоп-кодонов (сенсор метильных групп и транспортер MFS-типа). Было выявлено несколько замен с высокими значениями коэффициента Grantham, что указывает на то, что такие замены могли привести к серьезным изменениям в функциях белков или отдельных белковых доменов (см. табл. 1). Примером такого белка в нашем случае

может служить ДНК-3-метиладенингликозилаза II (ДНК-гликозилаза). Данный белок принимает участие в репарации алкилированных, окисленных или дезаминированных оснований ДНК. Стабилизация рабочего поля для ДНК-гликозилазы обеспечивается несколькими боковыми цепями фермента.

Установлено, что мутации в интеркалирующих участках переводят белок в неактивное состояние, так как данные белковые домены могут играть важную роль в поиске определенных типов поврежденных ДНК [15]. Активный центр фермента содержит в своем составе гидрофобные остатки триптофана и тирозина, ароматические кольца которых расположены под таким углом, чтобы прямо взаимодействовать с удаляемым нуклеотидом. Радикальная замена Ser187Phe в хвостовом домене белка у мутантного штамма происходит рядом с аминокислотами, образующими карман активного центра. Прямой зависимости между функциональной активностью фермента ДНК-3-метиладенингликозилазы II и синтезом феназиновых антибиотиков ранее показано не было. Однако участие данного фермента в сверхпродукции феназинов может быть связано с изменением эффективности защиты генетической информации продуцента в присутствии высоких концентраций данных соединений.

Радикальная замена Gly99Asp в белке аллофанатгидролазы 2 (субъединицы 2) также имеет высокий показатель коэффициента Grantham (94). Аллофанатная гидролаза (AtzF) у представителей рода *Pseudomonas* в составе мультиферментного комплекса (с AtzD и AtzE) принимает участие в

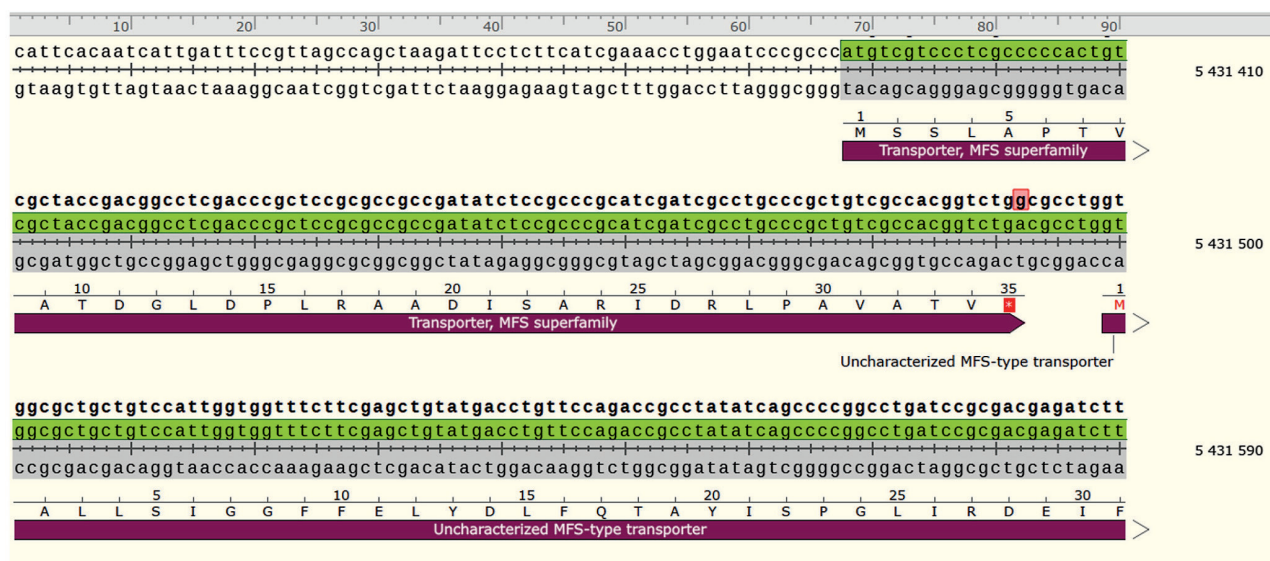


Рис. 4. Строение геномной области, кодирующей транспортер MFS-типа у бактерий штамма В-162/2. Зеленым цветом выделена кодирующая последовательность белка MFS-транспортера из бактерий мутантного штамма В-162/2, сверху геном бактерий штамма дикого типа В-162. Стоп-кодон (tga) обозначен звездочкой, выше него выделен гуанин (координата радикальной мутации: g@a). Красная буква "М" — это аминокислота метионин, обозначающая начало новой ОРС.

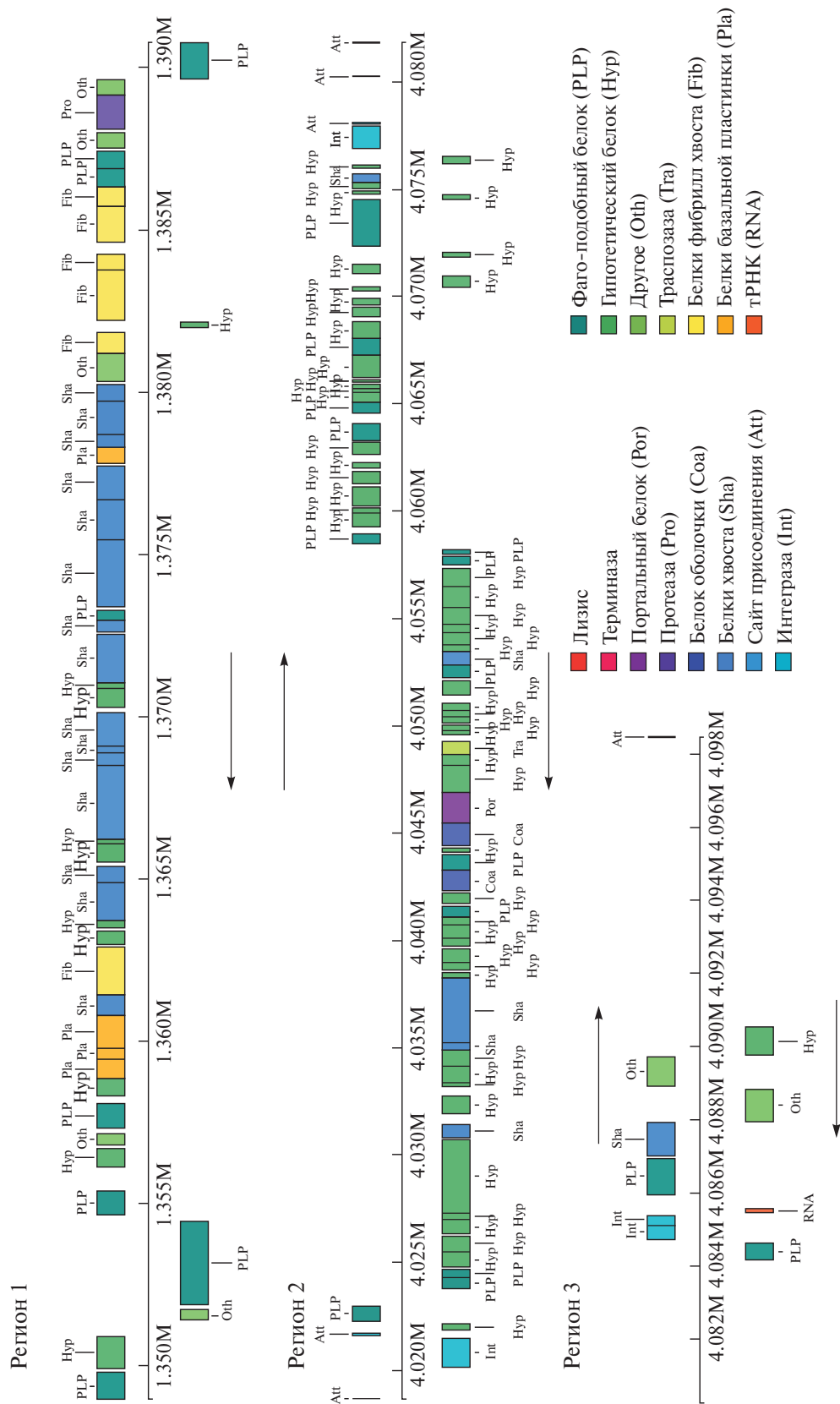


Рис. 5. Структура фаговых регионов в геноме штамма В-162/2 [19].

метаболизме атразинол и ациануровой кислоты. Нуклеотидная замена локализована в области активных сайтов N-концевого амидазного домена, ответственного за дезаминирование аллофаната с образованием аммиака и N-карбоксикарбамата [16]. Взаимосвязи данного белка с продукцией феназинов нам установить не удалось.

Мутация в гене, кодирующем транспортер MFS-типа (в данном случае представитель семейства GLUT), приводит к формированию стоп-кодона и укорочению мутантного белка на 37 аминокислот (рис. 4). Белки семейства GLUT являются основными транспортерами глюкозы и других гексоз через цитоплазматическую мембрану. Утраченная в мутантном белке область необходима для формирования первого трансмембранного домена, который ответственен за закрепление белка в мембране и за частичное связывание D-глюкозы [17]. Известно, что глюкоза стимулирует продукцию феназин-1-карбоновой кислоты и ее производных, являясь одним из более предпочтительных источников углерода у бактерий рода *Pseudomonas* [4, 18].

Аминокислотная замена в сенсоре метильных групп также приводит к формированию преждевременного стоп-кодона в мутантном белке. В результате образования преждевременного стоп-кодона и присутствия последовательности, потенциально являющейся стартовой в центральной области исходного белка, у мутанта могут формироваться два белка. Один из них имеет размер 124 ак, второй — 543 ак. У дикого типа исходный белок имеет размер 712 ак. Таким образом, формирование преждевременного стоп-кодона укорачивает исходный белок на 169 ак от начала молекулы. Функциональная активность такого белка либо существенно изменена, либо вообще отсутствует.

Детальный анализ генома *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* на присутствие в нем генов профагов и их элементов с помощью онлайн-ресурса PHASTER [19] показал наличие двух интактных регионов, с элементами профаговых генов, а также одного неполного генома (рис. 5).

Первый интактный регион (регион 1) содержит 49 открытых рамок считывания (координаты в геноме 13489960–1390788 штамма В-162/2) размером 41.8 Кб. Регион включает геномы профагов, инфицирующих бактерии родов *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Sinorhizobium*, *Ralstonia*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Aeromonas* и цианобактерии рода *Planktothrix*. Регион содержит гены формирования хвоста (Sha) и его фибрилл (Fib), базальной пластинки (Pla). Также присутствуют гены белков, проявляющих протеазную и нуклеазную активности и участвующих в рекомбинации ДНК (профаг MG1655 *Escherichia coli*), см. рис. 5.

Второй интактный регион (регион 2) содержит 79 открытых рамок считывания (координаты

в геноме 4018624–4081830 штамма В-162/2) размером 63.2 Кб (рис. 5). Включает гены профагов, поражающих представителей родов *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Xylella*. Содержит гены, продукты которых участвуют в формировании оболочек (Coa), поринов (Por), хвостовых белков (Sha). Также идентифицированы гены интеграз (Int), транспозаз, пермеаз, белков семейства ERF (репрессия транскрипции) и ДНК-цитозинметилтрансферазы (катализ метилирования нуклеотидов), область сайтов связывания (Att).

Регион 3 является неполным, так как включает всего восемь открытых рамок считывания и имеет размер 18.2 Кб (координаты в геноме штамма В-162/2 4080260–4098462). В составе третьего региона — лишь гены, кодирующие хвостовые белки (Sha), интегразы (Int) и тРНК. В регионе также присутствуют ген транскрипционного регулятора LysR-семейства, гены НАД(Ф)Н оксидоредуктазы YrkL (модулятор лекарственной активности) и флаводоксина 2.

Таким образом, проведены полногеномное секвенирование и анализ генома мутантного штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162/2. Размер генома составляет 7129212 пн. В составе генома обнаружены кодирующие последовательности и 64 последовательности, кодирующие РНК. Содержание ГЦ-пар 62.9%, что соответствует таковому для представителей рода *Pseudomonas*.

При сравнении геномной последовательности мутантного штамма В-162/2 с последовательностью штамма дикого типа В-162 выявлено 39 мутаций, пять из которых локализованы в межгенных областях, а 34 затрагивают кодирующие последовательности. 14 мутаций приводили к радикальным заменам аминокислот в белках, а две привели к формированию преждевременных стоп-кодонов. Идентифицированы гены, мутации в которых могут косвенно влиять на продукцию феназиновых антибиотиков. К ним относятся гены, кодирующие ДНК-3-метиладенингликозилазу II, OссK5 (OpdH) и сенсор метильных групп. Также в геноме штамма В-162/2 обнаружены два интактных и один неполный регион, содержащие профаговые гены.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусской государственной программы научных исследований “Биотехнологии-2” (проект № 20211293).

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. Zubov V.V., Chemeris D., Vasilov R.G. et al. Brief history of high-throughput nucleic acid sequencing methods // *Biomcs*. 2021. V. 13, № 1. P. 27–46. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2021-4>
2. Веремеенко Е.Г., Бондарева К.С., Левданская А.И., Максимова Н.П. Молекулярно-генетическая характеристика мутантного штамма *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* с повышенной устойчивостью к пероксиду водорода // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук*. 2023. Т. 68. № 2. С. 154–162. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-2-154-162>
3. Ефимочкина, Н.Р., Шевелева С.А. Перспективные молекулярно-генетические методы секвенирования микроорганизмов в системе оценки и контроля биобезопасности пищевой продукции // *Вопр. питания*. 2022. Т. 91. № 1. С. 37–52. [orcid: https://orcid.org/0000-0002-9071-0326](https://orcid.org/0000-0002-9071-0326)
4. Веремеенко Е.Г. Получение, характеристика и применение продуцентов феназиновых антибиотиков бактерий *Pseudomonas aurantiaca*: Дис. ... канд. биол. наук. Минск: Белорусский гос. ун-т, 2010. 157 с.
5. Guttenberger N. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products // *Bioorg. Med. Chem*. 2017. V. 25. № 22. P. 6149–6166. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.002>
6. Propionix [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://propionix.ru>. – Дата доступа: 13.03.2021.
7. Simoska O., Cummings D.A., Gaffney E. et al. Enhancing the performance of microbial fuel cells via metabolic engineering of *Escherichia coli* for phenazine production // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2023. V. 11. № 32. P. 11855–11866. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.3c01593>
8. Miksa B. The phenazine scaffold used as cytotoxic pharmacophore applied in bactericidal, antiparasitic and antitumor agents // *Helvetica Chimica Acta*. 2022. V. 105. № 10. <https://doi.org/10.1002/hlca.202200066>
9. Левданская А.И., Светлова А.С., Максимова Н.П., Веремеенко Е.Г. Экспрессия феназинового оперона у штаммов *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162, способных к сверхсинтезу феназиновых соединений // *Мол. и прикл. генетика*. 2021. Т. 31. С. 93–101. <https://doi.org/10.47612/1999-9127-2021-31-93-101>
10. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
11. Shapira M.A., Verameyenka K.G., Liavonchyk K.V. et al. Novel approach of phenazine derivatives isolation from *Pseudomonas* culture medium // *Proc. Biochemistry*. 2021. V. 111. № 2. P. 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.11.004>
12. Levitch M.E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains // *J. Bacteriol*. 1970. V. 103. № 1. P. 16–19. <https://doi.org/10.1128/jb.103.1.16-19.1970>
13. DGRM [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://app.dgrm.net>. Дата доступа: 26.01.2024.
14. Лысак В.В., Фомина О.В. Важнейшие группы микроорганизмов: пособие. Минск : БГУ, 2012. 92 с. <http://elib.bsu.by/handle/123456789/31783>
15. Adhikary S., Cato M.C., McGary K.L. et al. Non-productive DNA damage binding by DNA glycosylase-like protein Mag2 from *Schizosaccharomyces pombe* // *DNA Repair*. 2013. № 12. P. 196–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.12.001>
16. Balotra S., Newman J., Cowieson N.P. et al. X-ray structure of the amidase domain of AtzF, the allophanate hydrolase from the cyanuric acid-mineralizing multienzyme complex // *Appl. Environ. Microbiol*. 2015. № 81. P. 470–480. <https://doi.org/10.1128/AEM.02783-14>
17. Sun L., Xin Z., Chuangye Y. et al. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1–4 // *Nature*. 2012. V. 490, № 7420. P. 361–366. <https://doi.org/10.1038/nature11524>
18. Tjeerd van Rij E., Wesselink M., Chin-A-Woeng T.F.C. et al. Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 // *MPMI*. 2007. V. 17. № 5. P. 557–566. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.5.557>
- Phaster [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://phaster.ca/submissions/ZZ_141c3c5aec. – Дата доступа: 19.01.2024.

Molecular Genetic Characteristics of the Mutant Strain B-162/2 of the Bacteria *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

K. S. Bondarava^{1, *}, A. I. Liaudanskaya¹, N. P. Maximova¹, K. G. Verameyenka¹

¹Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: BKristinaSav@yandex.ru

The production of microorganisms that produce biologically active compounds for agriculture, the chemical, veterinary and pharmaceutical industries as well as for environmental protection continues to be an important direction of microbial biotechnology. One of the most effective approaches to the production of producers is chemical mutagenesis, which, in combination with the right breeding strategy, makes it possible to obtain highly productive strains. A significant disadvantage of chemical mutagenesis is the large number of induced mutations in the genomes of mutant strains, which makes it difficult to identify genes and, accordingly, biosynthetic pathways involved in the production of a given compound. The solution to this problem is modern technologies of genome sequencing and analysis, which make it possible to identify new genes and unknown biochemical pathways involved in the formation of biologically active compounds. The aim of the work was to analyse the genome of the mutant strain B-162/2 of the bacterium *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, which is capable of increased production of biologically active compounds of the phenazine series and is resistant to hydrogen peroxide. When analysing the genome of strain B-162/2 in full size, 6482 coding sequences and 64 coding RNA sequences were identified. Comparison of the genome of the B-162/2 strain with the genome of the wild type B-162 allowed the identification of 39 mutations, 5 of which are localised in intergenic regions, and 34 affected coding sequences. Of the mutations detected, 14 led to a radical amino acid substitution in the proteins and 2 led to the formation of premature stop codons (methyl group sensor and MFS-type transporter). Several substitutions with high values of the Grantham coefficient were found, which could possibly lead to a change in the activity of the proteins concerned. The presence of three regions with phage genes in the genome of the B-162/2 strain was detected.

Keywords: phenazine compounds, sequencing, mutations, Grantham distance, radical replacement.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ РОБУРОИДНЫХ ДУБОВ КРЫМСКО-КАВКАЗСКОГО РЕГИОНА ПО ЯДЕРНЫМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ МАРКЕРАМ

© 2024 г. С. А. Семерикова¹*, Х. У. Алиев², В. Л. Семериков¹

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

²Горный ботанический сад Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
Махачкала, 367000 Россия

*e-mail: s.a.semerikova@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 20.02.2024 г.

После доработки 13.03.2024 г.

Принята к публикации 25.03.2024 г.

Межвидовая и внутривидовая структура генетической изменчивости была изучена с помощью 18 микросателлитных локусов (nSSR) у близкородственных робуроидных дубов крымско-кавказского региона (секция *Quercus*). Исследовались семь наиболее распространенных в регионе таксонов из 29 морфологически чистых популяций в пределах разных частей Северного Кавказа, Закавказья, Крыма и северо-восточной Европы. Большинство таксонов были впервые исследованы с помощью nSSR-маркеров. Среди 492 изученных деревьев метод байесовской кластеризации STRUCTURE выделил кластеры, соответствующие дубу черешчатому *Quercus robur*, дубу Гартвиса *Q. hartwissiana*, дубу крупнопольничковому *Q. macranthera*, дубу пушистому *Q. pubescens* и трем подвидам дуба скального: *Q. petraea* ssp. *petraea*, *Q. petraea* ssp. *iberica*, *Q. petraea* ssp. *medwediewii*. Географическая структура была выявлена внутри *Q. robur*, *Q. pubescens* и *Q. p.* ssp. *petraea*. Используемые nSSR-локусы хорошо диагностируют таксономическую принадлежность индивидуумов, выявляя при этом гибридные образцы. Показана близость друг к другу «длинноплодоножковых» робуроидных дубов (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*) при большей степени отличий от других видов. У одного из подвидов дуба скального, широко распространенного на Северном Кавказе и в Крыму, — дуба известнякового *Q. petraea* ssp. *medwediewii* (syn. *Q. calcarea*) — обнаружены значительные отличия от других таксонов, достигающие видового уровня. Предположение о возможном гибридном происхождении дуба известнякового в результате гибридизации *Q. petraea* и *Q. pubescens* генетическим анализом не подтверждается. Два других подвида *Q. petraea* (типовой *Q. p.* ssp. *petraea* и дуб грузинский *Q. p.* ssp. *iberica*) дифференцированы в меньшей степени и родственны между собой, что подтверждает правомерность выделения двух географически обособленных таксонов в ранге подвидов. Наиболее высокая изменчивость наблюдалась в популяциях *Q. pubescens* ($H_e = 0.777$). У *Q. p.* ssp. *medwediewii* показатели изменчивости были ниже, чем у других широко распространенных таксонов ($H_e = 0.652$), и находились примерно на уровне изменчивости *Q. hartwissiana* ($H_e = 0.633$) и *Q. macranthera* ($H_e = 0.659$). Четкая дифференциация таксонов по ядерным маркерам показывает ограниченность интрогрессии близких видов дуба на Кавказе и в Крыму. Выделенные генетические кластеры могут быть использованы как референсные группы для дальнейших популяционно-генетических исследований дубов крымско-кавказского региона.

Ключевые слова: *Quercus* spp., ядерные микросателлиты, Кавказ, Крым, nSSR, STRUCTURE, генетическая дифференциация, идентификация таксонов.

DOI: 10.31857/S0016675824080035 EDN: BGCLLP

Европейские робуроидные дубы (*Quercus* L., секция *Quercus*, Fagaceae) являются важнейшими элементами умеренных лесов с центрами разнообразия, расположенными в юго-восточных областях Западной Евразии, включая Причерноморский регион, Кавказ и Западную Азию [1–3]. Это

молодая группа [4, 5], содержащая большое число морфологически слабо дифференцированных и способных к гибридизации видов со сложной систематикой. На Кавказе и в Крыму количество таксонов этой группы значительно различается в зависимости от классификации [1–3, 6–10]. В

настоящее время в Конспекте флоры Кавказа [6] указываются шесть видов, которые относятся к робуроидным дубам, среди которых наиболее распространены европейские виды — дуб черешчатый (*Q. robur* L.) и дуб скальный (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.). На Западном Кавказе и в Закавказье встречается дуб Гартвиса (*Q. hartwissiana* Steven). В горных районах Восточного Кавказа и Закавказья произрастает дуб крупнопольниковый (*Q. macranthera* Fisch. et C. A. Mey. ex Hohen). Дуб пушистый *Q. pubescens* Willd., средиземноморский ксерофитный вид, широко распространен в Крыму. На Кавказе его ареал ограничен приморскими районами Северо-Западного и Восточного Кавказа.

Кроме общепризнанных видов, среди произрастающих на Кавказе дубов особого внимания заслуживают внутривидовые таксоны *Q. petraea*, систематика которых вызывает наибольшее разногласия [7, обзор]. Монограф рода Ю. Л. Меницкий [1–3, 6] рассматривал несколько таксонов *Q. petraea* в ранге подвидов, из которых в регионе наиболее распространены типовой подвид (*Q. petraea* L. ex Liebl. ssp. *petraea*), дуб грузинский (*Q. petraea* ssp. *iberica* (Steven ex Bieb.) Krassiln.) и дуб известняковый (*Q. petraea* ssp. *medwediewii* (A. Camus) Menitsky). Последний был определен в систему дуба скального, но с указанием о промежуточности морфологических признаков между *Q. petraea* и *Q. pubescens*, что предполагает, по мнению Ю. Л. Меницкого, его гибридное происхождение [1–3]. В то же время Н. Д. Троицкий [9] ранее описал этот таксон в Крыму в ранге отдельного вида (*Q. calcarea* Troitsky).

Подвиды дуба скального при выраженной экологической дифференциации занимают на Кавказе несовпадающие, хотя и перекрывающиеся ареалы: *Q. p. ssp. medwediewii* преобладает на северном макросклоне Большого Кавказа и в Предкавказье, *Q. p. ssp. iberica* — в Закавказье и в Дагестане, *Q. p. ssp. petraea* — в Крыму и в Западном Предкавказье [3], при этом в ряде областей образуются обширные области “интерградации” [1, 8], или интрогрессивной гибридизации между подвидами, а также с другими близкородственными видами: это в первую очередь районы Западного Кавказа и Западного Закавказья, а также Восточный Кавказ и Крым.

Исследователи систематики дубов констатируют сложность разграничения таксонов ввиду значительного перекрывания диагностических черт и необходимости различать таксоны с помощью множества признаков, включая структуру опушения, что трудоемко и не всегда доступно [1, 11–18]. Даже при этом для уверенной диагностики необходимо знать происхождение образца [1]. Помимо высокой морфологической изменчивости, значительную проблему представляет гибридизация, чему способствует широкое перекрывание ареалов и обитание в симпатрических популяциях. Все

это означает важность использования молекулярных маркеров для исследования таксономической структуры и демографических процессов в популяциях дубов.

Взаимоотношение наиболее распространенных видов европейских робуроидных дубов ранее широко исследовалось с помощью ядерных микросателлитных локусов (nSSRs) [11–29]. С помощью различных наборов nSSRs была показана возможность разграничения отдельных таксонов (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. frainetto*, *Q. pyrenaica*). В смешанных сообществах были обнаружены значительные различия по уровню гибридизации между популяциями, в зависимости от состава [11, 13–16, 24–26]. В то же время не удалось разделить несколько видов, близких дубу пушистому [18, 30–32]. Для более точной таксономической идентификации необходимы учет всех таксонов, присутствующих в регионах [24, 28], использование “чистых” референсных групп при исследовании гибридизации и состава насаждений [18, 23, 24, 30] и сбалансированное количество образцов и популяций разных таксонов, включенных в анализ [33].

В наших недавних исследованиях пяти видов робуроидных дубов в Крыму и на Кавказе матерински наследуемыми маркерами хлоропластной ДНК [34, 35] была выявлена отчетливая географическая структура при отсутствии таксономической подразделенности, что объясняется наличием генетического потока между родственными видами. В то же время 14 nSSR-локусов хорошо разделили *Q. robur* и *Q. petraea* s. l. в соответствии с видовой принадлежностью во всех исследованных областях восточной части ареала и в симпатрических популяциях [36].

Изменчивость других видов *Quercus* крымско-кавказского региона и их таксономическая структура с помощью ядерных маркеров ранее не изучались. В настоящей работе мы впервые анализируем структуру изменчивости ядерных мультилокусных маркеров (nSSR) всех наиболее распространенных таксонов робуроидных дубов на Кавказе и в Крыму с целью выявления основных генетических кластеров и сопоставления их с таксономическим подразделением, предложенным ранее на основе морфологических данных [1, 2, 6]. Предполагается решение следующих задач: 1) изучение возможности надежного разграничения видов на основе nSSR; 2) исследование филогенетических связей между таксонами и характера внутривидовой дифференциации; 3) уточнение таксономического статуса спорных таксонов. Для этого были выбраны морфологически чистые популяции семи исследуемых видов и подвидов, включая три подвида *Q. petraea*, из географически удаленных регионов Северного Кавказа, Закавказья, Крыма и Северо-Восточной Европы, в которых изучалась изменчивость 18 nSSR локусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано семь наиболее распространенных в крымско-кавказском регионе таксонов *Quercus*, с учетом трех подвидов дуба скального *Q. petraea*, определяемых согласно Ю. Л. Меницкому [3, 6]. У дуба скального *Q. petraea* s. l. изучено 215 образцов из 12 популяций, в том числе 71 образец *Q. petraea* ssp. *petraea* (две популяции из Калининградской области и две из Крыма), 64 образца из выборки, относимых к дубу грузинскому *Q. petraea* ssp. *iberica* (три выборки из Закавказья, одна — из Дагестана), и 80 образцов из четырех выборок дуба известнякового *Q. petraea* ssp. *medwediewii* из Предкавказья, Центрального Кавказа и Крыма (табл. 1; рис. 1, а). Часть образцов из трех выборок *Q. petraea* s. l. (№ 1, 5, 8) ранее были использованы в исследовании с помощью 14 nSSR-локусов изменчивости *Q. robur* [36]. Дуб пушистый *Q. pubescens* (99 образцов) был исследован в двух географически удаленных регионах: три выборки из Крыма (59 шт.) и две — из Восточного Кавказа (Дагестан) (40 шт.). У дуба крупнопыльничкового *Q. macranthera* исследовано 50 деревьев из двух выборок Предгорного и Внутреннего Дагестана и двух локалитетов Малого Кавказа (Армения). У дуба черешчатого *Q. robur* в анализ было включено пять выборок из разных ботанико-географических районов Северного Кавказа, ранее исследованных по 14 локусам и принадлежащих разным генетическим кластерам *Q. robur* [36]. В настоящем исследовании в анализ были взяты образцы с имеющимися данными по 18 локусам, что несколько уменьшило размер выборок по сравнению с предыдущей работой [36]. У дуба Гартвиса *Q. hartwissiana* изучено 33 дерева из трех выборок Западного Кавказа, две из которых расположены на южном макросклоне и одна — на северном (табл. 1; рис. 1, а). Таким образом, количество образцов на таксон составляло от 33 (*Q. hartwissiana*) до 99 (*Q. pubescens*), в среднем 70.3 образцов.

Для исследования мы руководствовались целью сбора “чистых” таксонов, не затронутых гибридизацией, в первую очередь из районов, где нет близкородственных видов, или в популяциях, где они не произрастают симпатрически. При этом учитывались области распространения исследуемых таксонов на Кавказе и в Крыму, согласно данным Ю. Л. Меницкого [3] и Н. Д. Троицкого [9]. Выборки *Q. pubescens* были взяты из популяций с отсутствием *Q. petraea*. Материал собирался в естественных местообитаниях при расстоянии между деревьями не менее 50 м. Выборка составляла в среднем 17 особей, в большинстве случаев более 15 деревьев. В некоторых случаях размер выборки в труднодоступных районах (Грузия, Армения) или у редко встречающихся видов (*Q. hartwissiana*) был меньше. Предварительную таксономическую принадлежность устанавливали по описаниям [3, 6], учитывая морфологические признаки: длину плодоножки,

форму листа и длину черешка, характер опушения листа и побегов. Ваучерные образцы хранятся в лаборатории молекулярной экологии растений ИЭРиЖ УрО РАН. Названия таксонов (в ранге видов или подвидов) приводятся по Конспекту флоры Кавказа 2012 г. [6]. Выделение геномной ДНК проводили с помощью метода СТАВ [37] из высушенных в силикагеле листьев. Также были использованы образцы ДНК из наших предыдущих исследований хлоропластной ДНК [34, 35].

Анализ изменчивости 18 nSSR-локусов проводился в соответствии с описанным ранее [36] (табл. S1, Приложение), с использованием двух мультиплексов [20], за исключением из них локусов PIE223 и PIE258, так как при исследовании нами *Q. robur* и *Q. petraea* [36] в этих локусах наблюдались неспецифичные продукты амплификации. Хроматограммы преобразовывали в генотипические данные с помощью программы GeneMapper 3.5 (Applied Biosystems). Образцы с пропущенными данными в более чем четырех локусах были исключены из дальнейшего анализа. Следует отметить, что при смене марки размерного стандарта в некоторых локусах происходило существенное смещение определяемых размеров аллелей (от 1 до 4 пн). Смещение выявлялось и корректировалось с использованием реперных образцов с известными размерами аллелей, с включением в каждый анализируемый 96-луночный ПЦР планшет 2–4 реперных образцов. Также по сравнению с предыдущим исследованием был оптимизирован состав мультиплекса kit-1: для локуса PIE215 флуоресцентная метка TAMRA была заменена на FAM (табл. S1, Приложение), что улучшило его амплификацию и исключило смешение сигналов TAMRA и R6G. Замена флуоресцентной метки привела к занижению размеров аллелей на 5 пн, что также было скорректировано с помощью реперных образцов и повторным анализом части ранее анализированных образцов с новой меткой. Результирующие данные (размеры аллелей) были приведены в соответствие с набором данных, полученных для *Q. robur* и *Q. petraea* в работе [36].

Байесовскую кластеризацию генотипов проводили с помощью программы STRUCTURE 2.3.4 [38] с использованием модели “admixture”, коррелированных частот аллелей и без использования информации о таксономической или географической принадлежности. Значение K устанавливалось от 1 до 12 или от 1 до 10 в зависимости от набора образцов (см. Результаты). Было выполнено 10 прогонов программы STRUCTURE для каждого значения K . Каждый прогон включал 50000 шагов в качестве “отжига” и 100000 шагов для накопления данных. Оценку оптимального количества кластеров методом ΔK [39] и методом $LnP(D)$ [38] выполняли с помощью программы StructureSelector [40].

Таблица 1. Характеристика исследованных популяций видов *Quercus*

№	Популяция	с. ш.	в. д.	h, м над ур. морья	n	N _a	N _e	H _o	H _e	F (18 локусов)	P-value (18 локусов)	F (15 локусов)	P-value (15 локусов)
	<i>Q. petraea ssp. petraea</i>												
1	Светлогорск	54°55'56"	20°08'35"	50	15	7.278	4.499	0.769	0.725	−0.062	0.7741	−0.070	0.5927
2	Скрытое	54°45'24"	20°14'24"	64	18	8.278	4.923	0.719	0.722	0.031*	0.2129	−0.023	0.7832
3	г. Кабель	44°38'52"	34°23'40"	120	18	8.444	4.749	0.719	0.725	0.019*	<0.001	−0.061	0.4008
4	г. Сераус	44°38'38"	34°22'09"	395	20	8.500	4.650	0.706	0.727	0.039*	0.0338	0.007	0.1757
	Среднее				17.8	8.125	4.705	0.728	0.725	0.007	<0.001	−0.037	0.4911
	SE					0.409	0.276	0.025	0.018	0.025		0.017	
	<i>Q. petraea ssp. iberica</i>												
5	Цхинвал	42°14'57"	43°59'47"	1200	24	8.889	4.799	0.679	0.697	0.019*	0.0830	0.008	0.9104
6	Орбели	42°38'51"	42°48'52"	951	8	5.444	3.768	0.660	0.651	−0.015	0.5540	−0.036	0.6414
7	Боржоми	41°46'18"	43°28'22"	1473	8	6.111	4.110	0.688	0.683	−0.021	0.8621	−0.030	0.9158
8	Эрпели (Pt)	42°47'21"	46°58'40"	946	24 ^a	9.944	5.366	0.771	0.757	−0.009	0.0022	−0.045	0.2895
	Среднее				16	7.597	4.511	0.699	0.697	−0.007	0.0433	−0.026	0.9089
	SE					0.405	0.268	0.025	0.024	0.016		0.016	
	<i>Q. macranthera</i>												
9	Терменлик	42°44'59"	46°59'70"	1400	23	8.389	4.487	0.669	0.670	−0.011	0.0558	−0.011	0.5213
10	Росноб	42°02'44"	46°25'08"	1710	17	7.000	4.167	0.689	0.671	−0.034	0.5014	−0.038	0.6214
11	Дилижан	40°42'04"	44°50'49"	1587	6 ^a	5.500	3.852	0.654	0.638	−0.030	0.6156	−0.034	0.5736
12	Вайк ^b	39°41'42"	45°34'25"	1391	4 ^b	—	—	—	—	—	—	—	—
	Среднее				12.5	6.963	4.169	0.671	0.659	−0.025	0.2273	−0.028	0.7384
	SE					0.513	0.350	0.030	0.029	0.020		0.022	
	<i>Q. petraea ssp. medwediewii</i>												
13	Русск. лесная дача	45°02'13"	41°52'10"	671	17	6.944	3.905	0.654	0.640	−0.016	0.3964	−0.026	0.5586
14	Балта	42°55'12"	44°38'21"	1000	17 ^a	6.722	3.862	0.623	0.649	0.036	<0.013	0.004	0.6581
15	Бештау	44°07'16"	43°03'44"	529	23	7.500	3.875	0.635	0.654	0.022	0.0478	−0.032	0.6294
16	г. Агармыш	45°01'10"	35°01'53"	350	23	8.278	3.949	0.638	0.662	0.038	0.0910	0.014*	0.0925

Таблица 1. Окончание

№	Популяция	с. ш.	в. д.	h, м над ур. моря	n	N _a	N _e	H _o	H _e	F (18 локусов)	P-value (18)	F (15 локусов)	P-value (15)
	Среднее				20	7.361	3.898	0.637	0.652	0.020	0.0025	-0.010	0.4492
	SE					0.358	0.242	0.027	0.025	0.018		0.017	
	<i>Q. pubescens</i>												
17	Новый Свет	44°50'17"	34°55'03"	200	18	10.278	6.324	0.768	0.793	0.028*	<0.001	0.013	0.3621
18	Артаг	44°51'27"	34°43'16"	260	22	10.889	6.686	0.813	0.797	-0.017	0.4689	-0.047	0.7460
19	Кореизская тропа	44°27'23"	34°04'18"	275	19	9.944	6.015	0.728	0.783	0.071*	<0.001	0.042*	0.0967
20	г. Чипчарак	43°07'29"	46°59'49"	290	16	8.500	4.604	0.764	0.755	-0.014	0.1633	-0.034	0.3348
21	Зидьян-Казмаляр	42°05'18"	48°09'30"	160	24	8.944	4.818	0.770	0.754	-0.021	0.6753	-0.055	0.9940
	Среднее				19.8	9.711	5.689	0.769	0.777	0.009	<0.001	-0.016	0.6261
	SE					0.357	0.266	0.016	0.014	0.013		0.011	
	<i>Q. robur</i>												
22	Самур	41°50'16"	48°31'19"	7	23	7.611	4.115	0.653	0.700	0.080*	<0.001	-0.010	0.0995
23	Эрпели (Rb)	42°47'21"	46°58'40"	946	10	6.500	4.045	0.677	0.695	0.029*	0.0942	-0.068	0.9495
24	Буденновск	44°45'23"	44°09'55"	93	20	7.333	4.159	0.728	0.710	-0.030	0.2694	-0.063	0.6869
25	Семигорский	44°53'53"	37°36'10"	100	22	8.389	4.835	0.733	0.732	-0.005	0.3263	-0.032	0.7763
26	Убинская	44°42'20"	38°31'27"	133	20	8.222	4.471	0.673	0.713	0.051*	<0.001	-0.015	0.5671
	Среднее				19	7.611	4.325	0.693	0.710	0.025	<0.001	-0.038	0.7577
	SE					0.299	0.204	0.023	0.016	0.023		0.014	
	<i>Q. hartwissiana</i>												
27	Мзымта	43°29'00"	39°59'26"	80	8	5.000	3.393	0.639	0.627	-0.028	0.7018	-0.027	0.6856
28	Анастасиевка	44°09'55"	39°16'02"	120	7	4.722	3.327	0.634	0.646	0.029*	0.9048	0.034*	0.8795
29	Перевалка	44°02'27"	40°45'30"	700	18	6.500	3.626	0.633	0.626	-0.011	<0.065	-0.021	<0.878
	Среднее				11	5.407	3.448	0.635	0.633	-0.003	<0.541	-0.005	<0.538
	SE					0.339	0.234	0.033	0.027	0.029		0.034	
	Среднее, все виды					7.716	4.478	0.696	0.700	0.006	<0.001	-0.023	0.8785
	SE					0.152	0.103	0.010	0.008	0.008		0.007	

Примечание. n – размер выборки; N_a – среднее число аллелей; N_e – эффективное число аллелей; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность; F – коэффициент инбридинга; P-value – результаты “Probability”-теста на отклонение от соотношения Харди–Вайнберга. * Отклонение от соотношения Харди–Вайнберга по результатам “Global” теста (P < 0.05).
а Показатели изменчивости вычислялись после удаления образца, не соответствующего таксону выборки (см. Результаты).
б Выборка Вайк была объединена с выборкой Дилижан для подсчета параметров изменчивости из-за малого размера выборки.

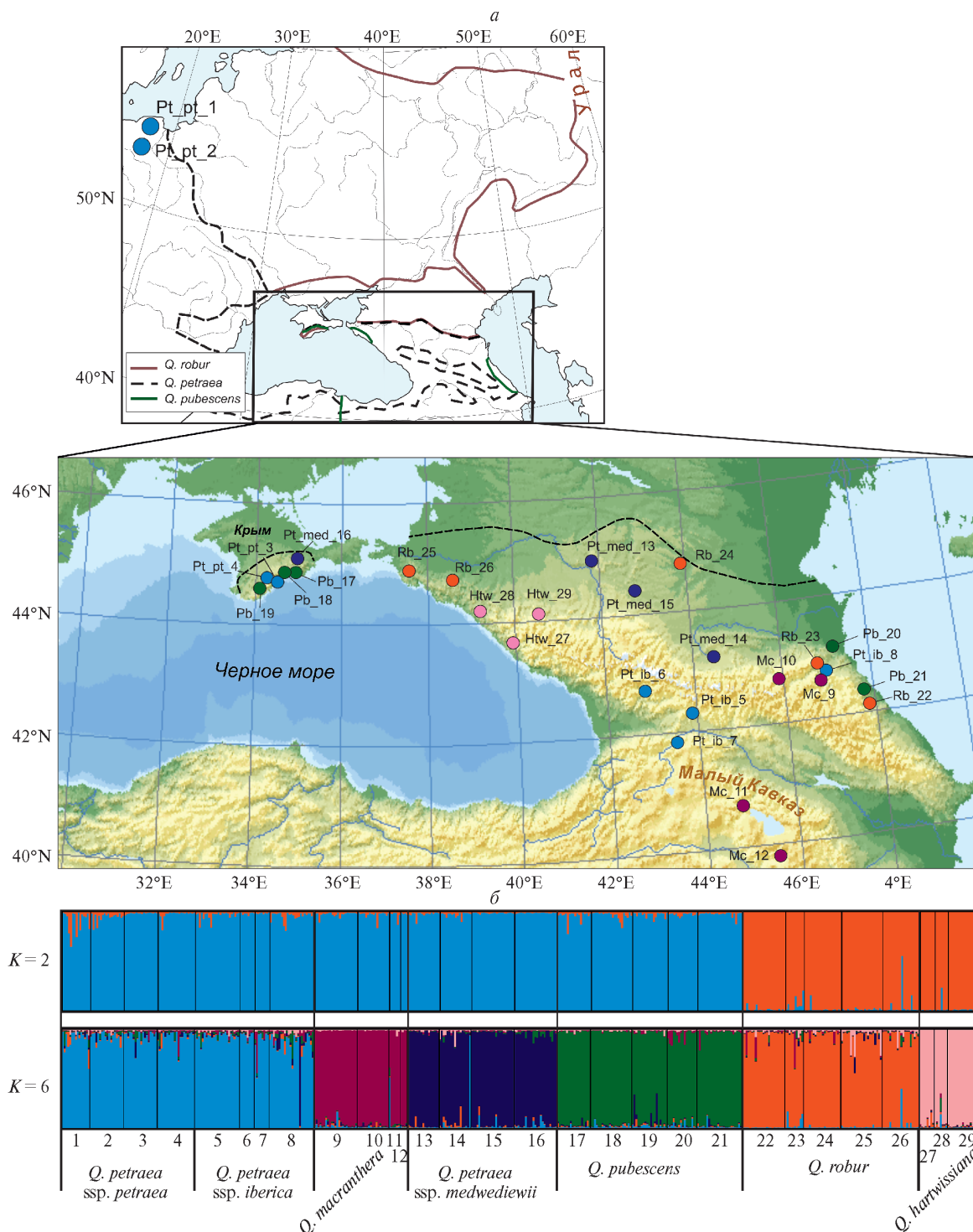


Рис. 1. а. Географическое распределение исследованных выборок семи таксонов робуроидных дубов в крымско-кавказской и северо-европейской частях ареала. Номера выборок соответствуют указанным в табл. 1. Обозначение таксонов: Rb – *Q. robur*, Pb – *Q. pubescens*, Mc – *Q. macranthera*, Htw – *Q. hartwissiana*, Pt_pt – *Q. petraea* ssp. *petraea*, Pt_ib – *Q. petraea* ssp. *iberica*, Pt_med – *Q. petraea* ssp. *medwediewii*. Цветовые обозначения выборок соответствуют преобладающим генетическим кластерам STRUCTURE при $K = 6$ (рис. 1, б). Пунктирной линией обозначена северная граница ареала дуба в регионе. **Рис. 1, б.** Распределение генетических кластеров, вычисленное с помощью STRUCTURE на основе 18 микросателлитных локусов для 29 популяции (492 особей) пяти видов *Quercus* при $K = 2, 6$. Каждый образец представлен вертикальным столбцом, разделенным на два или шесть цветных сегментов пропорционально участию каждого генетического кластера.

Объединение нескольких прогонов осуществляли с помощью программы Clumpak [41].

Анализ STRUCTURE был проведен для нескольких наборов данных. Набор 1 включал 492 образца из 29 популяций всех исследованных таксонов. Оптимальное число кластеров, согласно методу ΔK , в данном случае было равно двум (см. Результаты), при этом разделение на кластеры соответствовало разделению на две группы видов — “сидячецветные” (*Q. pubescens*, *Q. macranthera*, *Q. petraea* s. l.) и “длинноплодоножковые” (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*). Набор 2 STRUCTURE включал сидячецветные дубы (364 образца, 21 популяция) и набор 3 STRUCTURE — длинноплодоножковые *Q. robur* и *Q. hartwissiana* (128 образцов, 8 популяций).

Известно, что низкая представленность в исследуемом с помощью STRUCTURE наборе данных отдельных таксонов или популяций приводит к ошибочному отнесению соответствующих особей к неправильному таксону или гибриду [42]. Для исследования важности присутствия в анализе STRUCTURE референсных групп, предположительно соответствующих всем представленным таксонам, нами были проведены варианты анализов, “моделирующих” возможный пропуск отдельных таксонов.

“Моделируемый” вариант 1 — отсутствие в STRUCTURE референсных групп *Q. p. ssp. medwediewii*: из анализа были удалены все выборки *Q. p. ssp. medwediewii*, но оставлено четыре образца с 90% кластера *Q. p. ssp. medwediewii*. “Моделируемый” вариант 2 — отсутствие референсной группы *Q. hartwissiana*: из анализа были удалены все выборки *Q. hartwissiana*, оставлено четыре образца с 90% кластера *Q. hartwissiana*.

Для исследования возможности дифференциации таксонов при меньшем числе локусов анализы STRUCTURE были проведены отдельно для двух мультиплексов: десять локусов (kit-1) и восемь локусов (kit-2) для всех 492 индивидуумов.

Выявленные по результатам STRUCTURE образцы (всего три индивидуума), не относящиеся к таксону, соответствующему выборке (см. Результаты), были исключены из анализа изменчивости и дифференциации таксонов. С помощью программы GenAlEx v 6.5 [43] были рассчитаны следующие показатели: общее количество аллелей (A), число аллелей на локус (N_a), эффективное число аллелей (N_e), наблюдаемая H_o и ожидаемая H_e гетерозиготность, коэффициент инбридинга F для каждой популяции, индексы фиксации (F_{IS} , F_{ST}) для каждого локуса (табл. 1, 2). Отклонения от равновесия Харди–Вайнберга по популяциям и локусам оценивали с помощью GENEPOP [44], с использованием “Probability”-теста, а также “Global”-теста с альтернативной гипотезой $H1$ = недостаток гетерозигот/избыток гетерозигот. Наличие нуль-аллелей

в локусах оценивали с помощью программы MICRO-CHECKER [45].

Посредством GenAlEx был выполнен иерархический анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) для всех таксонов и популяций, вычислены парные межпопуляционные F_{ST} , проведен анализ главных координат (PCoA) на основе генетических расстояний [46]. Для визуализации степени генетических различий между популяциями и таксонами была построена дендрограмма на основе матрицы парных межпопуляционных F_{ST} с помощью метода невзвешенных парно-групповых средних (UPGMA) в программе NTSYS-pc [47].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменчивость микросателлитных локусов

Все исследованные таксоны *Quercus* показали успешную амплификацию во всех локусах. Суммарно в 29 популяциях по 18 локусам было обнаружено 389 аллелей. Их число на локус изменялось от 10 (PIE227) до 50 (QrZAG11), при среднем на локус — 21.6 (табл. 2). Эффективное число аллелей (N_e) варьировало от 2.038 (локус PIE239) до 7.906 (QrZAG7) при среднем на локус 4.478. Большинство локусов показали высокую изменчивость у всех видов, исключение составлял локус PIE239, который был почти неизменчив у *Q. macranthera* и *Q. hartwissiana*. Размеры фрагментов в локусах (табл. 2; табл. S2, Приложение) в целом соответствуют приводимым в работе [20] и нашему предыдущему исследованию *Q. robur* [36]. Однако следует отметить, что размеры аллелей в микросателлитных локусах, определенные с помощью капиллярного электрофореза (без секвенирования, только на основе размерного стандарта), могут значительно варьировать между исследованиями, в том числе в зависимости от использованного размерного стандарта и флуоресцентной метки данного локуса (см. Материалы и методы).

У отдельных локусов в небольшом количестве встречались аллели, не кратные длине мотива, больше всего таких наблюдалось у QrZAG11, что привело к большому количеству аллелей в данном локусе. У большинства локусов отсутствовали неспецифичные продукты и дополнительные аллели. Следует отметить, что в 90% образцов *Q. macranthera* в пределах диапазона локуса MsQ13 встречался продукт размером 192 пн, первоначально рассматриваемый как аллель, но поскольку продукт в большинстве случаев наблюдался в сочетании с гетерозиготой по двум другим аллелям, он был исключен из анализа как неспецифичный, после чего отклонений от соотношения Харди–Вайнберга у *Q. macranthera* по данному локусу не наблюдалось.

Таблица 2. Характеристика и параметры изменчивости 18 микросателлитных локусов

Локус	Размер, пн	A	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{IS}	P -value	F_{ST}
kit-1									
PIE020	97–127	13	5.214	3.193	0.708	0.658	–0.076*	0.842	0.137
PIE152	233–281	31	10.571	6.197	0.846	0.827	–0.023	0.958	0.088
PIE242	107–135	15	8.571	5.644	0.821	0.817	–0.005*	0.174	0.082
PIE102	137–181	23	7.679	3.755	0.670	0.671	0.003	0.776	0.135
PIE243	201–241	21	6.964	3.389	0.690	0.657	–0.051	0.770	0.204
PIE267	90–120	15	6.071	3.816	0.723	0.715	–0.012	0.594	0.147
PIE215	192–225	13	6.571	4.299	0.740	0.733	–0.009	0.480	0.119
PIE239	86–104	16	3.964	2.038	0.270	0.405	0.334*	<0.001	0.303
PIE227	154–181	10	4.143	2.272	0.532	0.508	–0.047	0.812	0.275
PIE271	186–212	17	7.107	3.903	0.732	0.711	–0.030	0.676	0.110
Среднее		17.4	6.686	3.851	0.673	0.670	0.008		0.160
kit-2									
QrZAG7	116–162	24	11.786	7.906	0.893	0.853	–0.046	0.962	0.081
MsQ13	188–250	26	8.179	4.953	0.796	0.763	–0.043	0.612	0.135
QrZAG112	77–121	22	6.536	3.712	0.569	0.552	–0.030*	0.031	0.251
QrZAG20	157–197	23	9.250	5.791	0.808	0.803	–0.006*	0.159	0.093
QrZAG96	143–189	24	9.464	5.521	0.655	0.715	0.084*	<0.001	0.210
QrZAG11	231–285	50	11.071	6.102	0.689	0.813	0.153*	<0.001	0.139
QpZAG15	107–147	19	6.250	2.934	0.613	0.618	0.008	0.666	0.188
QpZAG110	202–256	27	9.500	5.173	0.770	0.781	0.014	0.257	0.084
Среднее		26.9	9.005	5.262	0.724	0.737	0.017		0.148
СРЕДНЕЕ		21.6	7.716	4.478	0.696	0.700	0.012	<0.001	0.155
SE			0.152	0.103	0.010	0.008	0.023		0.016
Всего		389							

Примечание. A – общее число аллелей; N_a – среднее число аллелей на популяцию; N_e – эффективное число аллелей; H_o – наблюдаемая, H_e – ожидаемая гетерозиготность; F_{IS} , F_{ST} – индексы фиксации; P -value – результаты “Probability”-теста на отклонение от соотношения Харди–Вайнберга.

* Отклонение от соотношения Харди–Вайнберга по результатам “Global”-теста ($P < 0.05$).

Присутствие нуль-аллелей выявлено в локусах QrZAG11, PIE239, QrZAG96 в десяти, девяти и пяти популяциях соответственно. Для локуса PIE242 определено наличие нуль-аллеля в двух выборках, еще для шести локусов – в одной выборке. Локусы QrZAG11, PIE239, QrZAG96 показали значимое отклонение от соотношения Харди–Вайнберга в сторону недостатка гетерозигот (табл. 2). При подсчете по отдельным таксонам эти локусы отклонялись от равновесия в большинстве случаев (табл. S2, Приложение). Кроме трех локусов с максимальным отклонением, при суммарном анализе всех популяций также отклонялся от равновесия

локус QrZAG112, но при подсчете по отдельным таксонам отклонение локуса QrZAG112 было значимым только для *Q. p. ssp. iberica* и *Q. hartwissiana*. В отдельных случаях “Probability”-тест показал значимое отклонение от соотношения Харди–Вайнберга: для *Q. p. ssp. medwediewii* – в локусах PIE242, QrZAG110, *Q. p. ssp. petraea* – в локусе PIE227, *Q. macranthera* – QrZAG20, *Q. pubescens* – MsQ13, *Q. hartwissiana* – PIE242 (табл. S2, Приложение). Суммарно по 18 локусам и по всем популяциям отклонение от равновесия было значимым как для общей совокупности популяций (табл. 1), так и для большинства таксонов (табл. S3, Приложение).

“Probability”-тест при подсчете по 18 локусам показал значимое отклонение для восьми выборок. При проведении “Global”-теста значимый недостаток гетерозигот обнаружен в 10 популяциях (табл. 1).

Повторный тест провели без трех локусов, в которых наблюдалось наибольшее отклонение от равновесия (PIE239, QrZAG96, QrZAG11). По 15 локусам “Probability”-тест не показал значимого отклонения ни в одной из популяций (табл. 1). “Global”-тест на дефицит гетерозигот был значим для трех выборок разных таксонов (№ 16, 19, 28). Суммарно по всем локусам и по всем популяциям значимого отклонения от равновесия не наблюдалось ($F = -0.023$, $P = 0.8785$) (табл. 1).

Таким образом, популяции исследуемых таксонов, как показано по 15 nSSR-локусам, находятся в равновесии, что свидетельствует об их таксономической однородности. Существенный недостаток гетерозигот в локусах PIE239, QrZAG96 и QrZAG11 предположительно вызван присутствием в этих локусах нуль-аллелей, что также было отмечено для этих локусов в других исследованиях [14, 23, 30, 32, 36]. Однако было показано [23], что наличие нуль-аллелей с незначительной частотой, в том числе для локусов QrZAG11 и QrZAG96, не влияет на точность таксономического определения. В нашем случае только небольшая часть популяций имела значимое содержание нуль-аллелей; кроме того, значение подразделенности F_{ST} было выше среднего значения у двух (PIE239, QrZAG96) из трех отклоняющихся локусов, т. е. они вносили существенный вклад в дифференциацию таксонов. В результате было решено оставить локусы PIE239, QrZAG96, QrZAG11 в дальнейшем анализе.

Показатели изменчивости в мультиплексе из десяти EST-SSR-локусов (kit-1) в среднем были ниже, чем у восьми геномных SSR-локусов (kit-2) (табл. 2), однако значение подразделенности F_{ST} в среднем совпадало между мультиплексами. При объединенном анализе всех популяций F_{ST} было значимым для всех локусов и варьировало от минимального $F_{ST} = 0.081$ (локус QrZAG7) до максимального $F_{ST} = 0.303$ (PIE239) при среднем по локусам $F_{ST} = 0.155$ (табл. 2). Значения F_{ST} выше среднего встречались в каждом из двух мультиплексов, у локусов PIE243 (0.204), PIE239 (0.303), PIE227 (0.275), QrZAG112 (0.251), QrZAG96 (0.210), QrZAG15 (0.188).

Средняя ожидаемая гетерозиготность изменялась между таксонами от $H_e = 0.633$ (*Q. hartwissiana*) до $H_e = 0.777$ (*Q. pubescens*) (табл. 1). Наиболее высокая изменчивость наблюдалась в выборках дуба пушистого, варьируя от 0.754 до 0.797 и достигая максимальных значений в крымских популяциях *Q. pubescens*. У типового подвид дуба скального *Q. p. ssp. petraea* также наблюдалась высокая изменчивость, мало меняющаяся между выборками

(от 0.722 до 0.727), которая была выше, чем у закавказского подвида *Q. p. ssp. iberica*. У последнего она значительно варьировала от высокой в Дагестане (0.757) до сниженной в Закавказье (0.697). У *Q. macranthera* по сравнению с дубом скальным изменчивость была снижена, $H_e = 0.659$ (0.638–0.671). У исследованных кавказских популяций *Q. robur* средняя ожидаемая гетерозиготность составляла $H_e = 0.710$ (0.695–0.732). У *Q. hartwissiana* изменчивость была ниже, чем у *Q. robur*, $H_e = 0.633$ (0.626–0.646). У *Q. p. ssp. medwediewii* показатели изменчивости были ниже, чем у других широко распространенных таксонов Кавказа, $H_e = 0.652$ (0.640–0.662), и находились примерно на уровне изменчивости дуба Гартвиса и дуба крупнопыльникового.

Таксономическая и географическая структура изменчивости

Наборы аллелей у разных таксонов существенно перекрываются (табл. S2, Приложение). Наиболее частые аллели в локусах встречаются обычно во всех таксонах, но с разной частотой. Мы не обнаружили диагностических аллелей и локусов, по которым однозначно можно было бы определить таксон или отделить один таксон от другого. Аллели, специфичные для таксонов, встречались с низкой частотой. Несколько локусов показывали преобладание одного аллеля и низкое разнообразие у отдельных видов, при этом они были высоко изменчивыми у других видов. Например, в локусе PIE239 (с максимальным значением F_{ST}) аллель “88” встречается во всех таксонах с частотой, варьирующей от 0.136 (*Q. pubescens*), 0.351 (*Q. robur*) и 0.411 (*Q. p. ssp. medwediewii*) до 0.980 и 0.970 у *Q. macranthera* и *Q. hartwissiana*. В локусе QrZAG96 частота “короткого” аллеля “143” варьировала от 0.601 (*Q. robur*) и 0.576 (*Q. hartwissiana*) до 0.127 (*Q. p. ssp. petraea*) и 0.123 (*Q. p. ssp. iberica*), достигая почти нулевых значений у *Q. p. ssp. medwediewii* (0.025), *Q. pubescens* (0.015) и *Q. macranthera* (0.0). Интересно, что у *Q. macranthera* в локусе QrZAG96 преобладает аллель “145” (частота 0.806), который является редким у других таксонов.

По результатам AMOVA, уровень генетической дифференциации между семью таксонами F_{RT} составлял 0.102 ($P = 0.001$), что в 3 раза выше, чем дифференциация внутри таксонов ($F_{SR} = 0.032$, $P = 0.001$). Внутри таксонов (табл. S2, Приложение) максимальная дифференциация между популяциями выявлена у *Q. robur*, $F_{ST} = 0.077$, значимая для 17 локусов. Также дифференцированы популяции *Q. pubescens* ($F_{ST} = 0.042$), *Q. p. ssp. petraea* ($F_{ST} = 0.051$), *Q. hartwissiana* ($F_{ST} = 0.059$), *Q. p. ssp. iberica* ($F_{ST} = 0.041$). Наименее подразделены выборки *Q. macranthera* ($F_{ST} = 0.031$) и *Q. p. ssp. medwediewii* ($F_{ST} = 0.032$), для которых по большинству локусов значения F_{ST} недостоверны между выборками.

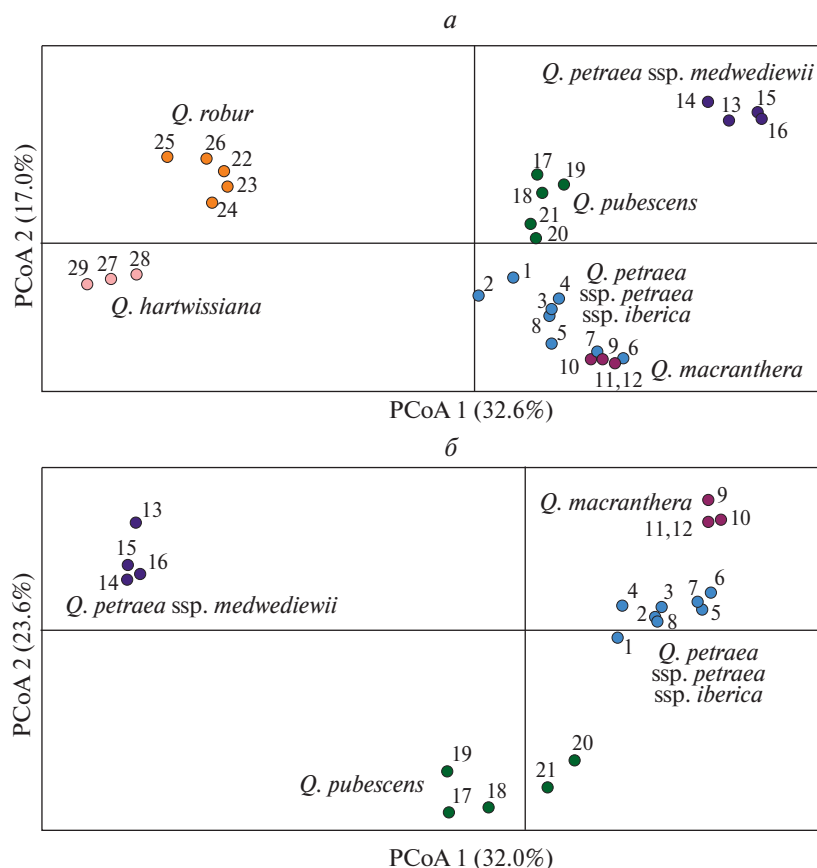


Рис. 2. PCoA-ординация, основанная на изменчивости 18 nSSR-локусов. *a* — популяции семи таксонов робуроидных дубов; *б* — популяции сидячецветных дубов *Q. petraea* s. l., *Q. macranthera*, *Q. pubescens*. Популяции обозначены цветом в соответствии с доминирующим кластером STRUCTURE при числе кластеров $K = 6$ при наборе 1 (см. рис. 1, б).

UPGMA-дендрограмма исследованных популяций (рис. S1, Приложение), построенная на основе парных F_{ST} , хорошо соответствует результатам анализа STRUCTURE, которые отражены в виде диаграмм частот соответствующих кластеров для каждой популяции (при $K = 6$, набор 1, см. далее). Наиболее глубокая дивергенция наблюдается между кладой I (*Q. robur* и *Q. hartwissiana*, цикл *Pedunculatae* Maleev [1], видов с длинной плодоножкой, далее в тексте — “длинноплодоножковые” таксоны) и кладой II (*Q. p. ssp. petraea-iberica*, *Q. p. ssp. medwediewii*, *Q. pubescens* цикла *Sessiliflorae* Maleev, а также *Q. macranthera*, видов с короткой плодоножкой, далее — “сидячецветные” таксоны) с последующим разделением на субклады отдельных таксонов. Усредненные значения парных F_{ST} между таксонами приведены в табл. S3 Приложения. Значения парных F_{ST} между таксонами клады II и *Q. robur* в среднем составляют 0.106, с *Q. hartwissiana* — 0.130. Внутри клады II значения парных F_{ST} между популяциями разных таксонов ниже: в среднем 0.081 (от 0.067 до 0.106). Внутри видов и подвидов

значения парных межпопуляционных F_{ST} были менее 0.05.

Различия между таксонами наглядно иллюстрируются ординацией популяций на основе генетических дистанций (рис. 2). По первой компоненте происходит дифференциация популяций “сидячецветных” от “длинноплодоножковых” таксонов, по второй компоненте подразделяются более близкие таксоны (рис. 2, *a*). При рассмотрении на PCoA только группы “сидячецветных” дубов (рис. 2, *б*) наиболее дифференцированной оказывается *Q. p. ssp. medwediewii*, также по первой компоненте отделяется *Q. pubescens*, далее *Q. macranthera* отделяется от *Q. petraea* и прослеживается дифференциация *Q. pubescens* на западную и восточную группы. При анализе PCoA, ограниченном только популяциями *Q. petraea* без *Q. p. ssp. medwediewii* (рис. S2, Приложение), по первой компоненте расходятся подвиды *Q. p. ssp. petraea* и *Q. p. ssp. iberica*, по второй компоненте *Q. p. ssp. petraea* разделяется на европейские и крымские популяции.

Анализ STRUCTURE по 18 nSSR-локусам всех исследуемых таксонов робуроидных дубов был проведен для 492 образцов (набор 1). При сложном таксономическом составе с различной степенью родства анализом STRUCTURE выявляется иерархическая структура: при числе кластеров $K = 2$ (максимальное значение ΔK , рис. S3a) исследуемые таксоны разделяются на две группы: объединенный кластер *Q. robur* и *Q. hartwissiana* (оранжевый) и объединенный кластер остальных таксонов (голубой) (рис. 1, б). При $K = 3, 4, 5$ разделение на кластеры между прогонами было неустойчивым, с поочередным отделением отдельных таксонов (*Q. p. ssp. medwediewii*, *Q. pubescens*, *Q. macranthera*) от остальных. Второй пик ΔK наблюдался при $K = 6$ (рис. S3a). При данном числе кластеров также достигалось высокое значение $LnP(K)$ (рис. S3б), и соответственно число кластеров, равное шести, было выбрано в качестве оптимального. На рис. 1, б представлены результаты анализа STRUCTURE для числа кластеров $K = 2$ и $K = 6$. При $K = 6$ выделяются генетические кластеры, соответствующие следующим видам, подвидам и группам: 1) кластер,

общий для двух подвигов *Q. petraea ssp. petraea* и *Q. p. ssp. iberica* (голубой кластер); 2) кластер *Q. macranthera* (пурпурный); 3) кластер *Q. petraea ssp. medwediewii* syn. *Q. calcarea* (темно-фиолетовый); 4) кластер *Q. pubescens* (зеленый); 5) кластер *Q. robur* (оранжевый); 6) кластер *Q. hartwissiana* (розовый). При $K = 6$ также выявляется минорная конфигурация (minor, 5/10, данные не приводятся), в которой голубой кластер разделяется на два в соответствии с подвидами — *Q. petraea ssp. petraea* и *Q. petraea ssp. iberica*, при этом *Q. robur* и *Q. hartwissiana* остаются в одном кластере.

При раздельном анализе двух основных групп (набор 2 — сидяцетцветные дубы и набор 3 — длинноплодоножковые дубы) прослеживается подразделение на таксоны аналогично набору 1, с дальнейшим разделением на географические группы популяций внутри таксонов при увеличении числа кластеров. На рис. 3 представлены результаты анализа STRUCTURE для набора 2 (сидяцетцветные таксоны) при числе кластеров $K = 4, 5, 6, 7$. Наибольшее значение ΔK было получено для $K = 4$, наибольшее значение $LnP(K)$ для $K = 6$ (рис. S4).

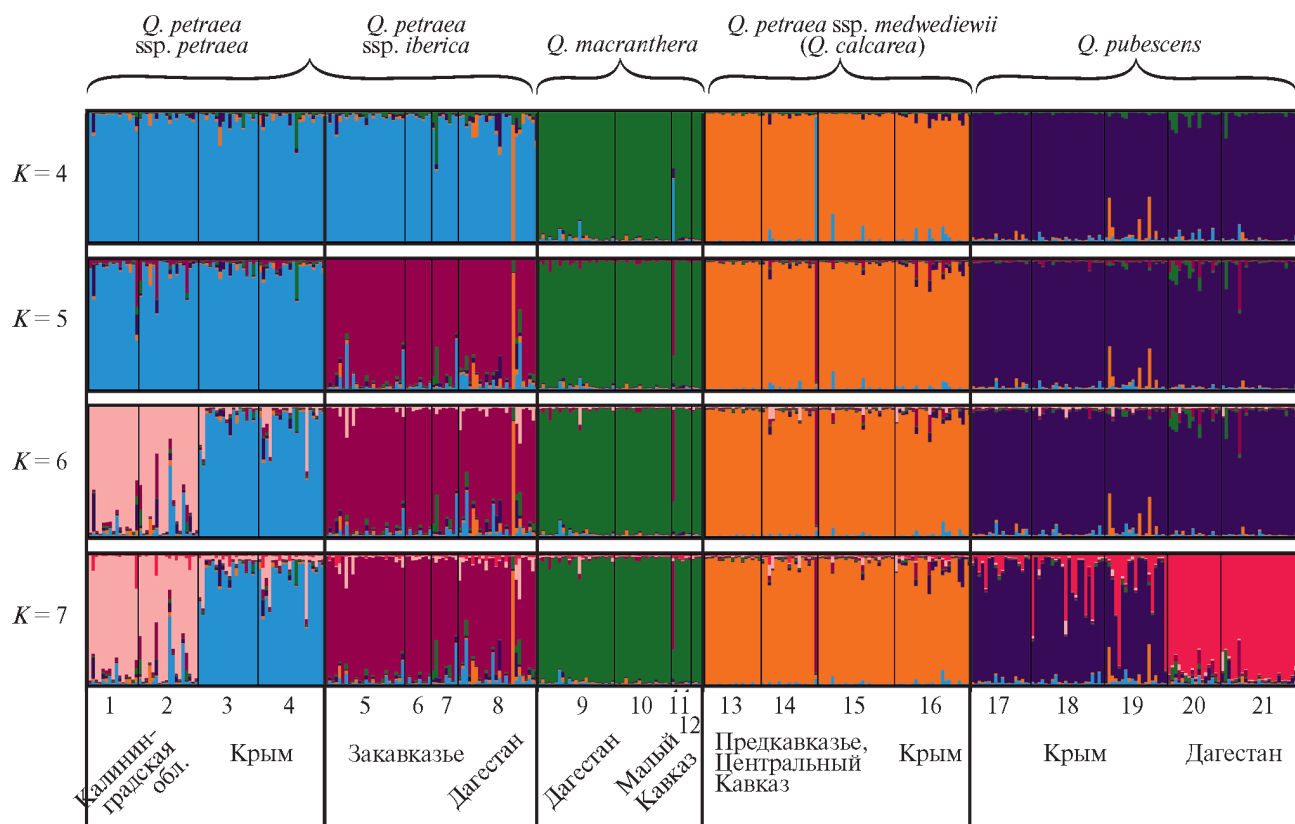


Рис. 3. Распределение генетических кластеров, вычисленное с помощью STRUCTURE на основе 18 микросателлитных локусов для 364 особей *Q. petraea* s. l., *Q. macranthera*, *Q. pubescens* (набор 2) при $K = 4, 5, 6, 7$. Каждый образец представлен вертикальным столбцом, разделенным на сегменты пропорционально участию каждого генетического кластера.

При наиболее вероятном числе кластеров $K = 4$ образцы разделяются на четыре группы, совпадающие с разделением при $K = 6$ для набора 1. Далее при $K = 5$ голубой кластер разделяется на два кластера в соответствии с подвидами *Q. p. ssp. petraea* и *Q. p. ssp. iberica*. При $K = 6$ *Q. p. ssp. petraea*, в свою очередь, разделяется на две группы: европейские выборки *Q. petraea* (№ 1, 2) и крымские выборки *Q. petraea* (№ 3, 4). При $K = 7$ *Q. pubescens* разделяется на два кластера — западный (Крым, № 17–19) и восточный (Дагестан, № 20, 21).

При отдельном анализе только образцов *Q. robur* и *Q. hartwissiana* (набор 3) максимальное значение ΔK было получено для $K = 2$ (рис. S5a), при котором индивидуумы разделяются в соответствии с видовой принадлежностью на *Q. robur* и *Q. hartwissiana*. Второй пик наблюдался при $K = 5$. Значение $LnP(K)$ последовательно повышалось, достигая максимума при $K = 5$ (рис. S5б). На рис. S6 Приложения приведены результаты STRUCTURE для $K = 2, 3, 4, 5$. При увеличении числа K происходит разделение *Q. robur* на географические группы, чего не наблюдается для *Q. hartwissiana*. При $K = 3$ *Q. robur* разделяется на кластеры восточно-кавказских (№ 22–24) и западно-кавказских (№ 25, 26) популяций. Далее при $K = 4$ наблюдается дифференциация в западно-кавказском, а при $K = 5$ — в восточно-кавказском кластере.

Круговые диаграммы частот кластеров STRUCTURE по популяциям представлены на рис. S1. Содержание кластеров было вычислено для популяций при наборе 1 ($K = 6$), за исключением трех индивидуумов, которые не соответствовали таксономической принадлежности (см. далее). Доля соответствующего таксона кластера составляла во всех популяциях более 85% (в среднем 93%): в выборках *Q. robur* — 91% (от 85 до 95%), *Q. hartwissiana* — 94% (от 92 до 97%), *Q. p. ssp. petraea* — 92% (от 90 до 93%), *Q. p. ssp. iberica* — 91.5% (от 85 до 95%), *Q. pubescens* — 93% (от 85 до 95%), *Q. p. ssp. medwediewii* — 93% (от 91 до 96%), *Q. macranthera* — 95% (от 94 до 97%).

Особенности генотипирования при микросателлитном анализе

Обнаружено, что содержание кластера другого таксона в выборке может быть около 2% даже при невозможности современной гибридизации. Например, STRUCTURE показывает 2% кластера западно-кавказского вида *Q. hartwissiana* в выборке № 23 *Q. robur* и 3% в выборке № 14 *Q. p. ssp. medwediewii* в Восточном и Центральном Кавказе, 2.2% кластера восточно- и закавказского *Q. macranthera* в выборке № 4 *Q. petraea* в Крыму. То есть возможную гибридизацию можно предполагать, только если процент “чужого” кластера повышен до 4–5% в популяции и при потенциальной

возможности генетического потока благодаря перекрытию ареалов. Повышенное содержание кластера *Q. robur* наблюдается в выборках № 1 (4.2%) и № 27 (3.7%), кластера *Q. p. ssp. medwediewii* — в выборке № 19 (5.3%), кластера *Q. pubescens* — № 8 (4.3%), кластера *Q. hartwissiana* — № 25 (5.9%), кластера *Q. macranthera* — 5% в выборках № 20 и № 23. Все эти случаи совпадают с возможностью гибридизации благодаря симпатрии.

Поскольку видовая принадлежность образцов устанавливалась визуально в полевых условиях, в собранном материале встречались ошибочно определенные индивидуумы, что ожидаемо, учитывая значительное перекрытие у рассматриваемых таксонов диагностических признаков. В двух выборках (№ 8 и № 14) было выявлено по одному образцу, которые анализ STRUCTURE относил к кластеру другого подвида внутри *Q. petraea* (рис. 1, б, рис. 3), что соответствовало возможному географическому распространению подвидов при перекрытии ареалов (см. Обсуждение). В одной из выборок *Q. macranthera* (№ 11) был выявлен образец, у которого соотношение между кластерами, соответствующими *Q. p. ssp. iberica* и *Q. macranthera* согласно STRUCTURE, было примерно 65 : 35%, что вероятно указывает на гибрид с преобладанием *Q. p. ssp. iberica*. По гербарному материалу выяснилось, что у данного образца отсутствовало характерное для *Q. macranthera* опушение. Результаты микросателлитного анализа позволили правильно установить таксономическую принадлежность некоторых образцов, но, кроме того, встречено определенное количество, по-видимому, настоящих гибридов: один индивидуум в популяции *Q. p. ssp. iberica* № 7 имел 35% кластера *Q. macranthera*. В популяции *Q. pubescens* № 19 два образца имели по 25–30% кластера *Q. p. ssp. medwediewii*, в популяциях *Q. robur*: в выборке № 25 три образца имели 25–30% кластера *Q. hartwissiana*, в № 23 у одного образца — 35% кластера *Q. macranthera*, в № 26 у одного образца — 45% кластера *Q. petraea*.

Для исследования возможности выявления кластера таксона при его малой представленности в данных был проведен ряд экспериментов с использованием STRUCTURE (см. Материалы и методы). “Моделируемый” вариант 1 исключал из анализа *Q. p. ssp. medwediewii*, кроме четырех образцов. При наиболее вероятном числе кластеров $K = 4$ эти образцы были отнесены алгоритмом к кластеру *Q. pubescens*, далее при увеличении числа кластеров — к гибридным образцам нескольких таксонов, и только лишь при числе $K = 9$ выделился отдельный кластер четырех образцов *Q. p. ssp. medwediewii* (данные не приводятся). В “моделируемом” варианте 2, исключающем из анализа референсные популяции *Q. hartwissiana*, четыре оставленных образца дуба Гартвиса были отнесены к *Q. robur* и не выделялись в отдельный кластер

до достижения $K = 12$. Таким образом, сниженное количество определенного таксона в анализе STRUCTURE, по сравнению с представленностью остальных групп, приводит к неверному определению образца при наиболее правдоподобном числе кластеров и выявляет видоспецифичный кластер только при значительном числе K (что обычно не отвечает критериям оптимальности и не рассматривается в исследованиях).

При выполнении анализа STRUCTURE с различными наборами видов (наборы 1, 2, 3) показано, что при отсутствии отдельных таксонов в анализе может быть неверная интерпретация гибридов: например, при наборе 3 (включающем только *Q. hartwissiana* и *Q. robur*) в выборке *Q. hartwissiana* № 28 один образец содержал 50% кластера *Q. robur* (рис. S6). При наборе 1 (рис. 1, б) данный индивидиум оказывается смешанным гибридом с вкладом *Q. petraea/Q. pubescens* без участия *Q. robur*. Некоторые гибриды вообще не выявляются при пропуске таксонов, например, в выборке *Q. robur* № 26 при наборе 1 выявился гибрид с 45% кластера *Q. petraea*, чего не показывал набор 3.

Для исследования возможности дифференциации таксонов при меньшем числе локусов анализа STRUCTURE были проведены отдельно для двух мультиплексов: десять локусов (kit-1) и восемь локусов (kit-2). Состав кластеров, на которые при этом подразделялись популяции, не изменился (данные не приводятся), что показывает возможность идентификации таксонов для относительно чистых популяций при меньшем наборе локусов. Однако отнесение отдельных индивидуумов к определенным таксонам может быть неверным: при малом числе локусов у индивидуумов возрастают частоты кластеров других видов, иногда до существенной величины, делая эти особи потенциально “гибридными”. Например, в выборках *Q. pubescens* из приморских выборок южного макросклона Главной гряды Крымских гор для трех особей показано участие генов кластера *Q. robur* в 60–80% (набор kit-2, восемь локусов), что является маловероятным при полном отсутствии *Q. robur* на южном макросклоне. При использовании обоих наборов локусов этого не наблюдается. Таким образом, для предварительной дифференциации таксонов можно использовать меньшее число локусов (например, только kit-2), что снижает затраты, но для более точного определения каждого индивидуума, особенно при исследовании процессов гибридизации в смешанных популяциях, необходим анализ большого числа локусов (в нашем случае — использование двух мультиплексов).

ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференциация таксонов *Quercus* крымско-кавказского региона по микросателлитным данным

С помощью 18 nSSR-локусов было изучено генетическое разнообразие *Q. robur*, *Q. hartwissiana*, *Q. petraea* ssp. *petraea*, *Q. p.* ssp. *iberica*, *Q. p.* ssp. *medwediewii*, *Q. pubescens* и *Q. macranthera* в Крыму, на Кавказе и в северо-восточной Европе (рис. 1, а). Все таксоны, в том числе исследованные впервые с использованием nSSRs (*Q. hartwissiana*, *Q. macranthera*, *Q. p.* ssp. *iberica*, *Q. p.* ssp. *medwediewii*), показали стабильную амплификацию и достаточно высокую изменчивость во всех локусах. Наборы аллелей у видов во многом перекрываются, и виды в основном отличаются по частотам аллелей. Используемые локусы хорошо диагностируют таксономическую принадлежность индивидуумов, выявляя при этом гибридные образцы. По результатам STRUCTURE (рис. 1, б, рис. 3) были выделены генетические кластеры, соответствующие всем семи таксонам.

При $K = 2$ (рис. 1, б) все образцы разделяются в соответствии с признаком соотношения длин плодоноса и черешка листа на группу длинноплодоножковых (*Q. robur*, *Q. hartwissiana*) и группу сидячецветных дубов (все остальные, включая *Q. macranthera*), что согласуется с результатами филогенетического исследования, основанного на RADseq маркерах [5], где дерево максимального правдоподобия содержало кладу *Q. robur*, *Q. hartwissiana* и *Q. canariensis*, сестринскую по отношению к кладе, включающей *Q. petraea*, *Q. pubescens* и *Q. macranthera*. Интересно, что родство *Q. robur*, *Q. hartwissiana* и *Q. canariensis* предполагалось ранее на основе морфологических признаков Ю. Л. Меницким [2]. Кроме того, в ранее проведенных исследованиях на основе nSSR-маркеров различия между *Q. robur* и сидячецветными дубами (*Q. pubescens*, *Q. petraea*, *Q. frainetto* и др.) были выше, чем между последними [12, 15, 16, 24, 29]. Вместе с тем разделение исследуемых нами таксонов на две группы не соответствует классификации Ю. Л. Меницкого, который распределил эти таксоны по трем подсекциям [6–9] (Subsect. *Quercus*, Subsect. *Macrantherae*, Subsect. *Galliferae*), а также другим недавним классификациям европейских дубов секции *Quercus* [48].

Все исследуемые таксоны сидячецветных дубов (*Q. pubescens*, *Q. macranthera* и три подвида *Q. petraea*) дифференцированы друг от друга, что отражает STRUCTURE (рис. 3) и PoCA (рис. 2; рис. S2). По результатам AMOVA, уровень генетической дифференциации F_{RT} между пятью сидячецветными таксонами (включая подвиды) был достаточно высок и составлял 0.085 ($P = 0.001$), что в 4 раза

выше, чем дифференциация внутри таксонов ($F_{ST} = 0.022$, $P = 0.001$). Видовой уровень подтверждается у *Q. pubescens* и *Q. macranthera* и предполагается для одного из подвидов дуба скального (*Q. petraea* ssp. *medwediewii*), показавшего высокую дифференциацию от двух других подвидов *Q. petraea*.

Среди исследованных образцов при совместном обитании нескольких таксонов обнаружены гибридные особи, однако значительное преобладание «чистых» образцов подтверждает, что гибридизация между видами затруднена, вероятно, вследствие экологической и фенологической изоляции [8].

*Дуб Гартвиса Q. hartwissiana
и дуб черешчатый Q. robur*

Если дуб черешчатый ранее изучался с помощью nSSR-маркеров в кавказском регионе [36], то дуб Гартвиса *Q. hartwissiana* исследован впервые. В анализ *Q. hartwissiana* вошло 33 образца из трех локалитетов нескольких районов Кавказа (рис. 1). Обнаружены надежные отличия по микросателлитным маркерам дуба Гартвиса от других видов дубов, в том числе от ближайшего к нему *Q. robur* (рис. 1, 2; рис. S6), и подтвержден видовой статус этого морфологически хорошо отличающегося вида [1–3].

Внутри *Q. robur* на Кавказе при $K \geq 3$ наблюдается четкий географический паттерн, с последовательным разделением популяций согласно географическим группам, совпадающим с выявленными ранее на основе изменчивости 14 nSSR-локусов [36]. В отличие от *Q. robur* выборки *Q. hartwissiana* с северного (№ 29) и южного (№ 27, 28) макросклонов Большого Кавказа по результатам STRUCTURE остаются однородными. Однако подразделенность трех популяций дуба Гартвиса (парные $F_{ST} = 0.040–0.049$) была достаточно высокой, вероятно, благодаря значительной фрагментации популяций *Q. hartwissiana*, местообитания которого обычно ограничены долинами рек [3]. Между дубами черешчатым и Гартвиса, очевидно, сохраняется генетический поток. Так, например, в популяциях *Q. robur* по результатам STRUCTURE доля кластера *Q. hartwissiana* выше на Западном Кавказе (выборка № 25, рис. S6), где и распространен последний.

Внутрипопуляционная изменчивость у *Q. hartwissiana* по сравнению с *Q. robur* снижена во всех выборках. Вероятно, этот теплолюбивый, мезофильный вид испытывал особенно серьезные сокращения численности в неблагоприятные климатические эпохи. Большинство исследователей считают *Q. hartwissiana* близким наиболее древней форме третичных робуроидных дубов [1, 8]. Одновременно экологические свойства дуба Гартвиса — приуроченность к теплым и влажным биотопам и

принадлежность к ядру третичной флоры — указывают на реликтовый характер этого вида [8]. Ю.Л. Меницкий отмечает, что дуб Гартвиса по морфологии листа близок к дубу грузинскому *Q. petraea* ssp. *iberica* [1], но такие черты как цветение одновременно с распусканием листьев и длинный плодородный отражают начавшуюся адаптацию к холодному климату и сближают дуб Гартвиса с дубом черешчатым, что свидетельствует об их общем происхождении [8].

*Дифференциация дуба известнякового Q. petraea
ssp. medwediewii от дуба скального Q. petraea*

В исследованных районах Кавказа и в Крыму, согласно таксономической системе Ю.Л. Меницкого [1, 3, 6], произрастают три широко распространенных подвида *Q. petraea*. Если типовой подвид *Q. p. ssp. petraea* был исследован во множестве работ в Западной, Центральной и Восточной Европе [15, 16, 19, 23, 24, 26, 28, 33], то два других, более восточных подвида дуба скального были впервые изучены с помощью ядерных маркеров. Наиболее неожиданным и важным результатом является то, что подвиды *Q. petraea* не формируют общей группы на PCoA-ординации и на дендрограмме UPGMA (рис. 2; рис. S1), а образуют два кластера, как и при анализе STRUCTURE (рис. 3). Один из кластеров по распространению и морфологическому описанию соответствует подвиду *Q. petraea* ssp. *medwediewii* (A. Camus) Menitsky (syn. *Q. calcarea* Troitsky). Степень отличий данного таксона по nSSRs как от двух других подвидов дуба скального, так и от *Q. pubescens* и *Q. macranthera* подтверждает трактовку данного таксона в ранге вида — *Q. calcarea* Troitsky [9].

Предположение Ю.Л. Меницкого о возможном гибридном происхождении *Q. p. ssp. medwediewii* [1–3] в ходе исторической гибридизации *Q. petraea* и *Q. pubescens*, высказанное на основании наличия переходных морфологических признаков, генетическим анализом не подтверждается. Популяции *Q. p. ssp. medwediewii* не являются промежуточными на PCoA-ординации (рис. 2), а индивидуумы не содержат смеси генетических пулов других видов по результатам STRUCTURE (рис. 3) и сохраняют свою генетическую идентичность не только в районах произрастания отдельно от других подвидов *Q. petraea* и остальных сидячецветных дубов (Центр. Кавказ и Предкавказье, рис. 1, а), но и в районах, где дуб известняковый произрастает вместе с другими близкородственными таксонами (например, № 16, Крым).

Существование и интерпретация таксона «дуб известняковый» *Q. p. ssp. medwediewii* (= *Q. calcarea*), отличающегося морфологически и экологически от других сидячецветных дубов и занимающего большой ареал на северном макросклоне Большого Кавказа, в Предкавказье и в Крыму, много

лет составляют предмет дискуссий [7]. В различных таксономических классификациях этот дуб [1, 7, 10] рассматривался как отдельный вид, подвид дуба пушистого, подвид дуба скального, или же не признавался как отдельный таксон. Синонимом *Q. p. ssp. medwediewii* Ю. Л. Меницкий считал *Q. dalechampii* Ten. — европейский вид [49], систематическое положение и трактовка которого, в свою очередь, остаются весьма неопределенными и до сих пор не получили должного разрешения [обзор 7, 49–52]. После недавнего пересмотра в объеме и составе таксона *Q. dalechampii* и разделения его на две части, относящиеся к системам *Q. petraea* и *Q. pubescens* [50], для Центральной Европы было предложено новое название — *Quercus banatus* P. Kucera [51].

Несоответствие таксономических классификаций объясняется не только морфологическим сходством и во многом перекрывающимися признаками между близкими таксонами, но и разной степенью изученности таксонов в регионах. Если в работах Ю. Л. Меницкого [1] и Н. Д. Троицкого [9] на большом материале была исследована морфологическая изменчивость кавказских и крымских популяций дуба известнякового, то расширенного сравнения с европейскими популяциями *Q. dalechampii* не проводилось, что, вероятно, обуславливает разное понимание объема видов (систем видов) дуба скального и дуба пушистого. Наше исследование показывает, что дуб известняковый (*Q. p. ssp. medwediewii* = *Q. calcarea*) ясно дифференцирован от всех исследованных нами таксонов и по уровню отличий может быть признан отдельным видом, так как отличия находятся на уровне различий между дубами пушистым и скальным. В целом запутанность классификаций лишь увеличивает необходимость совместного исследования предположительно родственных таксонов и расширения географии с привлечением материала из Европы, в том числе *Q. dalechampii* (или *Q. banatus*).

Показатели изменчивости *Q. p. ssp. medwediewii* снижены по сравнению с другими распространенными видами, по-видимому, в результате уменьшенного эффективного размера популяции, а слабая дифференциация в пределах крымско-кавказского региона, вероятно, связана с недавним расселением из одного источника. Возможно, низкий эффективный размер популяций также является причиной увеличенных генетических различий *Q. p. ssp. medwediewii* с другими таксонами. Примерно равная дифференциация с близкородственными видами — дубом пушистым (средние парные $F_{ST} = 0.078$), дубом скальным (0.086) и дубом грузинским (0.089) делает неопределенными филогенетические связи *Q. p. ssp. medwediewii*.

Два других исследованных подвида *Q. petraea* (типовой подвид *Q. p. ssp. petraea* и дуб грузинский

Q. p. ssp. iberica) дифференцированы друг от друга в гораздо меньшей степени, чем от дуба известнякового и от других видов (рис. 2, б; рис. S1), однако географическое распределение популяций с заметным участием соответствующих кластеров STRUCTURE подтверждает правомерность выделения внутри *Q. petraea* подвида *Q. p. ssp. iberica* (рис. 3; рис. S2). Филогенетическое исследование на основе изменчивости ITS-последовательностей [53] также подтвердило различия двух таксонов, не исключаяющих их видовой статус при выраженном родственном отношении между подвидами.

Интересно, что у типового подвида наблюдается географическая структура. Популяции Крыма отличаются от *Q. petraea* из Калининградской области (рис. 3; рис. S1), при этом не являясь переходными между дубом грузинским и дубом скальным (рис. S2). Генетические особенности *Q. petraea* из Крыма, возможно, объясняют отнесение по морфологическим признакам крымских популяций как к *Q. iberica* [9], так и к *Q. p. ssp. petraea* [1]. Для более полного выявления внутривидовой структуры *Q. petraea* необходимо исследование популяций Черноморского побережья Кавказа [1, 6], где отмечено произрастание как обоих подвигов, так и гибридов между ними, а также включение в анализ *Q. petraea* из Малой Азии и Балканского п-ова, где возможно могут произрастать оба таксона [54].

Обнаружение в популяции № 14 (Балта) среди выборки *Q. p. ssp. medwediewii* одного индивидуума, относящегося к *Q. p. ssp. iberica*, является важным подтверждением наблюдений Ю. Л. Меницкого, который в своих работах описывал ареал дуба грузинского как почти не заходящий севернее Главного Кавказского хребта, но отмечал его присутствие в Верхнетерском флористическом р-не (Центральный Кавказ) [6], в частности в Саургомском ущелье, вблизи п. Чми [1], т. е. в непосредственной близости к собранной нами выборке № 14.

Дуб пушистый *Q. pubescens*

По результатам нашего исследования показано, что *Q. pubescens* из крымско-кавказской части ареала относится к одному таксону. Выборки и индивидуумы *Q. pubescens* из Дагестана близки к популяциям *Q. pubescens* Крыма, образуют общий кластер при анализе STRUCTURE (рис. 1, б; рис. 3) и общую группу на PCoA-ординации (рис. 2). Систематически и географически (по распространению в Крыму и на Кавказе) выделенная группа в наибольшей степени совпадает с трактовкой Меницкого [1, 6].

Внутри группы из пяти выборок *Q. pubescens* F_{ST} составил 0.042 ($P = 0.001$). Среди них наибольшие отличия наблюдаются между восточными (Дагестан) и западными (Крым) выборками. Внутри этих регионов дифференциация была низкой. По

результатам STRUCTURE (рис. 3) при $K = 7$ (набор 2) дуб пушистый разделяется на два кластера — западный (Крым) и восточный (Дагестан). Такое же деление наблюдается на UPGMA-дендрограмме (рис. S1) и на PCoA (рис. 2). Кроме изоляции расстоянием, причина дифференциации *Q. pubescens*, возможно, связана с длительными процессами гибридизации при произрастании симпатрически с разными таксонами. В дагестанских выборках *Q. pubescens* содержит больше примеси *Q. macranthera* и *Q. p. ssp. iberica*, а в крымских выборках — *Q. p. ssp. medwediewii* и *Q. p. ssp. petraea*.

Повышенное, по сравнению со всеми изученными таксонами, генетическое разнообразие дуба пушистого соответствует отмечаемому в других работах [например, 14, 22, 23] и объясняется высокой способностью к гибридизации, по-видимому — исторической, поскольку в нашем случае *Q. pubescens* образует “чистый” кластер, без заметной доли других таксонов. Мы предлагаем также другое объяснение увеличенного аллельного разнообразия — высокий эффективный размер популяции вида, даже несмотря на ограниченное распространение на Кавказе. Возможно, это имеет исторические причины и связано с более широким распространением этого вида в прошлом [1].

*Дуб крупнопольниковый, или
восточный, Q. macranthera*

Данный таксон впервые исследован микросателлитными маркерами, которые подтвердили видовой статус *Q. macranthera*. Выборки и почти все индивидуумы, предварительно отнесенные к *Q. macranthera*, по nSSR-маркерам дифференцировались от образцов других видов в отдельный кластер STRUCTURE (рис. 1, б; рис. 3) и образовали отдельную кладу на UPGMA и группу на PCoA-ординации (рис. 2, б). Показатели изменчивости ($H_e = 0.659$) были несколько снижены, дифференциация популяций внутри таксона не выявлена, несмотря на включение в анализ выборок из географически удаленных регионов (Дагестан, Армянское нагорье). Обнаружен возможно гибридный индивидуум в выборке Дилижан (№ 11), с преобладанием кластера *Q. p. ssp. iberica* (рис. 3). При повторном рассмотрении гербария данного образца отмечено почти полное отсутствие характерного для *Q. macranthera* опушения.

Повышенное содержание кластера *Q. macranthera* отмечено в популяциях других видов, произрастающих вместе с ним в Дагестане и Закавказье (*Q. robur* — выборки № 22 и 23, *Q. p. ssp. iberica* — № 7 и 8, *Q. pubescens* — № 20 и 21). Интересно, что эти виды при этом практически не образуют с *Q. macranthera* смешанных популяций, обитая с ним на разных высотах. *Q. macranthera* генетически близок другим сидячецветным таксонам и входит

в кладу II (UPGMA). Согласно филогенетическим исследованиям на основе данных RADseq [5] и ITS-последовательностей [53], этот таксон родственен *Q. frainetto* и относится к кладе, содержащей *Q. pubescens* [5]. Дальнейшее исследование кавказских таксонов с привлечением в анализ близкородственных европейских видов и моделирование демографии на основе метода ABC могут более точно определить эволюцию данной группы видов.

*Эффективность распознавания таксонов при
разном составе локусов и референсных групп*

Все примененные в нашем исследовании локусы имеют F_{ST} между таксонами не менее 0.081 (табл. 2). Внутри таксонов подразделенность между популяциями была значимой, однако выраженная географическая структура была выявлена только внутри *Q. p. ssp. petraea*, *Q. pubescens* и *Q. robur*. Применение для дискриминации таксонов только одного из мультиплексов (что сокращало время и затраты) показало аналогичное двум мультиплексам разделение популяций на таксоны, однако точность отнесения образцов к таксону снижалась (см. Результаты). Ранее было показано, что некоторые локусы лучше дискриминируют виды или группы видов, и их применение для установления видовой принадлежности дает результат не менее эффективный, чем использование большого набора локусов [19]. В некоторых исследованиях впоследствии применялся ограниченный набор локусов для дискриминации пары видов (например, в работе [55] отобрано четыре локуса для разделения *Q. robur* и *Q. petraea*). Однако во многих примерах было показано, что для других сочетаний видов дискриминирующими могут являться другие локусы [например, 13, 21, 22]. Анализ наших данных показал, что, хотя некоторые локусы более дифференцируют отдельные таксоны, наиболее целесообразно применение всех 18 локусов, поскольку для Кавказа и Крыма вполне обычно присутствие нескольких таксонов в смешанных насаждениях или же произрастание в непосредственной близости — до четырех таксонов в Крыму и в Закавказье, до пяти таксонов — на Западном и Восточном Кавказе.

Для одного из наиболее известных так называемого “outlier loci” QrZAG96 [19], описанного в ряде исследований как наиболее дискриминирующего *Q. petraea* и *Q. robur* и потенциально находящегося под действием отбора, в европейских популяциях *Q. robur* отмечалась тенденция к фиксации наиболее короткого аллеля, который ранее ассоциировался с морфологическим признаком относительной длины черешка листа. Однако в настоящей работе впервые показано, что повышенная частота этого аллеля наблюдалась не только для *Q. robur* (среднее 0.601), но и для *Q. hartwissiana* (0.576), что гораздо выше, чем у сидячецветных дубов (от 0 до

0.127). Вероятно, этот факт отражает общее происхождение *Q. robur* и *Q. hartwissiana* и не связан с длиной черешка, которая у *Q. hartwissiana* ближе к *Q. petraea*. Соответственно ассоциация локуса QrZAG96 с гипотетическим QTL, контролирующим длину черешка, не подтверждается. Кроме того, почти полная фиксация короткого аллеля у *Q. robur* в более западных европейских популяциях замещается гораздо более низкой частотой на Кавказе (меняясь от 0.342 до 0.909) и в Турции (0.210) [17].

Изучение возможности выявления генетической структуры с помощью метода байесовской кластеризации при низкой численности отдельных таксонов в анализируемых данных (“моделируемые” варианты 1 и 2) показало вероятность некорректной классификации чистых образцов и гибридов таксонов, недостаточно представленных в анализируемых данных. Эти результаты подтверждают вывод более ранних исследований [18, 23, 24] о необходимости включения в анализ значительного количества референсных особей каждого из таксонов, потенциально присутствующих в районе исследований. При достаточном объеме материала для всех произрастающих в исследованной части ареала таксонов, использованные нами 18 nSSR-локусов гораздо лучше дискриминировали их, чем значительное количество ядерных SNPs, проанализированных без учета всего разнообразия крымско-кавказских *Quercus* [56].

Выделенные в нашей работе генетические кластеры могут быть использованы как референсные для исследования процессов гибридизации в районах совместного произрастания близких таксонов, для установления таксономической принадлежности при отсутствии возможности определения на основе морфологии, для уточнения распространения таксонов и создания программ защиты генетических ресурсов в крымско-кавказском регионе.

Таким образом, наше исследование показывает эффективность использования имеющихся наборов микросателлитных локусов для идентификации робуроидных дубов крымско-кавказского региона. Выявленная генетическая кластеризация образцов соответствовала их таксономическому подразделению на основе морфологических признаков и распространению семи таксонов *Quercus* в исследуемых районах [1, 3, 6]. Видовой статус подтверждается у всех видов и, кроме того, предполагается для дуба известнякового *Q. petraea* ssp. *medwediewii*. Полученные результаты подтверждают мнение, что интрогрессия близких видов дуба в регионе сильно ограничена [8], поскольку не ведет к стиранию различий, нарушению целостности и эволюционной самостоятельности таксонов.

Авторы выражают благодарность Е. В. Зиновьеву, И. Ю. Исакову, Н. В. Семерикову, З. А.

Гусейновой, З. М. Асадулаеву за помощь в сборе образцов дуба и анонимному рецензенту за конструктивные замечания и предложения.

Исследование выполнено за счет Госзадания Института экологии растений и животных УрО РАН, no. 122021000090-5. Сбор части образцов в 2022–2023 гг. проведен за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00667, <https://rscf.ru/project/22-24-00667/>.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объектов людей и животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меницкий Ю.Л. Дубы Кавказа. Обзор кавказских представителей секции *Quercus*. Л.: Наука, 1971. 196 с.
2. Меницкий Ю.Л. Дубы (*Quercus* L.) Юго-Западной Азии // Новости систематики высших растений. Л.: Наука, 1972. Т. 9. С. 105–140.
3. Меницкий Ю.Л. Дубы Азии. Л.: Наука, 1984. 315 с.
4. Kremer A., Hipp A.L. Oaks: An evolutionary success story // New Phytologist. 2020. V. 226. № 4. P. 987–1011. <https://doi.org/10.1111/nph.16274>
5. Hipp A.L., Manos P.S., Hahn M. et al. Genomic landscape of the global oak phylogeny // New Phytologist. 2020. V. 226. № 4. P. 1198–1212. <https://doi.org/10.1111/nph.16162>
6. Конспект флоры Кавказа: в 3 томах / Под ред. Кудряшовой Г.Л., Татанова И.В. СПб.; М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2012. Т. 3. Ч. 2. 623 с.
7. Schmidt P.A. Oaks and oak forests in Caucasia // Proc. Fourth Intern. oak conf. 2004. № 15. P. 9–29.
8. Семериков Л.Ф. Популяционная структура древесных растений (на примере видов дуба европейской части СССР и Кавказа). М.: Наука, 1986. 140 с.
9. Троицкий Н.Д. Предварительные итоги изучения дубов Крымского государственного заповедника и прилегающего района южного берега Крыма (систематика в связи с условиями произрастания) // Журнал РБО. 1931. Т. 16. № 4. С. 313–354.
10. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств. СПб., 1995. 990 с.
11. Valbuena-Carabana M., Gonzalez-Martinez S.C., Hardy O.J., Gil L. Fine-scale spatial genetic structure in mixed oak stands with different levels of hybridization // Mol. Ecol. 2007. V. 16. № 6. P. 1207–1219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03231.x>
12. Fortini P., Viscosi V., Maiuro L. et al. Comparative leaf surface morphology and molecular data of five oaks of subgenus *Quercus* Oerst. (Fagaceae) // Pl. Biosyst.

2009. V. 143. № 3. P. 543–554.
<https://doi.org/10.1080/11263500902722980>
13. Salvini D., Bruschi P., Fineschi S. et al. Natural hybridisation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. within an Italian stand as revealed by microsatellite fingerprinting // Plant Biology. 2009. V. 11. P. 758–765. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00158.x>
 14. Antonecchia G., Fortini P., Lepais O. et al. Genetic structure of a natural oak community in central Italy: Evidence of gene flow between three sympatric white oak species (*Quercus*, Fagaceae) // Ann. For. Res. 2015. V. 58. № 2. P. 205–216.
<https://doi.org/10.15287/afr.2015.415>
 15. Rellstab C., Buhler A., Graf R. et al. Using joint multivariate analyses of leaf morphology and molecular-genetic markers for taxon identification in three hybridizing European white oak species (*Quercus* spp.) // Annals Forest Sci. 2016. V. 73. № 3. P. 669–679.
<https://doi.org/10.1007/s13595-016-0552-7>
 16. Mačejovský V., Schmidtová J., Hrivnák M. et al. Interspecific differentiation and gene exchange among the Slovak *Quercus* sect. *Quercus* populations // Dendrobiology. 2020. V. 83. P. 20–29.
<https://doi.org/10.12657/denbio.083.002>
 17. Yücedağ C., Gailing O. Morphological and genetic variation within and among four *Quercus petraea* and *Q. robur* natural populations // Turkish J. Bot. 2013. V. 37. № 4. Article 2. P. 619–629.
<https://doi.org/10.3906/bot-1205-18>
 18. Fortini P., Marzio P.D., Conte A.L. et al. Morphological and molecular results from a geographical transect focusing on *Quercus pubescens*/Q. *virgiliana* ecological-altitudinal vicariance in peninsular Italy // Pl. Biosyst. 2022. T. 156. № 6. P. 1498–1511.
<https://doi.org/10.1080/11263504.2022.2131923>
 19. Neophytou C., Aravanopoulos F.A., Fink S., Dounavi A. Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers // For. Ecol. Manag. 2010. V. 259. P. 2026–2035.
<https://doi.org/10.1016/j.forec.2010.02.013>
 20. Guichoux E., Lagache L., Wagner S. et al. Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.) // Mol. Ecol. Resour. 2011. V. 11. P. 578–585.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02983.x>
 21. Curtu A.L., Gailing O., Leinemann L., Finkeldey R. Genetic variation and differentiation within a natural community of five oak species (*Quercus* spp.) // Plant. Biol. 2007. V. 9. P. 116–126.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-924542>
 22. Curtu A.L., Moldovan I.C., Enescu C.M. et al. Genetic differentiation between *Quercus frainetto* Ten. and *Q. pubescens* Willd. in Romania // Notulae Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca. 2011. V. 39. № 1. P. 275–282.
<https://doi.org/10.15835/nbha3915633>
 23. Curtu A.L., Craciunescu I., Enescu C.M. et al. Fine-scale spatial genetic structure in a multi-oak-species (*Quercus* spp.) forest // iForest. 2015. V. 8. № 3. P. 324–332.
<https://doi.org/10.3832/for1150-008>
 24. Lepais O., Petit R.J., Guichoux E. et al. Species relative abundance and direction of introgression in oaks // Mol. Ecol. 2009. V. 18. P. 2228–2242.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04137.x>
 25. Hölten A.M., Buschbom J., Kätzel R. Species integrity of *Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. pubescens* Willd. from the genetic point of view // Allgemeine Forst- und Jagdzeitung: Allg. F. u. J. Ztg. 2012. V. 183. P. 100–110.
 26. Gerber S., Chadoeuf J., Gugerli F. et al. High rates of gene flow by pollen and seed in oak populations across Europe // PLoS One. 2014. V. 9. e85130.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091301>
 27. Gugerli F., Brodbeck S., Holderegger R. Utility of multilocus genotypes for taxon assignment in stands of closely related European White Oaks from Switzerland // Annals Bot. 2008. V. 102. P. 855–863. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn164>
 28. Sandurska E., Ulaszewski B., Burczyk J. Genetic diversity and differentiation of coexisting populations of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. // Acta Biol. Crac. Ser. Bot. 2019. V. 61. № 1. P. 17–28.
<https://doi.org/10.24425/abcsb.2019.127739>
 29. Neophytou C., Gärtner S.M., Vargas-Gaete R. et al. Genetic variation of Central European oaks: shaped by evolutionary factors and human intervention? // Tree Genet. Genom. 2015. V. 11. № 79.
<https://doi.org/10.1007/s11295-015-0905-7>
 30. Enescu C.M., Curtu A.L., Șofletea N. Is *Quercus virgiliana* a distinct morphological and genetic entity among European white oaks? // Turkish J. Agriculture and Forestry. 2013. V. 37. № 5. Article 14.
<https://doi.org/10.3906/tar-1210-28>
 31. Di Pietro R., Di Marzio P., Antonecchia G. et al. Preliminary characterization of the *Quercus pubescens* complex in southern Italy using molecular markers // Acta Bot. Croat. 2020. V. 78. № 2. P. 107–115.
<https://doi.org/10.37427/botcro-2020-002>
 32. Di Pietro R., Conte A.L., Di Marzio P. et al. Does the genetic diversity among pubescent white oaks in southern Italy, Sicily and Sardinia islands support the current taxonomic classification? // Eur. J. Forest Res. 2021. V. 140. № 2. P. 1–17.
[doi:10.1007/s10342-020-01334-z](https://doi.org/10.1007/s10342-020-01334-z)
 33. Neophytou C. Bayesian clustering analyses for genetic assignment and study of hybridization in oaks: Effects of asymmetric phylogenies and asymmetric sampling schemes // Tree Genet. Genom. 2014. V. 10. P. 273–285.
<https://doi.org/10.1007/s11295-013-0680-2>

34. Семерикова С.А., Подергина С.М., Ташев А.Н., Семериков В.Л. Филогеография видов дуба в Крыму выявляет плейстоценовые рефугиумы и пути миграций // Экология. 2023. V. 54. № 3. С.188–203. <https://doi.org/10.31857/S0367059723030058>
35. Семерикова С.А., Алиев Х.У., Семериков В.Л., Семериков В.Л. Филогеография видов дуба на Кавказе по результатам анализа хлоропластной ДНК // Генетика. 2023. Т. 59. № 7. С. 772–788. <https://doi.org/10.31857/S001667582307010X>
36. Semerikova S.A., Tashev A.N., Semerikov V.L. Genetic diversity and history of pedunculate oak *Quercus robur* L. in the east of the range // Russ. J. Ecology. 2023. V. 54. №. 5. P. 423–438. <https://doi.org/10.1134/S1067413623050089>.
37. Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. № 6. P. 673–679. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
38. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. P. 945–959.
39. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study // Mol. Ecol. 2005. V. 14. № 8. P. 2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
40. Li Y.L., Liu J.X. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods // Mol. Ecol. Resour. 2018. V. 18. № 1. P. 176–177. doi:10.1111/1755-0998.12719.
41. Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M. et al. CLUMPAK: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // Mol. Ecol. Resour. 2015. V. 15. P. 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
42. Puechmaille S.J. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem // Mol. Ecol. Resour. 2016. V. 16. P. 608–627. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512>
43. 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>
44. Rousset F. GENEPOP' 007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux // Mol. Ecol. Resour. 2008. V. 8. P. 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
45. Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P., 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>.
46. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. V. 83. P. 583–590.
47. Rohlf E.J. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.50. // Exeter Publ. and Applied Biostatistics. 1988.
48. Vázquez F.M., García D., Márquez F., Vilaviçosa C.M. Annotations to infrageneric nomenclature of *Quercus* L. (FAGACEAE) // Fol. Bot. Extremadurensis. 2023. V. 17. P. 7–64.
49. Kučera P. *Quercus banatus* grows in Slovenia // Thaiszia – J. Botany. 2019. V. 29. № 1. P. 61–69. <https://doi.org/10.33542/TJB2019-1-04>
50. Di Pietro R., Viscosi V., Peruzzi L., Fortini P. A review of the application of the name *Quercus dalechampii* // Taxon. 2012. V. 61. № 6. P. 1311–1316. doi:10.1002/tax.616012
51. Kučera P. New name for Central European oak formerly labelled as *Quercus dalechampii* // Biologia. 2018. V. 73. № 4. P. 313–317. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0048-z>
52. Proietti E., Filesi L., Di Marzio P. et al. Morphology, geometric morphometrics, and taxonomy in relict deciduous oaks woods in northern Italy // Rend. Fis. Acc. Lincei. 2021. V. 32. P. 549–564. <https://doi.org/10.1007/s12210-021-01001-4>
53. Papini A., Simeone M.C., Bellarosa R. et al. *Quercus macranthera* Fisch. & Mey. ex Hohen. and *Quercus iberica* M. Bieb.: Taxonomic definition and systematic relationships with European oaks inferred from nuclear internal transcribed spacer (ITS) data // Plant Biosystems. 2011. V. 145. № 1. P. 37–49. <https://doi.org/10.1080/11263504.2010.502684>
54. Tóth E.G., Köbölkuti Z.A., Cseke K. et al. A genomic dataset of single-nucleotide polymorphisms generated by ddRAD tag sequencing in *Q. petraea* (Matt.) Liebl. populations from Central-Eastern Europe and Balkan Peninsula // Annals Forest Sci. 2021. V. 78. № 43. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01051-6>
55. Jurkšienė G., Baranov O.Y., Kagan D.I. et al. Genetic diversity and differentiation of pedunculate (*Quercus robur*) and sessile (*Q. petraea*) oaks. // J. For. Res. 2020. V. 31. P. 2445–2452. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01043-3>
56. Degen B., Blanc-Jolivet C., Mader M. et al. Introgression as an important driver of geographic genetic differentiation within European white oaks // Forests. 2023. V. 14(12). <https://doi.org/10.3390/f14122279>

Differentiation and Taxonomic Identification of Roburoid Oaks in the Caucasian and Crimean Regions Using Nuclear Microsatellite Markers

S. A. Semerikova^{1, *}, Kh. U. Aliev², V. L. Semerikov¹

¹*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Science, Ekaterinburg, 620144 Russia*

²*Mountain Botanical Garden of Dagestan Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Makhachkala, 367000 Russia*

*e-mail: s.a.semerikova@ipae.uran.ru

The inter- and intra-specific structure of genetic variability was studied using 18 microsatellite loci (nSSRs) in closely related roburoid oaks in the Crimean-Caucasian region. The seven most widespread *Quercus* taxa in the region were studied in 29 morphologically pure populations from different parts of the North Caucasus, Transcaucasia, Crimea and northeastern Europe. Most taxa were studied using nSSR markers for the first time. Among the 492 trees studied, Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE identified clusters corresponding to the pedunculate oak *Quercus robur*, the Hartwiss oak *Q. hartwissiana*, the Caucasian oak *Q. macranthera*, the downy oak *Q. pubescens* and three subspecies of sessile oak: *Q. petraea* ssp. *petraea*, *Q. petraea* ssp. *iberica*, *Q. petraea* ssp. *medwediewii*. Geographic structure was identified within *Q. robur*, *Q. pubescens* and *Q. p.* ssp. *petraea*. The 18 nSSR loci used are efficient in the taxonomic assignment of individuals, and identifying hybrids. The close relationship between the “long-pedunculate” roburoid oaks (*Q. robur* and *Q. hartwissiana*) is shown, with a greater difference from other species. For one of the subspecies of sessile oak, widespread in the North Caucasus and Crimea *Q. petraea* ssp. *medwediewii* (syn. *Q. calcarea*), or limestone oak, significant differences from other taxa were found, reaching the species level. The assumption of a possible hybrid origin of this taxon as a result of hybridization of *Q. petraea* and *Q. pubescens* is not confirmed by genetic analysis. The other two subspecies of *Q. petraea* (*Q. p.* ssp. *petraea* and Georgian oak *Q. p.* ssp. *iberica*) are differentiated to a lesser extent and are related to each other, which confirms the legitimacy of distinguishing two geographically isolated taxa at the rank of subspecies. The highest variability was observed in *Q. pubescens* ($H_e = 0.777$). In *Q. p.* ssp. *medwediewii* variability was lower than in other widespread taxa ($H_e = 0.652$), and was approximately at the level of variability of *Q. hartwissiana* ($H_e = 0.633$) and *Q. macranthera* ($H_e = 0.659$). Clear differentiation of taxa by nuclear markers shows the limited introgression in closely related oak species in the Caucasus and Crimea. The identified genetic clusters can be used as reference groups for further population genetic studies of oaks in the Crimean-Caucasian region.

Keywords: *Quercus* spp., nuclear microsatellites, Caucasus, Crimea, nSSR, STRUCTURE, genetic differentiation, taxon assignment.

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ КАЛЬПАСТАТИНА *CAST* И АНДРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА *AR* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ *Rangifer tarandus*

© 2024 г. Е. А. Конов^{1, 2, *}, К. А. Курбаков^{1, 2}, М. Т. Семина¹,
Ю. А. Столповский¹, К. А. Лайшев^{1, 3}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук,
Москва, 109316 Россия

³Северо-Западный центр междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения,
Санкт-Петербург, 196608 Россия

*e-mail: casqu@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 13.03.2024 г.

Принята к публикации 26.03.2024 г.

Маркерная селекция для повышения мясной продуктивности северного оленя находится в начальной стадии разработки, для которой требуется изучение изменчивости в генах-кандидатах мясной продуктивности. В качестве таких генов нами были выбраны гены кальпастатина и андрогенового рецептора для изучения их изменчивости у северного оленя. Полиморфизм и индели в гене андрогенового рецептора связывают с характеристиками роста и веса у разных видов одомашненных животных. Изменчивость в регионе гена кальпастатина *CAST* по результатам многих исследований была ассоциирована с качеством мяса и мясной продуктивностью скота. Анализ главных компонент по изменчивости *CAST* объединил диких и домашних оленей Якутии, а также диких и домашних оленей из Амурской обл., что подразумевает поток генов между локальными породами одомашненного оленя и дикими популяциями. При этом в случае обнаруженных в данном исследовании трех микросателлитных локусов в интроне андрогенового рецептора анализ главных компонент разделил диких и домашних оленей.

Ключевые слова: *Rangifer tarandus*, гены продуктивности, кальпастатин, андрогеновый рецептор.

DOI: 10.31857/S0016675824080046 **EDN:** BFRMEB

Маркерная селекция для повышения мясной продуктивности северного оленя находится в начальной стадии разработки, для которой требуется изучение изменчивости в генах-кандидатах мясной продуктивности. Кандидатами для изучения полиморфизма и составления SNP-чипов продуктивности являются полиморфные сайты в последовательностях генов к андрогеновым рецепторам (*AR*) и к рецепторам к гормонам роста (*GHR*), поскольку изменчивость в них влияет на рост, репродуктивные признаки и формировании скелетной мускулатуры, что было показано на свиньях [1] и овцах [2]. У оленей же также изучали ассоциацию изменчивости в андрогеновом рецепторе и скорости роста рогов на примере пятнистого оленя [3]. Другим из возможных генов-кандидатов является кальпастатин, наравне с кальпаином, изменчивость в которых связывали с качеством мяса и

мясной продуктивностью для овец [4], КРС [5, 6] и свиней [7]. Крайне мало исследований посвящено исследованию изменчивости отдельных генов северного оленя, за исключением филогенетических маркеров и гена прионного белка [8, 9].

Среди domesticiрованных оленей в России утверждены четыре породы (ненецкая, эвенская, чукотская и эвенкийская), еще несколько региональных популяций (тофаларские, тоджинские олени) имеют фенотипические отличия, достаточные для выделения их в отдельную породу. Из-за свободного выпаса и непланового скрещивания дикие особи могут вносить вклад в генетическое разнообразие географических типов домашних оленей, а генетический пул домашних пород — в приспособленность диких популяций. Таким образом, территории, где дикий олень обитает совместно с домашним оленем, представляют собой

отдельный интерес как для изучения экологии и локальной адаптации северного оленя, так и для селекционной работы с внутривидовыми типами домашнего подвида.

В настоящей работе мы исследовали изменчивость андрогенового рецептора и кальпастина домашних и диких северных оленей для поиска полиморфных сайтов и междупородных различий. Помимо тоджинского и ненецкого оленя мы взяли для анализа домашних и диких особей из Амурской обл. и Якутии, чтобы посмотреть, насколько дифференцированы дикие и домашние олени на небольшом расстоянии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего исследовано 95 (70 образцов для *AR*) оленей, из них 68 (50 для *AR*) — домашние особи ненецкой, эвенкийской, эвенской и чукотской пород, а также 27 (20 для *AR*) диких оленей из Амурской области и Якутии (табл. 1). Образцы дикой популяции были представлены мышечной тканью, домашних животных — ушным выщипом. ДНК выделялось с использованием набора QIAmp DNA mini

Kit (QIAGEN, Хильден, Германия). Амплификация гена *PRNP* происходила с помощью qPCRmix-HS (Евроген, Москва, Россия) и праймеров, подобранных с помощью Primer-BLAST [10] и OligoAnalyzer v.3 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Корректировка последовательностей на основании хроматограммы и поиск гетерозигот проводился с помощью программы EditR [11]. Выравнивание последовательностей генов *CAST* и *AR* производилось с помощью пакета Muscle [12], и последующий анализ последовательностей производился с помощью программы Mega X [13]. Анализ изменчивости микросателлитных участков гена *AR* производился с помощью программы GenAlex 6 [14]. Анализ главных компонент, его визуализация и корреляционный анализ производился с помощью пакета FactoMineR [15] языка программирования R.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе анализа последовательностей *CAST* было обнаружено четыре полиморфных сайта, их позиция относительно кальпастина *Bos Taurus*

Таблица 1. Объемы выборок и места сбора

Популяция, порода	<i>n</i>	Место сбора материала
Дикие	10	Якутия
Дикие	17	Амурская обл.
Эвенкийские (тоджинские)	22	Тува, Тоджинский р-н
Эвенская	7	Якутия
Эвенкийская	23	Амурская обл., Зейский р-н
Ненецкая	16	Ненецкий АО: колхоз “ЕРВ”, (племярепродуктор) НАО, западная часть Большеземельной тундры

Таблица 2. Частоты аллелей для полиморфных сайтов гена *CAST* у *R. tarandus* (позиция сайта отмечена относительно кальпастина *Bos taurus* NM_174003.2)

Популяция, порода	<i>n</i>	3788		3797		3862		4138	
		<i>A</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>G</i>
Тоджинские	22	0.93	0.07	1	0	0.05	0.95	0.5	0.5
Дикие (Амурская обл.)	17	0.94	0.06	0.94	0.06	0.18	0.82	0.68	0.32
Эвенкийская (Амур. обл.)	23	0.96	0.04	0.87	0.13	0.22	0.78	0.54	0.46
Эвенская (Якутия)	7	0.93	0.07	0.86	0.14	0	1	1	0
Дикие, Якутия	10	0.7	0.3	0.9	0.1	0.05	0.95	0.95	0.05
Ненецкая	16	0.72	0.28	0.78	0.22	0.25	0.75	0.63	0.38

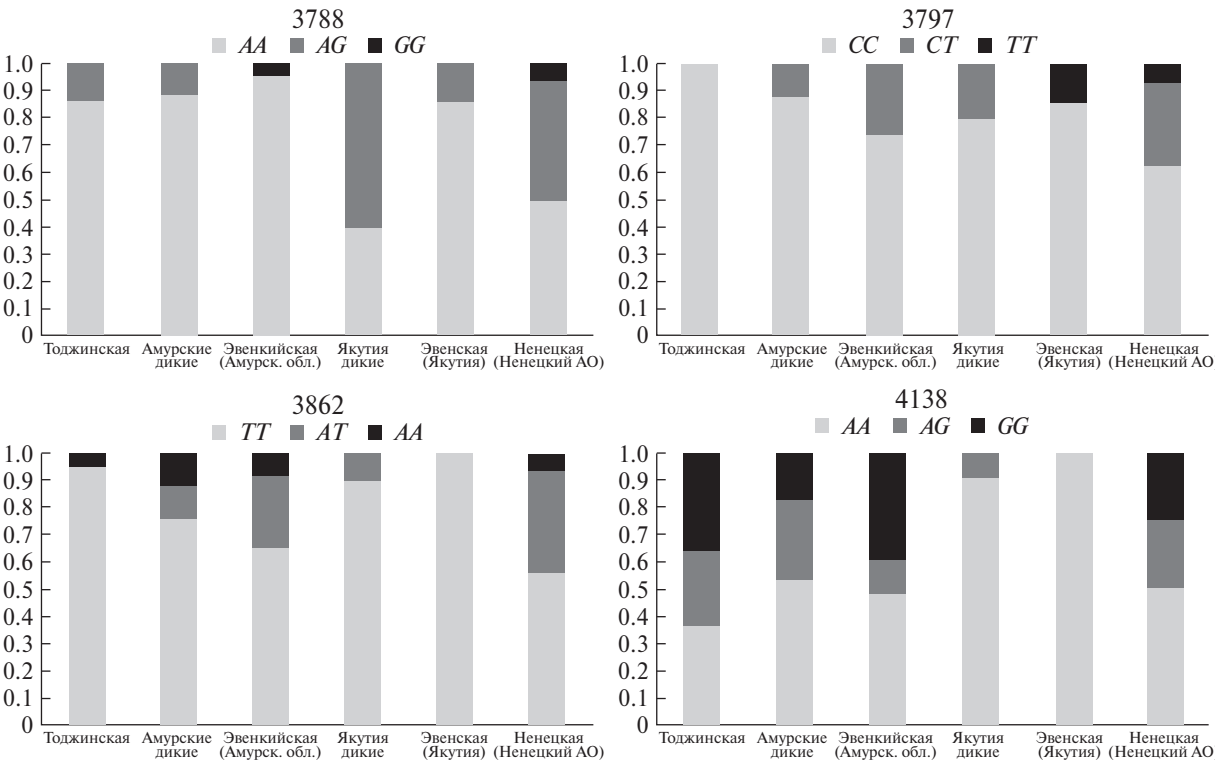


Рис. 1. Частоты генотипов для полиморфных сайтов гена *CAST* у особей *R. tarandus*, изученных в данной работе.

– NM_174003.2: 3788, 3797, 3862 и 4138. Данные позиции локализованы в регионе 32 экзона кальпастатина *Bos taurus*. Ни в одной выборке не было значимым отклонение от равновесия Харди–Вайнберга для каждого из полиморфных сайтов (табл. 2, рис. 1). Анализ главных компонент (рис. 2) показывает, что ненецкая порода оленей и тоджинский экотип отличаются от остальных выборок по полиморфизмам в сайтах 3788 и 3797 (коэф. корреляции $r(C) = -0,91$, $p = 0.012$), у ненецкой породы в данных позициях доли минорного аллеля превышают 0.2, в то время как у тоджинских оленей минорный вариант *T* в позиции 3797 отсутствует. По второй главной компоненте, объясняющей 41.3% дисперсии, обособливаются от остальных домашние эвенские и дикие олени из Якутии. Их

Таблица 3. Показатели аллельного и генетического разнообразия выборок *R. tarandus*, основанные на полиморфизме микросателлитов в интроне андрогенового рецептора

Популяции, порода	<i>n</i>	N_A	N_E	H_O	$H_{E(u)}$	<i>F</i>
Тоджинская	14	8.7 ± 1.76	6.4 ± 1.62	0.81 ± 0.104	0.85 ± 0.038	0.004 ± 0.166
Дикие, Амурская обл.	15	10.7 ± 1.429	8.3 ± 0.7	0.76 ± 0.044	0.91 ± 0.012	0.14 ± 0.04
Эвенкийская порода (Амурская обл.)	18	9 ± 0.58	6.3 ± 0.42	0.85 ± 0.067	0.86 ± 0.038	-0.015 ± 0.079
Эвенская порода (Якутия)	4	4.7 ± 0.33	3.8 ± 0.49	0.83 ± 0.083	0.83 ± 0.043	-0.14 ± 0.081
Дикие, Якутия	5	6 ± 0.58	5.1 ± 0.46	0.67 ± 0.067	0.89 ± 0.022	0.17 ± 0.074
Ненецкие	14	10 ± 1	10 ± 1	0.64 ± 0.071	0.89 ± 0.014	0.26 ± 0.075

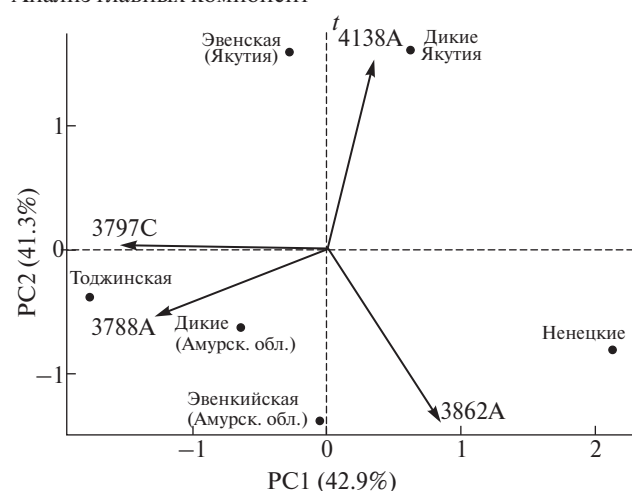
Примечание. N_A – среднее число аллелей на локус, N_E – число эффективных аллелей на локус, H_O – наблюдаемая гетерозиготность, $H_{E(u)}$ – несмещенная ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга.

Таблица 4. Показатели аллельного и генетического разнообразия для микросателлитных локусов интрона андрогенового рецептора *AR*

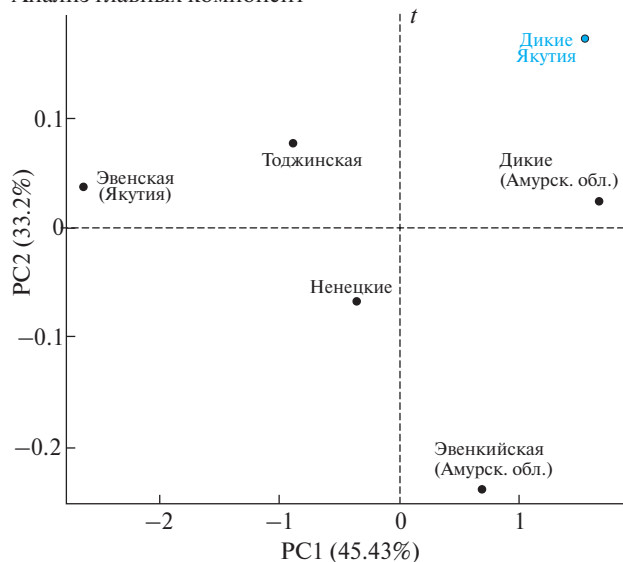
	N_A	N_E	H_O	$H_{E(u)}$	F_{IS}
AR10INTTG1	8.8 ± 1.14	6.6 ± 0.86	0.88 ± 0.049	0.89 ± 0.019	-0.059 ± 0.082
AR10INTAG2	7.7 ± 1.01	5.7 ± 0.73	0.72 ± 0.059	0.86 ± 0.013	-0.11 ± 0.072
AR10INTTG3	8 ± 1.13	6.4 ± 0.89	0.68 ± 0.023	0.87 ± 0.026	0.16 ± 0.064

Примечание. N_A – среднее число аллелей на локус, N_E – число эффективных аллелей на локус, H_O – наблюдаемая гетерозиготность, $H_{E(u)}$ – несмещенная ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга.

Анализ главных компонент

**Рис. 2.** Результаты анализа главных компонент на основании частот аллелей гена *CAST* для изученных выборок северного оленя.

Анализ главных компонент

**Рис. 3.** Результаты анализа главных компонент на основании частот аллелей микросателлитных локусов гена андрогенового рецептора *AR* для изученных выборок северного оленя.

объединяет отсутствие минорных гомозигот и низкая частота минорного аллеля в позициях 3862 ($r(A) = 0.83$, $p = 0.044$) и 4138 ($r(A) = -0.92$, $p = 0.008$).

В ходе анализа последовательности участка гена андрогенового рецептора не было обнаружено полиморфных сайтов, однако были найдены три последовательно расположенных микросателлитных локуса $(GA)_n(GT)_n(GA)_n$. По результатам анализа генетического и аллельного разнообразия у диких оленей Якутии и Амурской обл., а также у ненецкой породы обнаружился дефицит гетерозигот по данным микросателлитным локусам, при этом среднее число аллелей на локус в данных выборках было высоким (табл. 3 и 4).

Нами был проведен подсчет повторов для каждого из них и проведен анализ главных компонент, по результатам которого наблюдается обособление диких оленей от домашних (рис. 3). При этом для второго локуса наиболее длинные аллели $G(AG)_{23}$ и $G(AG)_{20}$ встречаются чаще у диких особей по сравнению с домашними, что согласуется с их дифференциацией согласно анализу главных компонент (рис. 3, табл. 5). При сравнении средних длин аллелей локуса *AR10INTAG2* с помощью двустороннего t-теста обнаруживаются значимые отличия между дикими и домашними оленями, при этом для двух других аллелей не наблюдается значимых различий.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаруженный нами полиморфизм в регионе последних факультативных экзонов гена *CAST* представляет интерес, поскольку многие исследования генов-кандидатов ограничиваются кодирующим регионом (например, [16]). В некоторых предыдущих исследованиях было показано, что ассоциированы с признаками мясной продуктивности могут быть SNP в интронах [17] и в 3' UTR-регионах мРНК [5]. В нашем случае полиморфизм располагается в некодирующих регуляторных экзонах. Полиморфизм в них вносит вклад в дивергенцию якутских диких и домашних северных оленей от остальных популяций. Это согласуется с данными, полученными на тех же образцах в результате анализа ядерных микросателлитных локусов [18].

Таблица 5. Аллели микросателлитных локусов андрогенового рецептора *AR*, коррелирующие с диверсификацией изученных выборок северного оленя, выявленной в ходе анализа главных компонент

	Коэф. корреляции <i>r</i>	<i>p</i> -значение	Какая главная компонента коррелирует, (%)
AR10INTAG2_35	0.90	0.013	PC1 (45.43)
AR10INTTG3_31	0.88	0.021	PC1 (45.43)
AR10INTTG3_23	−0.82	0.048	PC1 (45.43)
AR10INTTG1_28	−0.86	0.028	PC1 (45.43)
AR10INTAG2_41	−0.89	0.018	PC1 (45.43)
AR10INTAG2_27	−0.91	0.013	PC1 (45.43)
AR10INTTG3_17	−0.94	0.005	PC1 (45.43)
AR10INTTG1_44	−0.94	0.005	PC1 (45.43)
AR10INTAG2_47	−0.96	0.002	PC1 (45.43)
AR10INTTG3_43	−0.84	0.037	PC2 (33.2)
AR10INTTG1_26	−0.82	0.045	PC3 (13.16)
AR10INTAG2_39	0.87	0.026	PC3 (13.16)

Недавно в ходе анализа изменчивости гена *AR* у КРС были обнаружены индели в интронах, которые ассоциированы с признаками роста и продуктивности [19]. Повторяющиеся последовательности $(GA)_n$, $(GT)_n$, $(GA)_n$, полиморфизм в которых был нами обнаружен в данном исследовании, также могут иметь влияние на транскрипцию и экспрессию андрогенового рецептора, а также обуславливать различия между дикими и домашними особями северных оленей. Нами было обнаружено, что в среднем у диких оленей чаще встречаются более длинные аллели данных микросателлитных локусов, и длина повторов в некодирующих регионах часто коррелирует с экспрессией гена [20].

В ходе настоящего исследования нами была обнаружена дивергенция между оленями из Якутии и остальными выборками по гену *CAST*, а также между дикими и домашними оленями по микросателлитным локусам в интроне гена *AR*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 22-16-00062).

Исследование одобрено Этическим комитетом Института Общей Генетики им. Н.И. Вавилова РАН 09.11.2023, № 1.

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. *Trakooljul N.* Molecular and association analyses of the androgen receptor gene as a candidate for production and reproduction traits in pigs. Göttingen: Cuvillier Verlag, 2004. 127 p.
2. *Трухачев В.И., Криворучко А.Ю., Скрипкин В.С. и др.* Новые однонуклеотидные замены (SNP) в гене андрогенового рецептора (*AR*) у российской породы овец Джалгинский меринос // Генетика. 2016. Т. 52. № 10. С. 1169–1175. <https://doi.org/10.7868/S0016675816100131>
3. *Xiong J., Yang F., Hua G. et al.* Identification of genetic variants within androgen receptor gene of Sika deer and its association with antler production // J. of Animal and Veterinary Advances. 2012. V. 11. № 12. P. 2059–2063.
4. *Ramadevi B., Kumari B. P., Sudhakar K. et al.* Polymorphism of the Ovine Calpastatin (*CAST*) gene and its association with productive traits in Nellore sheep // J. of Animal Res. 2020. V. 10. № 6. P. 881–887. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/613/1/012130>
5. *Corva P., Soria L., Schor A. et al.* Association of *CAPN1* and *CAST* gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina // Genet. Mol. Biol. 2007. V. 30. P. 1064–1069. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000600006>
6. *Li X., Ekerljung M., Lundström K., Lundén A.* Association of polymorphisms at *DGAT1*, *leptin*, *SCD1*, *CAPN1* and *CAST* genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden // Meat Science. 2013. V. 94. № 2. P. 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.01.010>
7. *Ropka-Molik K., Bereta A., Tyra M. et al.* Association of calpastatin gene polymorphisms and meat quality traits in pig // Meat Science. 2014. V. 97. № 2. P. 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.01.021>
8. *Kholodova M.V., Baranova A.I., Mizin I.A. et al.* A genetic predisposition to chronic wasting disease

- in the reindeer *Rangifer tarandus* in the Northern European part of Russia // *Biology Bulletin*. 2019. V. 46. P. 555–561.
<https://doi.org/10.1134/S1062359019060074>
9. Курбаков К.А., Коноров Е.А., Семина М.Т., Столповский Ю.А. Распространение ассоциированных с болезнью хронического изнурения аллелей гена *PRNP* у диких и домашних северных оленей *Rangifer tarandus* на территории России // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 2. С. 163–168.
<https://doi.org/10.31857/S0016675822020102>
 10. 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. № 1. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
 11. Kluesner M.G., Nedveck D.A., Lahr W.S. et al. EditR: A method to quantify base editing from Sanger sequencing // *The CRISPR J*. 2018. V. 1. № 3. P. 239–250. <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0014>
 12. Edgar R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucl. Ac. Res*. 2004. V. 32. № 5. P. 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
 13. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol*. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 14. Peakall R.O.D., Smouse P.E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. V. 6. № 1. P. 288–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
 15. 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>
 16. Suleman M., Khan S.U., Riaz M.N. et al. Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds // *African J. Biotechnology*. 2012. V. 11. № 47. P. 10655–10660.
<https://doi.org/10.5897/AJB11.2478>
 17. Calvo J.H., Iguácel L.P., Kirinus J.K. et al. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness // *Meat Science*. 2014. V. 96. № 2. P. 775–782.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.003>
 18. Svishcheva G., Babayan O., Sipko T. et al. Genetic differentiation between coexisting wild and domestic Reindeer (*Rangifer tarandus* L. 1758) in Northern Eurasia // *Genetic Res*. 2022. V. 3. № 6. P. 1–14.
<https://doi.org/10.46265/genresj.UYML5006>
 19. Zhao H., Wu M., Wang S. et al. Identification of a novel 24 bp insertion–deletion (indel) of the androgen receptor gene and its association with growth traits in four indigenous cattle breeds // *Archives Animal Breeding*. 2018. V. 61. № 1. P. 71–78.
<https://doi.org/10.5194/aab-61-71-2018>
 20. Li Y.C., Korol A.B., Fahima T. et al. Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review // *Mol. Ecology*. 2002. V. 11. № 12. P. 2453–2465.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x>

Calpastatin *CAST* and Androgen Receptor *AR* Gene Polymorphism Studies Meat Quality Predictors in Reindeer *Rangifer tarandus*

E. A. Konorov^{1, 2, *}, K. A. Kurbakov^{1, 2}, M. T. Semina¹, Yu. A. Stolpovsky¹, K. A. Layshev^{1, 3}

¹Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109316 Russia

³Center for Interdisciplinary Research of Food Security Problems, St. Petersburg, Pushkin, 196608 Russia

*e-mail: casqy@yandex.ru

Marker-based selection on reindeer meat productivity is in the early stages of development, which requires the study of variability in candidate genes for meat productivity. We chose the calpastatin and androgen receptor genes as such genes to study. Polymorphisms and indels in the androgen receptor gene have been associated with height and weight characteristics in different domesticated animal species. Variation in the region of the calpastatin *CAST* gene, according to the results of many studies, has been associated with meat quality and meat productivity of livestock. Principal component analysis of *CAST* variability has grouped together wild and domestic deer from Yakutia, as well as wild and domestic deer from the Amur region, which implies gene flow between local breeds of domesticated deer and wild populations. Moreover, in the case of three microsatellite loci found in this study in the intron of the androgen receptor, principal component analysis separated wild and domestic deer.

Keywords: *Rangifer tarandus*, meat quality markers, calpastatin, androgen receptor.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ 29 ПОРОД ЛОШАДЕЙ РОССИЙСКОЙ СЕЛЕКЦИИ ПО STR-МАРКЕРАМ

© 2024 г. Н. В. Блохина^{1, *}, Л. А. Храброва¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства,
Рязанская область, пос. Дивово, 391105 Россия
*e-mail: nbloh16@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.01.2024 г.
После доработки 31.01.2024 г.
Принята к публикации 12.02.2024 г.

Современный этап генетической сертификации лошадей заводских и местных пород на основе микросателлитного анализа позволяет достаточно эффективно проводить идентификацию и генетическую экспертизу происхождения племенных животных, а также решать проблему оценки, паспортизации и сохранения генетических ресурсов. При сокращении численности племенного поголовья до 200–300 кобыл, наблюдаемом в ряде пород, возрастает угроза снижения генетического разнообразия популяций и накопления генетического груза, что обуславливает необходимость изучения и мониторинга генетической структуры конских пород. В связи с этим проведенный нами сравнительный генетический анализ полиморфизма 17 микросателлитных локусов у 20541 лошадей 29 заводских и местных пород позволяет провести паспортизацию базовой части генетических ресурсов коневодства Российской Федерации, включая верховые, рысистые, тяжелоупряжные и местные породы. При генетико-популяционном анализе исследуемых пород оценивали базовые параметры: общее количество вариантов аллелей (N_a), эффективное количество аллелей (A_e), среднее количество аллелей на локус (MNA), уровень наблюдаемой (H_o) и ожидаемой (H_e) гетерозиготности, а также коэффициент внутрипопуляционного инбридинга F_{is} . Филогенетические связи пород оценивали с помощью пакета программ R и R Studio. Среди пород лошадей разной специализации наибольшие значения всех показателей генетического разнообразия (A_e , H_o , H_e и N_a) были определены у аборигенных популяций. В аллелофонде местных пород лошадей встречались редкие аллели *ASB2T*, *HMS7S*, *HMS6J*, *HMS6H*, *HMS2T*, *HMS1O*, *HTG7L*, *HTG6L*, *HTG6H*, *VHL20S*, *ASB17Z*, *ASB17X*, *ASB17U*, *LEX3S*, *LEX3R* и *C4425E*, которые отсутствовали у лошадей заводских пород. Среди верховых пород лошадей, созданных в России, наличием редких аллелей выделялись буденновская, донская и кабардинская породы лошадей. У рысистых лошадей были обнаружены аллели *ASB2G*, *ASB2F*, *HMS2F*, *HTG7Q* и *ASB23O*, не выявленные в генетической структуре других пород. Проведенный филогенетический анализ показал разделение конских пород на два четких субкластера, в первый из которых вошли только заводские породы. Второй кластер объединил все аборигенные породы, а также орловского рысака и группу тяжелоупряжных пород, которые использовались на протяжении многих лет в качестве улучшателей местного поголовья лошадей. Проведенный анализ генетической структуры отечественных пород лошадей выявил достаточно высокий резерв разнообразия даже в малочисленных популяциях, который является непременным условием успешной селекции в коневодстве.

Ключевые слова: *Equus caballus*, генетическое разнообразие, микросателлиты ДНК, порода, лошадь.

DOI: 10.31857/S0016675824080057 **EDN:** BFPWDI

В прошлые века развитие коневодства во многом определяло объемы производства сельскохозяйственной продукции и имело особое значение для животноводства России. Лошадь была не только символом мощи и престижа страны, но и спасала народы в трудные времена истории. Однако с развитием механизации в сельском хозяйстве, армии и индустрии подход к использованию

лошадей изменился. К середине XX в. численность лошадей резко сократилась, но затем стабилизировалась и даже начала расти во многих странах. Сейчас лошади играют важную роль в туризме, спорте, ипподромном бизнесе, а также в производстве продуктов питания (молоко, мясо, кумыс и др.). Лошади заводских пород отличаются самой высокой стоимостью на современном мировом

рынке племенных ресурсов сельскохозяйственных животных. Поэтому ключевым условием эффективной селекции племенных животных является неоспоримая достоверность происхождения каждого животного, которое вовлечено в процесс воспроизводства. Объективная и точная идентификация лошадей и паспортизация поголовья являются весьма актуальной задачей. Для решения этой задачи применяются молекулярно-генетические методы, которые в свою очередь позволяют углубленно исследовать идентичность и полиморфизм генетических структур популяций в целях их сохранения и эффективного управления селекционным процессом во всех направлениях совершенствования пород лошадей [1–6].

В настоящее время ДНК-технологии широко используются в разноплановых генетических и геномных исследованиях, при контроле происхождения животных, для изучения филогенетических связей и микроэволюции пород, а также совершенствования генотипической оценки животных на индивидуальном и популяционном уровнях [5–13]. В качестве генетических маркеров микросателлиты интересны тем, что они подвержены более высокому уровню мутирования, чем остальная часть генома [1, 4, 14–16].

В реестр селекционных достижений Российской Федерации включены 44 породы лошадей, которые уникальны по своей универсальности в использовании и высоким адаптивным качествам и являются ценным генетическим ресурсом для мирового коневодства. Уже первые исследования по изучению генетической структуры заводских и местных пород лошадей отечественной селекции с использованием микросателлитных маркеров [6, 9, 17] показали высокий уровень аллельной вариабельности в обследованных популяциях. Последующие исследования подтвердили наличие генетической специфики многих пород лошадей, особенно имеющих ограниченный ареал разведения [1–3, 18–20].

Цель наших исследований — сравнительная оценка генетического разнообразия микросателлитных локусов в геномах лошадей 29 пород и популяций, разводимых в Российской Федерации, а также изучение их филогенетических связей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для проведения исследований служили биопробы волос, крови и спермы 20541 лошади 29 заводских и местных пород, разводимых на территории Российской Федерации. В исследования были включены лошади следующих верховых пород: ахалтекинские ($n = 1040$), буденновские ($n = 93$), арабские ($n = 2971$), донские ($n = 21$), ганновские ($n = 33$), тракененские ($n = 93$), кабардинские ($n = 289$), чистокровные верховые ($n = 9600$); четырех рысистых пород: орловские

рысистые ($n = 4177$), французские рысистые ($n = 381$), русские рысистые ($n = 975$), американские стандартbredные ($n = 434$) и четырех тяжелоупряжных пород: русские тяжеловозные ($n = 71$), владимирские ($n = 233$), советские тяжелоупряжные ($n = 51$), першероны ($n = 57$), а также шетлендские пони ($n = 46$). Местные породы и популяции представляли хакасские ($n = 25$) и якутские ($n = 24$), бурятские ($n = 20$), башкирские ($n = 100$), забайкальские ($n = 24$), вятские ($n = 219$), мезенские ($n = 97$), приобские ($n = 25$), печорские ($n = 17$), новоалтайские ($n = 150$), мугалжарские ($n = 94$), тувинские ($n = 569$), алтайские лошади ($n = 39$).

Тестирование всего поголовья лошадей по 17 микросателлитным локусам ДНК: *VHL20*, *AHT4*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS1*, *AHT5*, *HTG7*, *HTG6*, *HTG4*, *HTG10*, *HMS7*, *HMS6*, *ASB23*, *ASB2*, *ASB17*, *LEX3* и *CA425* осуществляли в лаборатории генетики ФГБНУ “ВНИИ коневодства”, используя протоколы и оборудование, рекомендуемые Международным обществом по изучению генетики животных (ISAG). Период выполнения исследований 2009–2021 гг.

Выделение ДНК из разных видов биоматериала (волосы, кровь, сперма и др.) осуществляли с использованием реагентов ExtraGene DNA Prep 200 (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия). Амплификацию полученной ДНК проводили с помощью 17 плексных наборов праймеров для генотипирования лошадей StockMarks® for Horses производства США и COrDIS S550 (ООО “ГОРДИЗ”, Россия) на ДНК-амплификаторе Thermocycler 2730 (Германия). Разделение и детекцию продуктов амплификации проводили методом капиллярного электрофореза на автоматическом 4-х капиллярном генетическом анализаторе AB 3130 (США). Размеры амплифицированных фрагментов ДНК определяли с помощью программы GeneMapper™ V4.0. Для обозначения аллелей использовали международную номенклатуру, принятую ISAG при проведении сравнительных испытаний по тестированию ДНК лошадей (НСТ), в которых наша лаборатория регулярно принимала участие с получением сертификатов I степени.

При оценке генетико-популяционных параметров учитывали частоты встречаемости генотипов, аллелей, уровень полиморфности (A_c), а также степень ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности, которые были рассчитаны по алгоритму программ PLINK 1.9 [21], MS Excel 2010. Оценка генетического сходства и генетических дистанций осуществлялась с помощью программы Statistics 12 (<https://statsoft-statistica.ru/>). Для расчета генетических расстояний и построения филогенетического дерева использовали пакет R программы и R Studio 1.3.1093 [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведенных исследований вариабельности 17 локусов микросателлитов ДНК у лошадей восьми верховых пород было обнаружено 169 аллелей, с колебаниями от 4 до 13. Наиболее богатый спектр аллелей был зафиксирован у лошадей кабардинской и ахалтекинской пород, каждая из которых имела соответственно 147 и 126 аллелей, в то время как у лошадей донской породы было протестировано всего 96 аллелей. Протестированные лошади арабской породы имели 104 аллеля в 17 STR-локусах, среди которых *CA425F* и *CA425P* были уникальными для этой породы и не встречались у представителей других верховых пород, а *ASB2C* был обнаружен только у арабских и кабардинских лошадей.

У лошадей древнейшей ахалтекинской породы было выявлено 126 аллелей, наиболее типичными из которых являются *HMS1M* – 0,581, *АНТ4Н* – 0,544, *ASB23J* – 0,427, *HMS7J* – 0,461, *HMS6O* – 0,489, *HTG7O* – 0,665, *HTG6G* – 0,526, *HTG10O* – 0,503 и *CA425N* – 0,499. В генотипах лошадей кабардинской и ахалтекинской пород были обнаружены уникальные аллели *ASB2J* и *HTG4Q* в отличие от других верховых пород. Аллель *HTG10Q* был обнаружен у лошадей буденновской, ахалтекинской и кабардинской пород, а аллель *ASB23R* – только у донских, ахалтекинских и кабардинских лошадей.

В генотипах лошадей чистокровной верховой породы наиболее часто встречались аллели *АНТ4O*, *АНТ5K*, *HMS1J*, *HMS2L*, *HMS3I*, *HMS6P*, *HTG4K*, *HTG4M*, *HTG6J*, *HTG7O* и *CA425N*, при этом среднее количество аллелей на локус составило 5.88 с колебаниями от 4 до 9.

На рис. 1 представлена вариабельность частот аллелей в локусе *АНТ4*, демонстрирующая существенные различия между породами лошадей.

При анализе полиморфности локуса *АНТ4* у лошадей верховых пород было обнаружено, что широко распространенный аллель *АНТ4Н* типичен для всех пород, аллель *АНТ4J* характерен для арабской и ахалтекинской, а аллель *АНТ4O* для чистокровной верховой и других полукровных пород.

Сравнительно невысоким уровнем генетического разнообразия характеризовались лошади ганноверской и тракененской пород с суммарным количеством 100 и 105 аллелей соответственно. Генетическое сходство тракененской породы с лошадьми чистокровной верховой достигало 0.922, что конечно закономерно, так как в разведении тракененской лошади всегда использовали жеребцов-производителей чистокровной верховой породы.

Одним из наиболее информативных панельных STR-локусов является *LEX3*, расположенный на X-хромосоме, так как он характеризует

разнообразие и связи популяций по материнской линии. Изучение этого локуса у верховых пород показало наличие 11 аллелей из 14 зарегистрированных ISAG. При этом максимальная частота аллеля *LEX3M* была установлена в арабской породе – 0.366, *LEX3P* – в чистокровной верховой – 0.330, а *LEX3K* – 0.108 – у лошадей кабардинской породы. У кабардинских лошадей были обнаружены редкие аллели *LEX3Q* и *LEX3G*, что наводит на мысль о наличии оригинальных женских линий в этой популяции (рис. 2).

У лошадей отечественных пород был определен весь спектр стандартных аллелей, зарегистрированных Международным обществом генетики животных (ISAG). Дополнительно в локусах *ASB2*, *ASB17*, *CA425*, *HMS2*, *HMS6*, *HMS7*, *HMS10*, *HTG6*, *HTG7*, *LEX3* и *VHL20*, были выявлены 16 новых аллелей, не встречающихся у лошадей Западной Европы (табл. 1).

Дополнительные аллели обнаружены у лошадей: *ASB2T* – новоалтайская; *ASB17U* – башкирская, тувинская; *ASB17X* – мезенская, тувинская; *ASB17Z* – тувинская; *HMS10* – алтайская; *HMS2T* – алтайская; *HMS6* – тувинская; *HMS6J* – американская рысистая, мезенская; *HMS7S* – приобская; *HTG6H* – бурятская; *HTG6L* – бурятская, вятская, тувинская; *HTG7L* – мугалжарская; *LEX3R* – французская рысистая, мезенская; *LEX3S* – мезенская; *VHL20S* – новоалтайская, мугалжарская, тувинская.

Анализ генетико-популяционных параметров верховых пород лошадей свидетельствует, что лидерство по уровню генетического разнообразия принадлежит кабардинской породе, в то время как у арабских лошадей был зафиксирован низкий уровень полиморфности – 3.18. Самое большое значение степени фактической гетерозиготности H_o – 0.727 наблюдалось у тракененской породы, тогда как ее минимальное значение – 0.631 было установлено у лошадей арабской породы (табл. 2).

Полученные данные генетического сходства между верховыми породами лошадей свидетельствуют о наличии близкого сходства (0.961) между буденновской и чистокровной верховой породами, в то время как родственная связь между буденновской и ахалтекинской породами была минимальной (0.732). Анализ генетических дистанций также подтвердил эти результаты, показав наибольшее различие между ахалтекинской и чистокровной верховой породами (0.495), а наименьшее между буденновской и чистокровной верховой (0.194) (рис. 3, а). Полученные данные позволяют лучше понять генетическую природу различных пород лошадей и способствуют их более эффективному разведению.

При проведении компаративного анализа полиморфизма 17 STR-локусов четырех рысистых пород

было обнаружено 157 аллелей, при этом лидерство по числу аллелей принадлежало русской рысистой породе с широким спектром аллелей.

Орловские рысаки продемонстрировали наличие 128 аллелей с вариантами от четырех аллелей в локусе *HMS3* до 12 — в локусе *ASB17*. Генетическая структура этой рысистой породы характеризовалась высокой частотой встречаемости аллелей *HMS6P* — 0.476, *HMS3O* — 0.553, *HMS1M* — 0.577, *HTG7O* — 0.553, *HTG6O* — 0.700 и *HTG4M* — 0.572. Вместе с тем редкие аллельные варианты *HTG7I*, *AHT5P* и *CA425G* отмечены только у лошадей орловской рысистой породы.

У рысаков стандартbredной породы были обнаружены редкие аллели *ASB2J*, *ASB2F*, *HMS6J*, *HMS2F*, *HTG7Q*, *HTG7P* и *ASB23O*, которые не встречались у лошадей других рысистых пород.

У французского рысака высокую частоту встречаемости имели аллели *AHT4O* — 0.571, *HMS3P* — 0.514, *HMS1J* — 0.507, *HTG10I* — 0.536, *HTG7O* — 0.627, *HTG6J* — 0.629 и *LEX3M* — 0.358. И только у лошадей этой рысистой породы были обнаружены аллели *ASB17U*, *ASB17V*, *ASB2G*, *HMS2N*, *HTG6L* и *LEX3R*.

Среди рысистых пород лошадей французский рысак выделялся максимальными значениями уровня полиморфности A_e (3.81) и степени гетерозиготности H_e (0.72), тогда как стандартbredные лошади имели самый низкий уровень генетического разнообразия (A_e (3.457), H_o (0.663), H_e (0.679) при положительном значении F_{is} (0.016).

Самые высокие генетические отличия и наименьший коэффициент генетического сходства (0.577) были отмечены между орловскими и стандартbredными рысаками. Русский рысак, постоянно улучшаемый стандартbredным, имел очень высокий коэффициент генетического сходства (0.978) с этой американской породой.

На основании характеристики лошадей четырех рысистых пород по STR-локусам нами была построена дендрограмма их филогенетических связей (рис. 3, б), на которой продемонстрировано, что орловская рысистая порода является наиболее генетически обособленной и образует отдельную ветвь. Лошади призовых пород (русская рысистая, французская и стандартbredная) образуют общий кластер, который подтверждает их тесную генетическую связь.

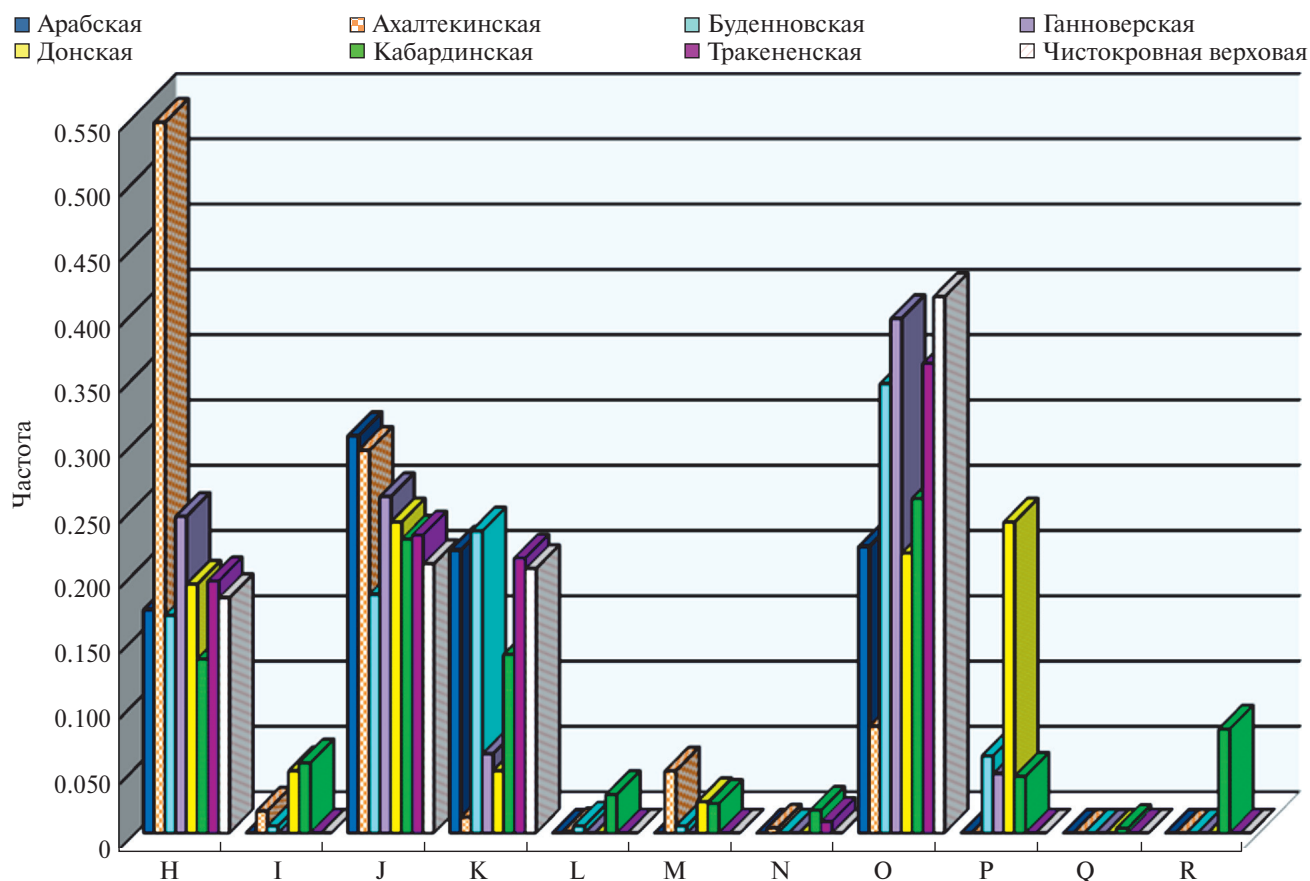


Рис. 1. Гистограмма частот встречаемости аллелей в локусе *AHT4* у лошадей верховых пород.

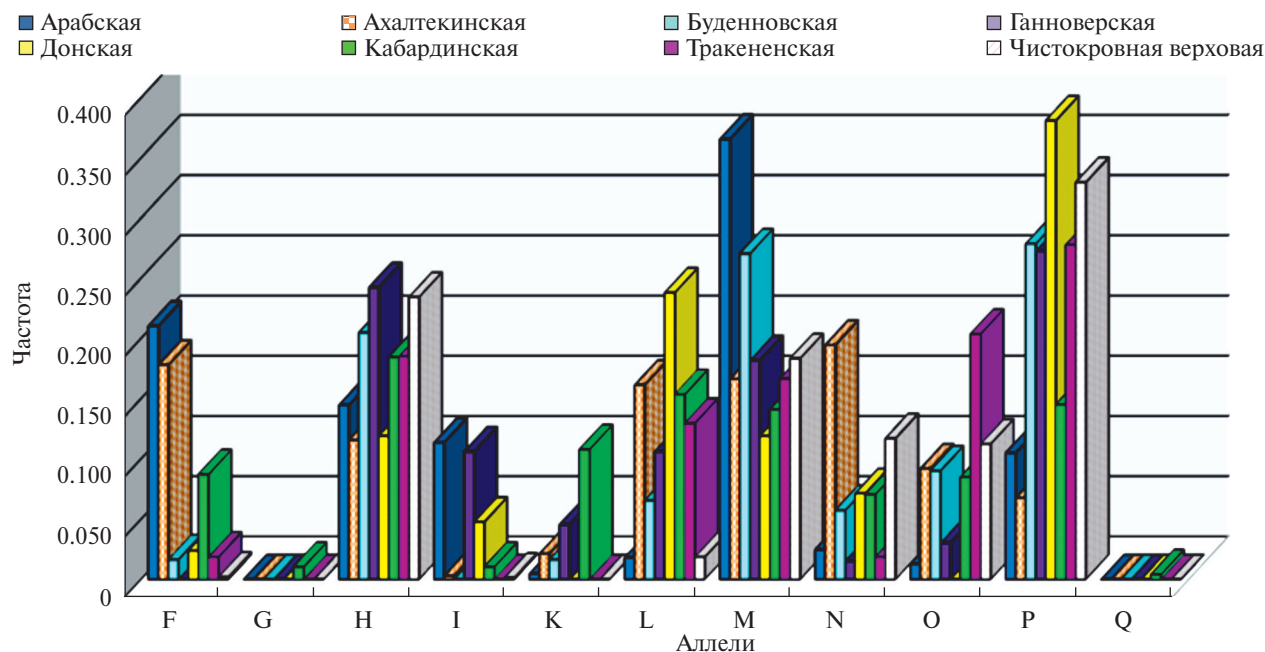


Рис. 2. Гистограмма частот встречаемости аллелей в локусе *LEX3* у лошадей верховых пород.

При тестировании лошадей четырех тяжелоупряжных пород по локусам микросателлитной ДНК был выявлен достаточно широкий спектр аллелей (143). Наибольшая вариабельность аллелей была подтверждена у лошадей русской и советской тяжеловозной пород (табл. 2). Число аллелей в изученных STR-локусах варьировало от 4 до 12, при среднем значении 6.41–7.12 на локус. Максимальное число аллелей было выявлено в локусе *ASB17* (9–12), наименьшая вариабельность была отмечена в локусах *HTG6* (4–6), *HTG7* (4) и *HMS1* (4–6).

У лошадей владимирской породы было выявлено 112 аллелей, два из которых — *HMS1Q* и *HTG4Q* — не встречались у других тяжелоупряжных пород. Генетическая структура владимирской породы лошадей характеризовалась сравнительно высокой частотой встречаемости аллелей *HMS1M* (0.699), *HTG10R* (0.488), *HTG7O* (0.529), *HTG6O* (0.433), *ANT4L* (0.507) и *LEX3L* (0.588).

У лошадей русской тяжеловозной породы были определены аллели *ANT4M*, *HMS7G*, *HMS2O*, *HMS6Q*, *HMS7P* и *HMS2P*, отсутствующие в аллелофонде других пород этой группы. Особенностью для этих некрупных лошадей была максимальная частота встречаемости аллелей, таких как *HMS3P*, *HMS1M*, *HTG10M*, *HTG7O*, *HTG6O*, *HTG4M* и *CA425N*.

В генофонде лошадей советской тяжеловозной породы было обнаружено два особых редких аллеля — *HMS1I* и *HMS6N*. Анализ генетической структуры этой породы выявил высокую концентрацию таких аллелей, как *HMS2H* — 0.406, *HMS1M*

— 0.422, *HTG10M* — 0.422, *HTG6O* — 0.833, *HTG4M* — 0.559, *ASB17M* — 0.400 и *CA425N* — 0.500.

В генотипах лошадей першеронской породы, в основном представленных привезенными из Франции животными, было обнаружено 109 аллелей, среди которых *VHL20K*, *ASB23H* и *ASB23Q* отсутствовали у лошадей отечественных пород.

Интересно отметить, что лошади владимирской и советской тяжеловозной пород обладали наибольшим количеством аллелей в локусе *LEX3*. В целом четыре тяжелоупряжные породы значительно различались по аллельной структуре данного локуса. Лошади владимирской породы характеризовались высокой частотой встречаемости аллелей *LEX3H* — 0.203 и *LEX3L* — 0.588, тогда как для советских и русских тяжеловозов было типично доминирование предков с *LEX3P* в X-хромосоме (0.284 и 0.310 соответственно).

По показателям генетического разнообразия (A_e 3.982 и H_o 0.723) среди тяжеловозных лошадей лидировала советская тяжеловозная порода (табл. 2). Даже в условиях сокращения численности заводских маток в этой породе до 200 голов популяция сохраняет достаточно высокий генетический ресурс и гетерозиготность, что подтверждает отрицательное значение коэффициента F_{is} — (–0.002). Лошади русской тяжелоупряжной породы характеризовались невысокой степенью H_o (0.676) в сочетании с внутривидовым инбридингом (F_{is} — 0.036).

Самый высокий коэффициент генетического сходства (0.941) был установлен между русскими и

Таблица 1. Номенклатура аллелей для STR-локусов ISAG [22]

Реф. номер	<i>AHT4</i>	<i>AHT5</i>	<i>ASB2</i>	<i>ASB17</i>	<i>ASB23</i>	<i>CA425</i>	<i>HMS1</i>	<i>HMS2</i>	<i>HMS3</i>	<i>HMS6</i>	<i>HMS7</i>	<i>HTG4</i>	<i>HTG6</i>	<i>HTG7</i>	<i>HTG10</i>	<i>LEX3</i>	<i>VHL20</i>
9			B														
10			C							H*							
11				D		E*											
12					D	F				J*			G				
13			F	F		G				K	G		H*			F	I
14		H	G	G		H	I			L			I			G	J
15		I		H	G	I	J	H		M			J	K		H	K
16		J	I	I	H	J	K	I		N	J		K	L*	H	I	L
17		K	J	J	I	K	L	J		O	K		L*	M	I	J	M
18		L	K	K	J	L	M	K		P	L		M	N	J	K	N
19		M	L	L	K	M	N	L		Q	M		N	O	K	L	O
20		N	M	M	L	N	O*	M	H		N		O	P	L	M	P
21		O	N	N		O			I		O		P		M	N	Q
22			O	O		P	Q	O			P		Q		N	O	R
23		Q	P	P				P			Q				O	P	S*
24			Q	Q	P			Q	L						P	Q	
25	H		R	R	Q			R	M		S*				Q	R*	
26	I		S	S	R			S	N						R	S*	
27	J		T*	T	S			T*	O						S		
28	K			U*	T			U	P						T		
29	L			V	U				Q								
30	M			W	V				R			K					
31	N			X**					S			L					
32	O			Y								M					
33	P			Z*								N					
34	Q											O					
35	R											P					
36												Q					

Примечание. * – новые аллели, выявленные у лошадей отечественных пород.

советскими тяжеловозами. В то же время родство между владимирской и советской тяжеловозной породами оказалось минимальным (0.680). Дерево филогенетического родства (рис. 3, в) наглядно продемонстрировало сходство между изученными тяжеловозными породами, разделяющимися на

две ветви континентальных (першеронов и бельгийских тяжеловозов) и английских пород (клайдсдалей и шайров).

Результаты анализа лошадей 14 аборигенных пород выявили широчайший спектр аллелей 17 панельных ($n = 195$), включая ряд частных аллелей

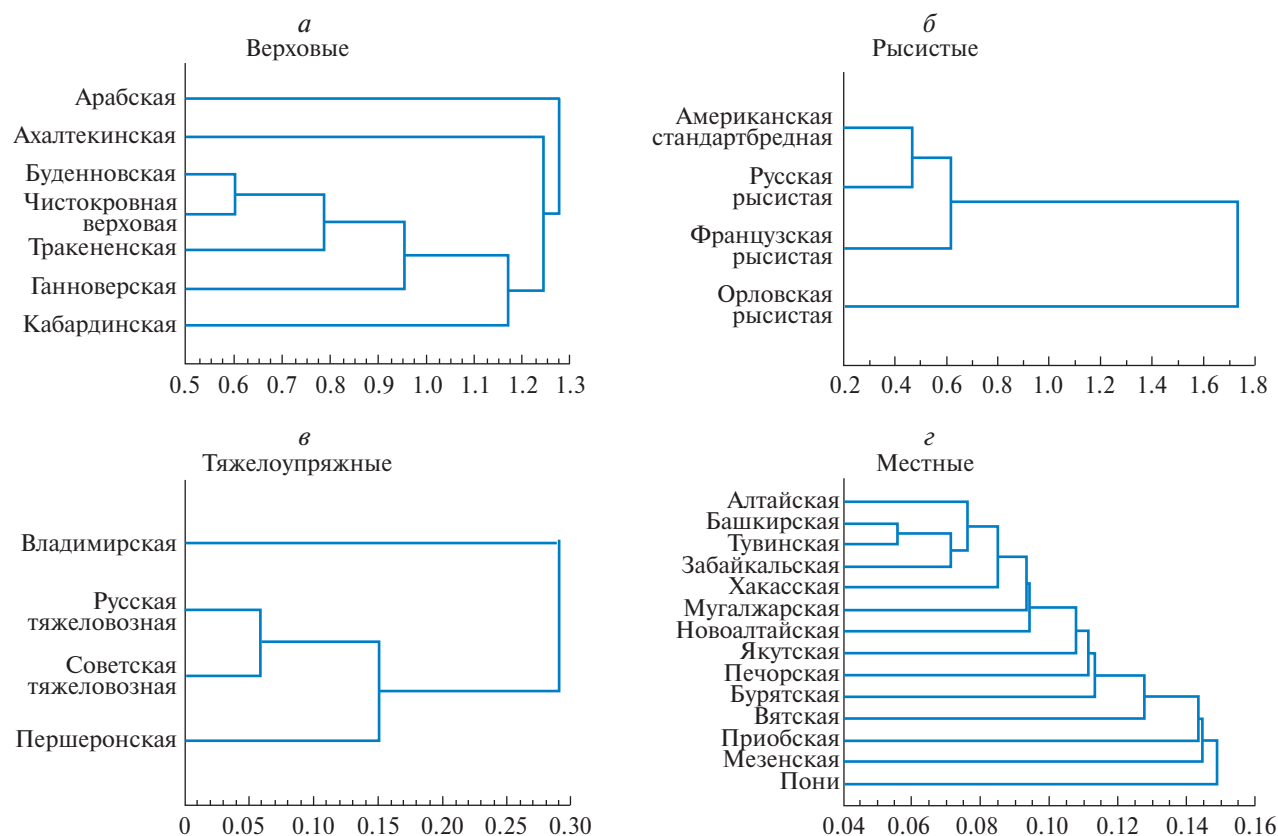


Рис. 3. Генетическая идентификация и кластеризация лошадей разных пород по Nei [24].

(табл. 1). Наибольшее количество аллельных вариантов было выявлено у тувинской лошади ($n = 170$), а наименьшее у бурятской породы ($n = 117$). Местные породы лошадей различались между собой по базовым популяционным параметрам, включая N_a , A_e , H_o , H_e и F_{is} , а также наличием уникальных аллелей, отсутствующих в стандартизированной номенклатуре (табл. 1), включая *HMS7S*, *HMS6J*, *HMS6H*, *HMS2T*, *HMS10*, *ASB2T*, *HTG7L*, *HTG6L*, *HTG6H*, *ASB17Z*, *ASB17X*, *ASB17U*, *VHL20S*, *LEX3S*, *LEX3R* и *CA425E*.

Аллелофонд лошадей мезенской породы, разводимой в Архангельской области, включал сразу пять приватных аллелей: *HMS6J*, *ASB17Y*, *ASB17X*, *LEX3S* и *LEX3R*. Наибольшую концентрацию в этой породе лошадей имели аллели *HMS7L* – 0.670, *HMS3M* – 0.426, *AHT4O* – 0.407, *HTG7O* – 0.407, *HTG7K* – 0.418, *HTG6O* – 0.789, *HTG4M* – 0.443 и *LEX3M* – 0.528.

Вятская порода лошадей выделялась наличием двух приватных аллелей *HTG6L* и *AHT5P*; типичными для этой породы являлись *HMS7L* (0.449), *HMS2H* (0.448), *HMS1M* (0.481), *AHT5J* (0.412), *HTG7* (0.548), *HTG6O* (0.708) и *HTG4M* (0.680).

В генетической структуре башкирских лошадей наблюдается высокая частота встречаемости

определенных аллелей (*HTG10O* – 0.439, *HTG6O* – 0.510, *HTG4M* – 0.590 и *HMS7L* – 0.490) на фоне редких аллелей *ASB17S* и *ASB17U*.

Разводимая в Сибири тувинская порода лошадей отличалась высоким уровнем генетического разнообразия ($N_a = 170$, $A_e = 5.197$, $H_o = 0.782$). Генетическая структура этой породы характеризовалась высокой концентрацией аллелей *HTG6O* (0.545), *HTG4M* (0.630), *HMS7L* (0.419) и наличием очень редких аллелей *HMS6H*, *HMS3L*, *VHL20K*, *ASB23N*, *ASB17Z* и *LEX3J*.

Полиморфизм локуса *LEX3* у лошадей местных пород был представлен 12 аллелями, при этом варианты *LEX3F*, *LEX3L* и *LEX3M* были определены во всех обследованных популяциях. Аллель *LEX3G* изредка встречался у лошадей Западной и Южной Сибири (новоалтайской и тувинской). Лошади алтайской породы выделялись наличием редких аллелей *LEX3J* и *LEX3I*. И только в генотипах мезенских лошадей были определены приватные аллели *LEX3S* (0.042) и *LEX3R* (0.014), отсутствующие у представителей других пород.

Показатели уровня полиморфности и степени гетерозиготности аборигенных популяций в целом были несколько выше, чем у заводских пород лошадей, при отрицательных значениях F_{is} , что

Таблица 2. Генетико-популяционная характеристика 29 пород лошадей по 17 STR-локусам ДНК ($n = 20541$)

Порода	N	MNA	A_e	H_o	H_e	F_{is}	N_a	
Арабская	2978	6.118	3.180	0.631	0.655	0.032	104	Верховые
Ахалтекинская	1040	7.412	3.442	0.649	0.643	-0.010	126	
Буденновская	93	7.000	3.793	0.722	0.713	-0.013	119	
Ганноверская	33	5.882	3.863	0.702	0.704	0.003	100	
Донская	21	5.647	3.426	0.677	0.678	0.007	96	
Кабардинская	289	8.647	5.140	0.723	0.782	0.071	147	
Тракененская	59	6.176	3.904	0.727	0.715	-0.018	105	
Чистокровная верховая	8179	5.882	3.488	0.681	0.682	0.001	100	
Американская стандартбредная	434	7.647	3.457	0.663	0.679	0.016	130	Рысистые
Орловская рысистая	4177	7.529	3.748	0.700	0.702	0.003	128	
Русская рысистая	975	8.059	3.771	0.686	0.706	0.020	137	
Французская	381	7.647	3.810	0.703	0.715	0.017	130	
Владимирская	233	6.765	3.630	0.707	0.704	-0.005	115	Тяжелопряжные
Першерон	57	6.412	3.966	0.711	0.704	-0.007	109	
Русская тяжеловозная	71	7.118	3.753	0.676	0.705	0.036	121	
Советская тяжеловозная	51	7.118	3.982	0.723	0.720	-0.002	121	
Алтайская	39	7.882	4.750	0.772	0.759	-0.020	134	Местные
Башкирская	100	9.000	4.847	0.776	0.773	-0.002	153	
Бурятская	20	6.882	4.288	0.736	0.746	0.012	117	
Вятка	297	8.000	3.763	0.691	0.676	8.000	136	
Забайкальская	24	7.471	4.602	0.752	0.762	0.006	127	
Мезенская	97	7.765	4.189	0.738	0.725	-0.020	132	
Мугалжарская	94	9.059	5.056	0.797	0.780	-0.021	154	
Новоалтайская	150	8.706	4.904	0.764	0.757	-0.009	148	
Печорская	17	7.118	4.173	0.732	0.705	-0.038	121	
Пони	46	7.706	4.338	0.713	0.749	0.047	131	
Приобская	25	7.118	4.157	0.741	0.731	-0.017	121	
Тувинская	569	10.00	5.197	0.753	0.782	0.029	170	
Хакасская	25	7.235	4.315	0.731	0.747	0.025	123	
Якутская	24	6.706	4.177	0.730	0.725	-0.019	114	

Примечание. N – количество голов, MNA – среднее количество аллелей на локус, N_a – количество аллелей, A_e – эффективное число аллелей, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, F_{is} – уровень внутрипопуляционного инбридинга.

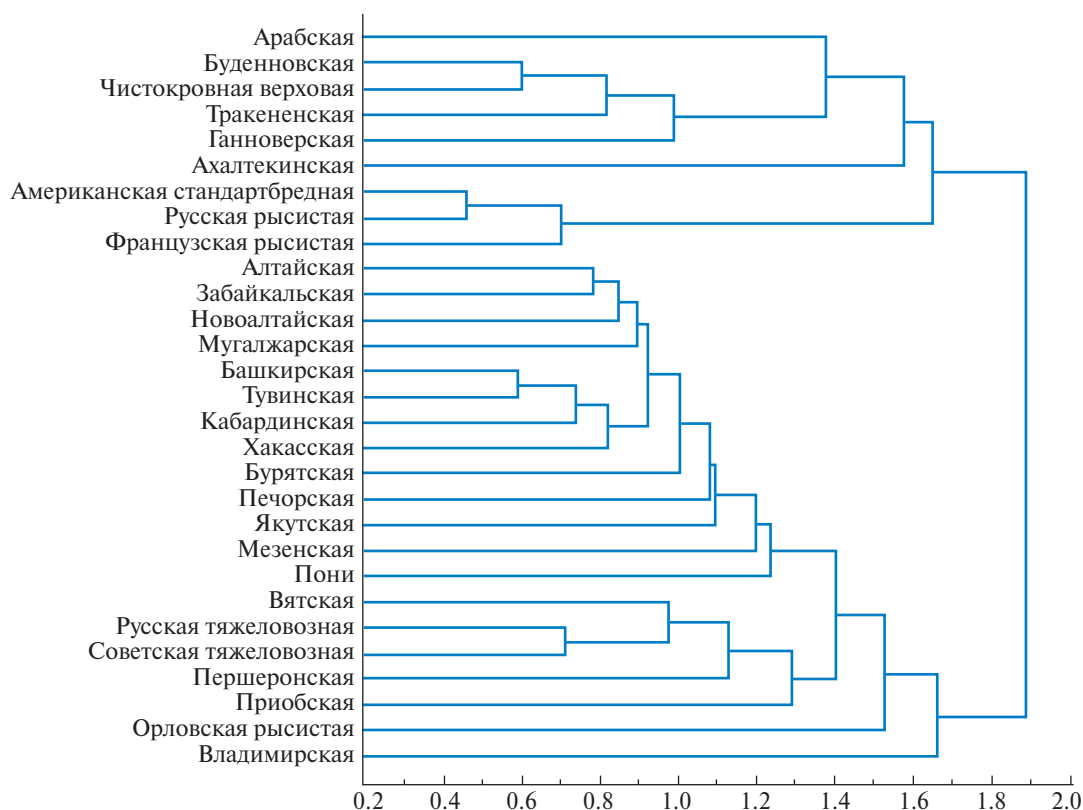


Рис. 4. Дендрограмма генетических дистанций лошадей разных пород, разводимых на территории Российской Федерации.

свидетельствует о генетическом балансе гетерозигот в исследуемых популяциях (табл. 2).

Сравнительно высокие коэффициенты генетического сходства были выявлены между лошадьми степных пород: башкирской и тувинской (0.945), хакасской и башкирской (0.915), и забайкальской и башкирской (0.903) пород. На дендрограмме, отражающей генетические дистанции между аборигенными породами лошадей (рис. 3, г), продемонстрировано, что лошади хакасской, забайкальской, тувинской и башкирской пород объединяются в отдельный кластер степных пород. Наиболее отдаленной оказалась ветвь шетлендских пони, имеющих иностранное происхождение.

Филогенетический анализ 29 пород лошадей разной специализации показал наличие двух четких субкластеров (рис. 4).

Первый кластер объединил лошадей заводских пород, в то время как во второй вошли все аборигенные популяции, а также орловская рысистая и тяжелоупряжные породы, которые длительное время использовались в качестве улучшателей местного поголовья лошадей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наша страна обладает уникальными генетическими ресурсами коневодства, изучение биологических особенностей которых является основой для программ по их сохранению и совершенствованию. В результате исследований молекулярно-генетических особенностей 29 пород лошадей разной специализации нами был выявлен достаточно высокий уровень полиморфизма микросателлитных локусов практически во всех обследованных популяциях ($A_e = 3.2-5.2$) и показана их высокая информативность в качестве генетических маркеров.

При анализе полиморфизма 17 микросателлитных локусов у лошадей отечественных пород были обнаружены все стандартные аллели, которые встречаются у лошадей Европы [23, 25]. Кроме этого, были выявлены новые аллели, которые могли сохраниться в очагах одомашнивания древних лошадей на территории, а также появиться в результате геномных мутаций или интродукции генов с лошадьми кочевников из разных регионов Азии. Дополнительным подтверждением этой гипотезы является изучение генетических характеристик местных китайских лошадей, у которых были выявлены широкий спектр аллелей STR-локусов, а

также наличие общих гаплогрупп мтДНК восточного происхождения.

Сравнительный анализ генетической структуры лошадей разной специализации выявил значительные различия по параметрам: общее количество вариантов аллелей, эффективное количество аллелей (A_e) и количество аллелей на локус. По средним показателям всех исследуемых популяций наибольшие значения (A_e , H_o , H_e и N_a) были выявлены у лошадей аборигенных пород. Среди верховых пород наиболее контрастно выделялись кабардинские лошади наличием аллелей *AHT4R*, *ANG4Q*, *LEX3Q* и *CA425P*, которые были обнаружены только у лошадей местных пород. Возможно, это связано с тем, что эта порода, разводимая в предгорьях территории Северного Кавказа, была сформирована с участием лошадей кочевых племен и улучшалась персидскими, туркменскими и карабахскими лошадьми (черкесская лошадь).

Особенностью аллелофонда рысистых пород являются аллели *ASB2G*, *ASB2F*, *HMS2F*, *HTG7Q* и *ASB23O*, не выявленные у других лошадей. Высокий коэффициент генетического сходства между русским и стандартбредными рысаками (0.978) наглядно отражает результаты селекционной стратегии повышения кровности и резвости призовых пород. Различия между американской стандартбредной и орловской рысистой породой по генетическим маркерам обусловлены как аллелофондом исходных пород, использованным в процессе формирования, так и направлением племенной работы. В орловской рысистой породе высокий уровень генетического разнообразия сохранился благодаря тому, что в породе планомерно проводился отбор по комплексу хозяйственно полезных признаков. Помимо высокой степени генетической вариабельности характерной особенностью местных пород было наличие ряда уникальных аллелей *ASB2T*, *HMS7S*, *HMS6J*, *HMS6H*, *HMS2T*, *HMS1O*, *HTG7L*, *HTG6L*, *HTG6H*, *VHL20S*, *ASB17Z*, *ASB17X*, *ASB17U*, *LEX3S*, *LEX3R* и *CA425E*, которые не встречались у лошадей отечественных заводских пород и в изученных европейских популяциях [23].

Уникальные аллели были выявлены у лошадей ряда пород, включая алтайскую – *HMS2T*, башкирскую – *ASB17U*, бурятскую – *HTG6H*, *HTG6L*, вятскую – *HTG6L* и *AHT5P*, мезенскую *ASB17X*, *ASB17Y*, *HMS6J*, *LEX3R* и *LEX3S*, тувинскую – *VHL20S*, *HMS6H*, *HTG6L*, *ASB17U*, *ASB17X* и *ASB17Z*. Среди заводских пород лошадей наличием приватных аллелей выделялись донская и буденновская – *ASB17T*, а также орловская рысистая – *AHT5P*.

Суммируя результаты кластерного анализа, можно сказать о наличии четких генетически определенных уровней фундаментальных эволюционных связей между современными представителями

подавляющего числа пород, разводящихся на территории Российской Федерации. Дендрограмма генетических дистанций между изученными породами лошадей наглядно отражает их специализацию по типу хозяйственного использования: верховые, рысистые, тяжелоупряжные и местные. При этом в кластер аборигенных пород вошли отдельные заводские породы, такие как орловский рысак и тяжеловозы, на протяжении последних веков использовавшиеся в качестве улучшателей местного поголовья.

Наиболее близкое генетическое родство было установлено между породами чистокровной верховой и буденновской, а также американской стандартбредной и русской рысистой при весоом постоянном влиянии улучшающей породы. Очевидно, что на формирование генетической структуры пород оказывают влияние многие факторы, включая интродукцию генов, векторы отбора и генетико-популяционные процессы в популяциях. Результаты наших исследований свидетельствуют, что все отечественные породы лошадей, внесенные в Реестр селекционных достижений РФ, имеют своеобразный генетический профиль и отличаются от других культурных пород. Современные аборигенные породы лошадей, даже при общности происхождения от монгольских корней, имеют свою характерную генетическую структуру с наличием приватных аллелей, несмотря на периодическое скрещивание с заводскими породами верхового, рысистого и тяжелоупряжного направлений.

Полученные нами результаты подтверждают опубликованные данные зарубежных ученых [12, 26] о том, что ареал одомашнивания лошади занимал значительную часть современной России, которая благодаря своему географическому положению была историческим перекрестком маршрутов многих кочевых народов Евразии, что способствовало интенсивному процессу формирования новых пород лошадей. Россия обладает впечатляющим породным разнообразием конских пород с уникальными генофондами, которые хорошо адаптированы к самым суровым природно-климатическим условиям, характеризуются универсальной работоспособностью, высокими продуктивными качествами и представляют существенный интерес для мирового коневодства. Отечественные породы лошадей обладают своеобразным генетическим профилем с наличием приватных аллелей, который необходимо учитывать при контроле происхождения и оценке популяционного разнообразия, а также при проведении генетического мониторинга и планировании программ по сохранению и разведению лошадей заводских и местных пород.

Авторы выражают глубокую благодарность и признательность коллегам лаборатории генетики и отдела селекции ФГБНУ ВНИИ коневодства, а

также регистраторам пород и специалистам по коневодству разных хозяйств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1037 (внутренний № 15.БРК.21.0001).

Исследование одобрено Этическим комитетом – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства”, протокол № 35 от 14 декабря 2023 г.

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. Вдовина Н.В., Юрьева И.Б. Мониторинг генетической структуры мезенской породы лошадей по микросателлитам ДНК // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2021. Т. 25.(2): 202–207. <https://doi.org/10.18699/VJ21.024>
2. Блохина Н.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М., Гавриличева И.С. Оценка генетического разнообразия микросателлитных локусов у лошадей тяжелоупряжных пород // Генетика и разведение животных. 2018. № 2. С. 39–44. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2018-2-39-44>
3. Гавриличева И.С. Генетико-популяционная характеристика русской рысистой породы лошадей по локусам микросателлитов ДНК // АгроЗооТехника. 2019. Т. 2. № 3. С. 2. <https://doi.org/10.15838/alt.2019.2.3.2>
4. Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Глазко Т.Т., Федорова Л.М. ДНК-маркеры и “микросателлитный код” (обзор) // С.-х. биология. 2023. Т. 58. № 2. С. 223–248.
5. Долматова И.Ю., Ниятишин Ф.И., Уразбахтин Р.Ф. Популяционно-генетическая характеристика лошадей башкирской породы по микросателлитам ДНК // Коневодство и конный спорт. 2017. № 4. С. 17–19.
6. Калашников В.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М. и др.. Полиморфизм микросателлитной ДНК у лошадей заводских и локальных пород // С.-х. биология. 2011. Т. 46. № 2. С. 41–45.
7. Калашникова Л.А., Новиков А.А., Семак М.С. Развитие генетической экспертизы племенной продукции в животноводстве // Зоотехния. 2022. № 11. С. 25–28.
8. Марзанов Н.С., Насибов М.Г., Марзанова Л.К. и др. Генетические маркеры в теории и практике разведения овец. М.: Пионер, 2010. 184 с.
9. Храброва Л.А. Теоретические и практические аспекты генетического мониторинга в коневодстве: Дис. ... д-ра с.-х. наук. М.: ВНИИ коневодства, Дивово, 2011. 38 с.
10. Храброва Л.А. Стратегия использования генетических маркеров и геномной селекции в коневодстве. Дивово, 2015. 81 с.
11. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. М.: РАСХН, 2008. 501 с.
12. Lippold S., Matzke N.J., Reissmann M. Whole mitochondrial genome sequencing of domestic horses reveals incorporation of extensive wild horse diversity during domestication // BMC Evol. Biol. 2011. V. 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-328>
13. Stock K.F., Jönsson L., Ricard A., Mark T. Genomic applications in horse breeding // Animal Frontiers. 2016. V. 6. I. 1. P. 45–52. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0007>
14. Atroshchenko M., Dementieva N., Shcherbakov Yu. et al. The genetic diversity of horse native breeds in Russia // Genes. 2023. V. 14. <https://doi.org/10.3390/genes14122148>
15. Jarne P., Lagoda P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back // Trends in Ecol. and Evol. 1996. V. 11(10). P. 424–429. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)
16. Khaudov A.D., Duduev A.S., Kokov Z.A. et al. Diversity of Kabardian horses and their genetic relationships with selected breeds in the Russian Federation based on 17 microsatellite loci // IOP Conf. Series. Earth and Envir. Sci. 2019. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/341/1/012072>
17. Khrabrova L.A. Characterization of genetic horse breeding resources in Russia. Lambert Acad. Publishing, OmniScriptum GmbH & Co KG, 2015. 59 p. <https://www.abebooks.com/9783659808814/Characterization-genetic-horse-breeding-resources-3659808814/plp>
18. Храброва Л.А., Блохина Н.В., Белоусова Н.Ф., Котран Е.Г. Оценка генеалогической структуры вятской породы лошадей (*Equus ferus caballus*) с использованием анализа ДНК // Генетика. 2022. Т. 58. № 4. С. 457–462.
19. Blohina N.V., Khrabrova L.A., Gavrilicheva I.S. Application of modern technologies in identifying distinctive features in the subpopulation of Novoaltaiskaya horses // IOP Conf. Series: Earth and Environ. Sci. 2021. V. 624(1). 012019.
20. Zaitcev A.M., Gavrilicheva I.S., Blohina N.V. Assessment of the population structure of horses of the Priobskaya breed based on modern technologies // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2021. V. 624. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/624/1/012032>

21. *Chang C.C., Chow C.C., Tellier L.C.A.M. et al.* Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets // (Giga)ⁿ Science 2015. V. 4. I. 1. s 13742-015-0047-8. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8>
22. *Francis R.M.* Pophelper: An R package and web app to analyse and visualize population structure // Mol. Ecol. Resour. 2017. V. 17. P. 27–32.
23. *Van de Goor L.H.P., Panneman H., Haeringen W.A.* A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for equine-specific STR loci // Animal Genet. 2010. V. 41. № 2. P. 122–127.
24. *Nei M.* Molecular Evolutionary Genetics. N.Y.: Columbia Univ. press, 1987. 512 p.
25. *Van de Goor L.H., Van Haeringen W.A., Lenstra J.A.* Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetical analysis // Animal Genet. 2011. V. 42(6). P. 627–633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x>
26. *Librado P., Khan N., Fages A.* The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes // Nature. 2021. V. 598. P. 634–640. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04018-9>

Analysis of the Genetic Structure of 29 Horse Breeds of Russian Selection by STR Markers

N. V. Blohina^{1, *}, L. A. Khrabrova¹

¹All Russian Research Institute for Horse Breeding. Ryazan oblast, p. Divovo, 391105 Russia

*e-mail: nbloh16@yandex.ru

The current stage of genetic certification of horses of factory and local breeds based on microsatellite analysis makes it possible to quite effectively carry out identification and genetic examination of the origin of breeding animals, as well as solve the problem of assessing and preserving genetic resources. With a reduction in the number of breeding stock to 200–300 mares, observed in a number of breeds, the threat of a decrease in the genetic diversity of populations and the accumulation of genetic load increases, which necessitates the need to study and monitor the genetic structure of horse breeds. In this regard, our comparative genetic analysis of polymorphism of 17 microsatellite loci in 20541 horses of 30 factory and local breeds allows us to certify the basic part of the genetic resources of the horse breeding of the Russian Federation, including riding, trotter, draft and local breeds. During the genetic population analysis of the studied breeds, basic parameters were assessed: the total number of allele variants (N_a), the effective number of alleles (A_e), the average number of alleles per locus (MNA), the level of observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e), as well as the coefficient of intrapopulation inbreeding F_{is} . Phylogenetic relationships of breeds were assessed using the R and R Studio software packages. Among horse breeds of different specializations, the highest values of all indicators of genetic diversity (A_e , H_o , H_e and N_a) were determined in aboriginal populations. In the allele pool of local horse breeds, there were rare alleles *ASB2T*, *HMS7S*, *HMS6J*, *HMS6H*, *HMS2T*, *HMS1O*, *HTG7L*, *HTG6L*, *HTG6H*, *VHL20S*, *ASB17Z*, *ASB17X*, *ASB17U*, *LEX3S*, *LEX3R* and *CA425E*, which were absent in horses of factory breeds. Among the riding horse breeds created in Russia, the Budennovsk, Don and Kabardian horse breeds stood out due to the presence of rare alleles. Alleles *ASB2G*, *ASB2F*, *HMS2F*, *HTG7Q* and *ASB23O* were found in trotter horses, which were not identified in the genetic structure of other breeds. The phylogenetic analysis showed the division of horse breeds into two clear subclusters, the first of which included only factory breeds. The second cluster united all the native breeds, as well as the Orlov trotter and a group of draft breeds, which were used for many years as improvers of the local horse population. The analysis of the genetic structure of domestic horse breeds revealed a fairly high reserve of diversity even in small populations, which is an indispensable condition for successful selection in horse breeding.

Keywords: *Equus caballus*, genetic diversity, DNA microsatellites, breed, horse.

ПОЛИМОРФИЗМ РОССИЙСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ *Rhopalosiphum padi* L. ПО ДНК-МАРКЕРАМ

© 2024 г. Е. Е. Радченко¹*, И. Н. Анисимова¹, Н. В. Алпатьева¹

¹Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190000 Россия

*e-mail: eugene_radchenko@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.02.2024 г.

После доработки 22.02.2024 г.

Принята к публикации 29.02.2024 г.

С помощью технологии высокопродуктивного секвенирования нового поколения (NGS) в 14 выборках из трех популяций черемухово-злаковой тли (*Rhopalosiphum padi* L.) изучали полиморфизм фрагмента гена *ND4*, кодирующего субъединицу 4 NADH-дегидрогеназы, и определяли спектр точечных замен. Насекомых собирали на северо-западе России (окрестности С.-Петербурга) и на Северном Кавказе (Краснодарский край и Дагестан). Идентифицировали гаплотипы митохондриальной ДНК (мтДНК), нуклеотидные последовательности которых на 97.95–99.80% совпадали с референсной (GenBank accession KT447631.1). Уровень внутривидового полиморфизма данного фрагмента гена *ND4* длиной 438 пн варьировал от 0.2 до 4.3%. В течение двух лет в последовательностях *ND4* найдено 33 полиморфных сайта (17 транзиций и 16 трансверсий), что позволило идентифицировать 30 гаплотипов мтДНК. Популяции *Rh. padi*, собранные одновременно на разных растениях-хозяевах или в разное время на черемухе (весной) и злаках (летом), различались по соотношению основного гаплотипа, а также по составу уникальных минорных гаплотипов. Анализ соотношений митохондриальных ДНК гаплотипов свидетельствует о важной роли генотипа растения-хозяина при формировании структуры популяций *Rh. padi*.

Ключевые слова: *Rhopalosiphum padi*, популяции, ген *ND4*, нуклеотидный полиморфизм, гаплотип митохондриальной ДНК.

DOI: 10.31857/S0016675824080068 EDN: BFPTNK

На многих сельскохозяйственных культурах и прежде всего на злаках существенно увеличилась вредоносность тлей. Повсеместно наблюдающаяся генетическая однородность агроценозов способствует ускорению микроэволюции насекомых. Характерная для злаковых тлей возможность приспособления к питающему растению вызывает необходимость изучения изменчивости насекомых, источником которой могут быть иммиграция клонов в локальную популяцию извне, мутационный процесс и комбинативная изменчивость внутри локальной популяции по генам вирулентности к растениям-хозяевам. Понятно, что для этого требуются исследования по определению границ популяций фитофагов, направления и дальности их миграций. Известно, что тли могут переноситься воздушными потоками на дальние расстояния. Так, отмечен частый перенос тлей в Швецию через Балтийское море из Дании, Германии и Польши [1]. Поэтому вновь образовавшийся биотип вредителя может довольно быстро расселиться на обширной

территории. Весенние миграции злаковых тлей обычно происходят с юга на север и связаны преимущественно с переносом насекомых воздушными течениями. Летние и осенние миграции злаковых тлей обусловлены главным образом фенологией зерновых культур [2]. Сведения о границах популяций тлей в России очень скудны. Между тем такого рода сведения имеют ключевое значение для разработки целесообразных программ территориального размещения сортов зерновых культур, защищенных разными генами устойчивости к фитофагам.

Для изучения структуры популяций насекомых в настоящее время широко используют однонуклеотидный полиморфизм (SNP) митохондриальных и ядерных генов. Сравнение популяций тлей по нуклеотидным последовательностям полиморфных фрагментов митохондриального, нерекombинирующего генома становится все более популярным. При исследовании популяций насекомых, в том числе и тлей, чаще других используют ген *COI*, кодирующий субъединицу 1 цитохромоксидазы

[3–5]. Полиморфизм гена *ND4*, кодирующего субъединицу 4 фермента NADH-дегидрогеназы, изучен значительно меньше. В аннотированной последовательности митохондриальной ДНК люцерновой тли *Aphis craccivora* C.L. Koch этот ген находится между 6791-й и 8048-й нуклеотидными позициями. При анализе популяции обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* Rondani в США фрагмент *ND4* был описан как высокополиморфный в сравнении с *ND1* (ген, кодирующий субъединицу 1 NADH-дегидрогеназы) и фрагментом цитохрома *b* (*cytb*) [6]. В популяции люцерновой тли в Китае обнаружили около 4% полиморфных сайтов в последовательности гена *ND4* [3]. Значительный полиморфизм фрагмента *ND4* был выявлен и нами при сравнении образцов из популяций обыкновенной злаковой тли, собранных на Северном Кавказе в разное время года на разных культурах [7].

Цель настоящей работы – оценить диагностическую ценность однонуклеотидного полиморфизма фрагмента гена *ND4* для исследования популяций черемухово-злаковой тли *Rhopalosiphum padi* L., обитающих в различных эколого-географических регионах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выборки насекомого

Черемухово-злаковая тля – повсеместно распространенный олигофаг (повреждает злаковые культуры) с четко выраженной клоновой структурой популяций (преимущественное размножение партеногенезом, одно амфигонное поколение осенью). *Rh. padi* зимует на черемухе, хотя на юге возможна зимовка и на злаках, предпочитает для питания зерновые колосовые злаки, изредка питается на сорго. Сбор насекомых проводили в 2021–2022 гг. в контрастных по климатическим условиям зонах Европейской части России:

на северо-западе России – в окрестностях Санкт-Петербурга (Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР, г. Пушкин) – влажный холодный климат, небольшие площади посевов зерновых;

на Северном Кавказе – в Дагестане, в окрестностях г. Дербента (Дагестанская опытная станция ВИР) – теплый климат, поливное земледелие, высокая влажность воздуха вследствие искусственного орошения и близости моря, очаговые посевы злаковых; в Гулькевичском районе Краснодарского края (Кубанская опытная станция ВИР) – теплый и крайне изменчивый по увлажнению климат, широкое возделывание озимых зерновых культур.

В нашем распоряжении было 14 выборок *Rh. padi*. В 2021 г. на посевах зерновых в Дагестане численность тли была очень низкая, насекомых собрали лишь на диком сорго (апрель). В Краснодарском

крае тлю собирали в июле на созревающем ячмене и две выборки – на разных сортах сорго. В С.-Петербурге одна выборка была собрана на черемухе (май), две – на коллекционных посевах ячменя и пшеницы (июнь). В 2022 г. *Rh. padi* собрали в Дагестане на пшенице в конце полевого сезона (май). В С.-Петербурге одна выборка была собрана на черемухе в мае перед миграцией *Rh. padi* на посевы зерновых, а пять выборок – в июле и августе на разных сортах пшеницы (Ленинградка, Дельфи 400), ячменя (Белогорский) и овса (Воггус). Сорт Ленинградка восприимчив к насекомому, тогда как Дельфи 400 защищен двумя доминантными комплексными генами устойчивости к *Rh. padi* [8].

В каждом случае было собрано не менее 300 насекомых в нескольких (5–20) точках. Насекомых помещали в 70%-ный этанол в пробирку с закручивающейся крышкой. Перед выделением ДНК заспиртованный материал подсушивали при комнатной температуре. Образцы, собранные в С.-Петербурге, немедленно замораживали и хранили при –20 °С.

Молекулярно-генетический анализ

Суммарную ДНК выделяли из 300–500 особей каждой выборки с помощью SDS-буфера (100 мМ трис-НСl, рН 9.0; 100 мМ ЭДТА; 1.0% SDS) по протоколу, разработанному для тканей насекомых и детально описанному в методических указаниях [9]. Фрагмент гена *ND4* длиной 438 пн, локализованный в интервале 8672–8252 пн последовательности митогенома *Rh. padi* (GenBank: KT447631.1 в базе нуклеотидных последовательностей NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)), амплифицировали с помощью праймеров F: 5'-TCCAAAGGCTCATGTTGAGGC-3' и R: 5'-CCAAATAAATTAAAGATGGGGGA-3' при температуре отжига 59 °С. Фрагменты секвенировали на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США) согласно инструкции производителя с помощью набора реактивов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2 * 300 н). Работа проводилась в ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ. Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывали с помощью программного обеспечения “Trimmomatic” [10] и “QIIME” [11]. Полученные последовательности были отфильтрованы по качеству, очищены и обрезаны с использованием пакета Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2) в программной среде R [12]. Редкие аллельные варианты с частотой менее 1% были исключены из анализа.

Последовательности были таксономически идентифицированы по степени сходства с помощью международной базы нуклеотидных последовательностей NCBI GenBank и поисковой системы

BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве референсной использовали последовательность гена *ND4* частично секвенированного митогенома черемухово-злаковой тли, собранной в Китае (GenBank: KT447631.1). Выравнивание и анализ полученных последовательностей проводили с помощью программы MEGA version 7 [13]. Парное сравнение по числу нуклеотидных замен на каждый сайт рассчитывали с использованием метода максимального комбинированного правдоподобия (maximum composite likelihood method) [14] в программе MEGA7 [13]. Для трансляции использовали код 5.

Генетические различия между 14 выборками тли оценивали с помощью индекса фиксации Райта *Fst* [15], который рассчитывали в программе GenAlEx 6.5 (Genetic analysis in Excel, 6.5 <http://biology.anu.edu.au/GenAlEx>) [16]. Многомерная диаграмма сходства между выборками *Rh. padi* по минорным гаплотипам мтДНК построена с помощью опции Principal Coordinates (PCoA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью высокопроизводительного секвенирования в 14 пробах ДНК *Rh. padi* мы получили свыше 200 000 последовательностей фрагмента гена *ND4* длиной 438 пн. Найдено 33 полиморфных сайта, что позволило идентифицировать 30 гаплотипов мтДНК (рис. 1, доп. таблица). Ни один из гаплотипов не был идентичен референсному фрагменту гена *ND4 Rh. padi* (GenBank: KT447631.1), однако сходство оказалось значительным и его степень варьировала от 97.95% (девять нуклеотидных замен) до 99.80% (одна замена). Варианты нуклеотидных последовательностей, обозначенные нами seq1_2021/2022, seq2_2021/2022, seq3_2021/2022 и seq12_2021/2022, встречались во всех выборках, собранных в 2021 и 2022 гг., причем всегда преобладал seq1.

Показатель изменчивости фрагмента гена *ND4* в исследованных выборках *Rh. padi* (рассчитанный по числу замен на каждый сайт последовательности и выраженный в процентах) варьировал в диапазоне 0.2–4.3%, что соответствует 1–19 SNP. Идентифицированные варианты различались точечными мутациями разных типов (транзиции и трансверсии). Выявили 17 транзиций (восемь G→A и девять T→C) и 16 трансверсий (пять A→T, девять T→G и две A→C), т. е. частоты двух типов мутаций тождественны. Идентифицировали 20 синонимических замен и 13 миссенс-мутаций. Смысловые замены в большинстве случаев обусловили функционально эквивалентную замену гидрофобных незаряженных аминокислот M, L, I, V, F, W и G, а также гидрофобных незаряженных аминокислот S и Y. Только в северо-западной популяции насекомого, питавшейся на черемухе в 2021 г. и на сорте пшеницы

Дельфи 400 в 2022 г., обнаружены гаплотипы, у которых в позиции 320 идентифицирована смысловая замена пролина с гидрофобным незаряженным радикалом на серин с гидрофильным незаряженным радикалом (P→S) (нумерация приведена в соответствии с последовательностью субъединицы 4 митохондриальной NADH-дегидрогеназы *Rh. padi*, референсный образец GenBank:AMV74158.1). Уникальными оказались шесть гаплотипов мтДНК насекомого seq_9, seq_15, seq_10, seq_17, seq_16 и seq_19, выявленных в образцах, собранных в июне 2021 г. на пшенице, которые отличались от остальных семью заменами: тремя трансверсиями и четырьмя транзициями (рис. 2). Замены нуклеотидов в трех триплетах TTT/ATT, TTG/TTT и GTT/ATT оказались смысловыми и привели к заменам гидрофобных незаряженных аминокислот F→I, L→F, V→I. Суммарная доля таких гаплотипов в выборке была существенной и составила 6.7% (2033 последовательности из 30503). На кладограмме они сформировали отдельную группу (рис. 1).

Мы исследовали выборки *Rh. padi*, питавшиеся в северо-западном регионе России в 2021 г. на разных растениях: весной на черемухе, летом на разных сортах пшеницы и ячменя, и обнаружили, что при переходе с черемухи на злаки варьирует суммарная доля гаплотипов seq1 и seq2: от 95.6 до 85.8 и 97.3% соответственно, а также состав минорных гаплотипов в выборке. Уникальными для собранной на черемухе выборки оказались гаплотипы seq3 и seq7, которые “терялись” при миграции популяции летом на злаки, где были выявлены “новые”: 11 гаплотипов — на пшенице и два — на ячмене. Суммарная доля “новых” гаплотипов варьировала и составила 12.4% на пшенице и 2.8% на ячмене (рис. 3).

В шести выборках тли, собранных на северо-западе России в 2022 г., вариабельность минорных гаплотипов была значительной. На черемухе обнаружено семь гаплотипов, что вдвое выше, чем в 2021 г. Выборки *Rh. padi*, собранные на неустойчивом к тле сорте Ленинградка в июле и августе, различались незначительно. В августе появились два новых гаплотипа, однако доля каждого из них не превышала 1%. Различия между выборками тли, питавшимися на устойчивом (Дельфи 400) и восприимчивом (Ленинградка) сортах пшеницы в августе, были существенны как по содержанию основного гаплотипа (94 и 89.4%), так и по наборам уникальных минорных гаплотипов. Лишь гаплотип seq4 присутствовал в обеих выборках. Уникальный гаплотип (встречаемость 2.4%) был найден в выборке, собранной на овсе (рис. 4).

Сходные результаты получены и при анализе Краснодарской популяции тли. Три выборки *Rh. padi* были собраны в июле одновременно на ячмене и сортах сорго Ефремовское белое и СЛВ2. На созревающем ячмене, с которого тля активно

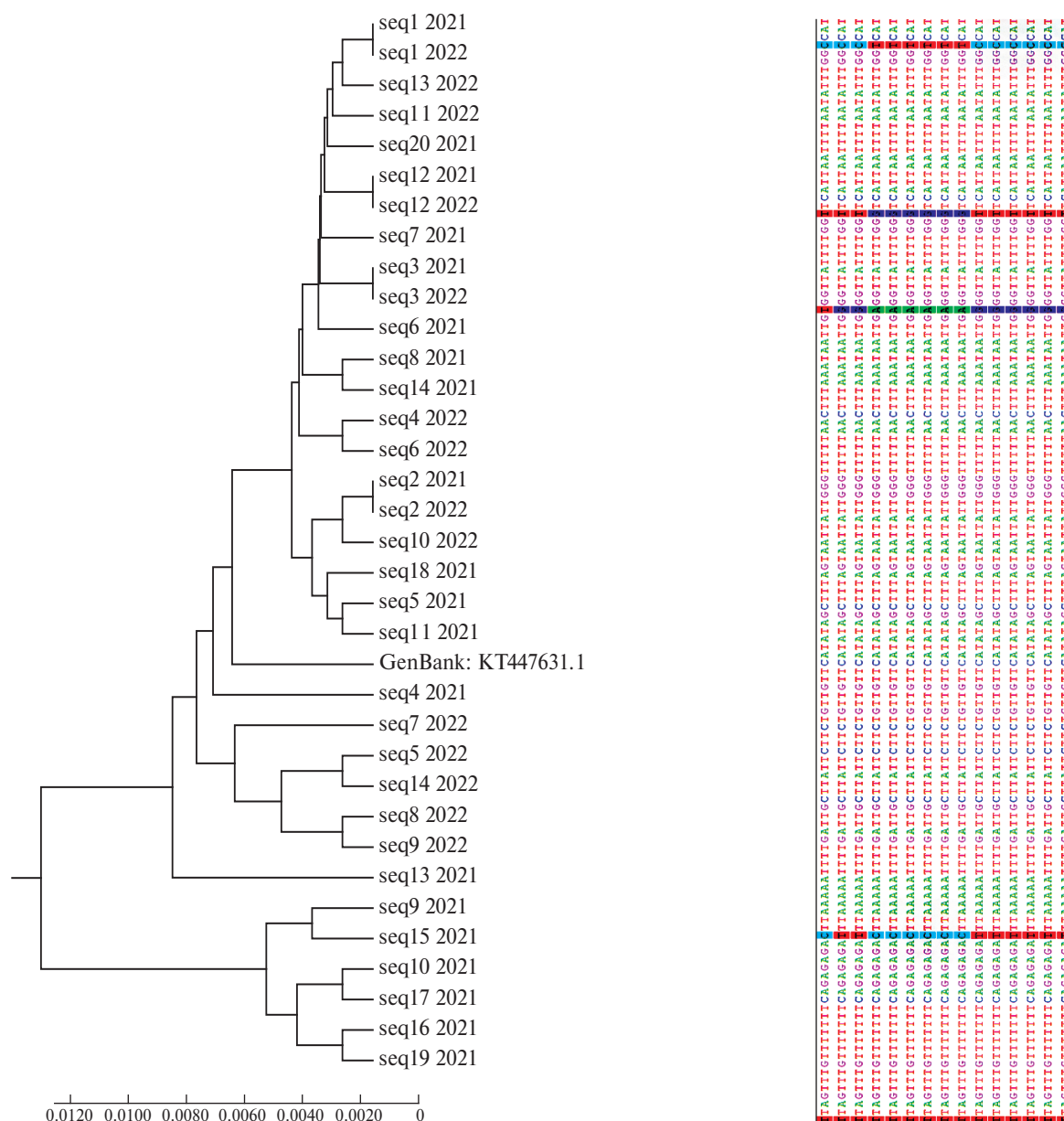


Рис. 1. Разнообразие фрагмента митохондриального гена *ND4* длиной 438 пн в выборках *Rh. padi*. Анализ 34 нуклеотидных последовательностей выполнен в программе MEGA7 [13] с помощью алгоритма UPGMA (метод невязанной попарной группировки с усреднением) [17].

Рис. 2. Выравнивание некоторых нуклеотидных последовательностей, обнаруженных в выборках *Rh. padi*. Уникальные замены, обнаруженные в выборке насекомого, собранной в 2021 г. на пшенице, выделены цветом.

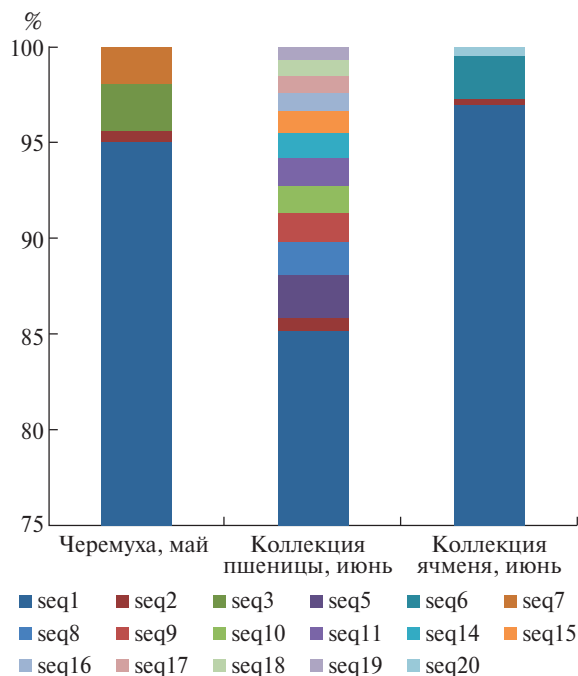


Рис. 3. Встречаемость гаплотипов мтДНК в выборках *Rh. padi*, собранных в Санкт-Петербурге на черемухе, пшенице и ячмене в 2021 г.

мигрировала на сорго, обнаружен лишь один основной гаплотип, а на сортах сорго выявлены уникальные для каждого сорта минорные гаплотипы, составляющие от 1 до 6.6% в выборке.

Значительно различались и выборки, собранные в Дагестане на злаках в 2021 и 2022 гг. В выборке *Rh. padi*, питавшейся на диком сорго, выявлен один основной гаплотип, а на пшенице — шесть минорных гаплотипов (12.8%).

На многомерной дендрограмме, построенной на основании значений индекса фиксации F_{st} , изученные выборки кластеризовались в две группы (рис. 5). Ни в одну из групп не вошла выборка из северо-западной популяции *Rh. padi*, питавшейся на образцах коллекции пшеницы в 2021 г. Все остальные выборки, собранные в 2021 г. на разных хозяевах в Дагестане, Краснодарском крае и на северо-западе России, сходны друг с другом. Очень близкими оказались выборки, которые собирали на северо-западе в течение двух лет на черемухе и ячмене. На пшенице в 2022 г. питались насекомые, существенно отличающиеся от собранных на ячмене и черемухе. Необходимо отметить и различие *Rh. padi*, питавшейся на устойчивом и восприимчивом сортах пшеницы, которое к концу сезона стало отчетливо выраженным. Собранная в Дагестане *Rh. padi* была сходна с питавшимся на овсе и восприимчивом сорте пшеницы насекомым.

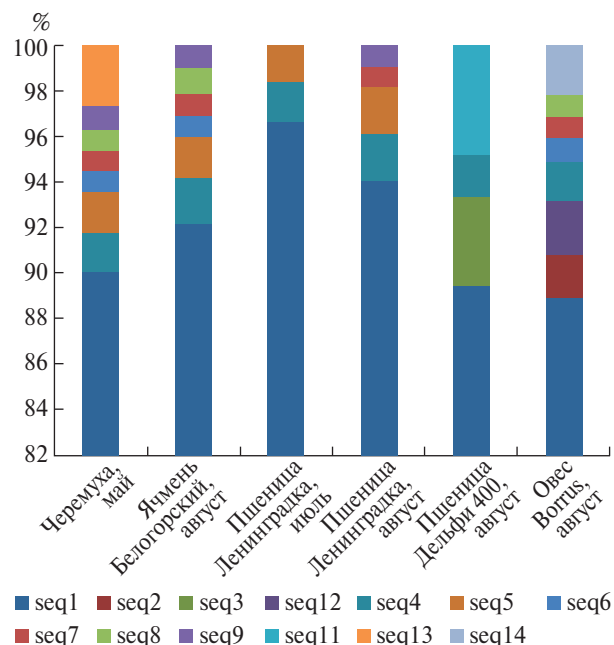


Рис. 4. Встречаемость гаплотипов мтДНК в выборках *Rh. padi*, собранных в Санкт-Петербурге на черемухе, ячмене, овсе и двух сортах пшеницы в 2022 г.

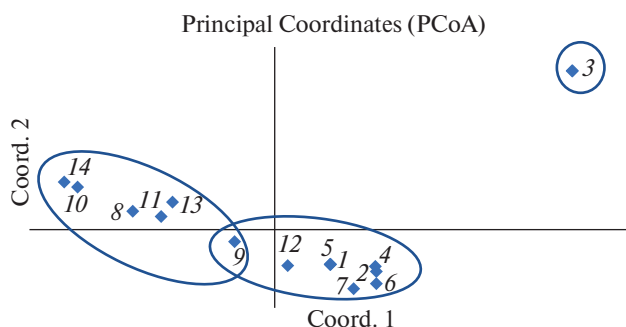


Рис. 5. Многомерная диаграмма генетического сходства по гаплотипам мтДНК между выборками *Rh. padi* (1–14) по индексу фиксации F_{st} . 1 – Дагестан, дикое сорго, 04.2021; 2 – С.-Петербург, черемуха, 05.2021; 3 – С.-Петербург, коллекция пшеницы, 06.2021; 4 – С.-Петербург, коллекция ячменя, 06.2021; 5 – Краснодарский край, коллекция ячменя, 07.2021; 6 – Краснодарский край, сорго (сорт СЛВ-2), 07.2021; 7 – Краснодарский край, сорго (Ефремовское белое), 07.2021; 8 – Дагестан, пшеница (Безостая 1), 05.2022; 9 – С.-Петербург, пшеница (Ленинградка), 07.2022; 10 – С.-Петербург, ячмень (Белогорский), 08.2022; 11 – С.-Петербург, пшеница (Ленинградка), 08.2022; 12 – С.-Петербург, пшеница (Дельфи 400), 08.2022; 13 – С.-Петербург, овес (Borrus), 08.2022; 14 – С.-Петербург, черемуха, 05.2022.

Сравнение объединенных выборок насекомых, собранных в пределах одной популяции, продемонстрировало существенное различие всех изученных популяций *Rh. padi* (рис. 6). Варьирование частот гаплотипов мтДНК оказалось значимым как для эколого-географически разобщенных популяций (Дагестан, Краснодарский край, Санкт-Петербург), так и по годам (Дагестан 2021 г. — Дагестан 2022 г., С.-Петербург 2021 г. — С.-Петербург 2022 г.). Несущественно различались лишь популяции *Rh. padi* из Дагестана и Краснодарского края в 2021 г.

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованных нами 14 выборках *Rh. padi* из различных регионов России доля нуклеотидных замен во фрагменте митохондриального гена *ND4* длиной 438 пн варьировала от 0.2 до 4.3%. Идентифицировали 30 митохондриальных гаплотипов (20 — в семи выборках, собранных в 2021 г., и 14 гаплотипов в 2022 г.), среди них четыре варианта были найдены в 2021 и 2022 гг.

По литературным данным, сходный размах изменчивости характерен и для наиболее часто используемого при изучении популяций насекомых фрагмента гена *COI*. В популяциях *Rhopalosiphum* spp., *Aphis craccivora*, *A. fabae* Scopoli, *A. gossypii* Glover, *Acyrtosiphon pisum* Harris, *Brevicoryne brassicae* L., *Lipaphis pseudobrassicae* Davis и *Myzus persicae* Sulzer уровень его полиморфизма варьировал от 0.2 до 2.7% [4, 5, 18]. Однако, исследуя разнообразие 275 особей *Rh. padi*, собранных в 15 пунктах в Китае, Wang с соавт. [19] нашли низкий уровень нуклеотидного полиморфизма *COI* и *cytb* (0.147 и 0.160% соответственно).

По нашим данным, вариабельность гена *ND4* оказалась выше, что позволило сравнить 14

выборок из трех популяций насекомого. Во всех выборках преобладал (85—100%) один гаплотип. Сравнивая популяции, мы оценивали долю основного гаплотипа, а также число и вариабельность минорных гаплотипов, доля которых варьирует от 1 до 4%.

Ранее, исследуя полиморфизм фрагмента гена *ND4 Sch. graminum*, мы выявили существенные различия между популяциями насекомого, собранными как одновременно на восприимчивом и умеренно устойчивом к фитофагу генотипах сорго, так и в разные периоды вегетации на одном образце растения-хозяина [7]. В настоящем исследовании анализ соотношения гаплотипов мтДНК также свидетельствует о влиянии на генетическую структуру популяций *Rh. padi* прежде всего растения-хозяина.

В 2021 г. повсеместно отмечалась низкая численность вредителя. Достаточное количество насекомых в Дагестане удалось собрать только на диком сорго (*Sorghum halepense* (L.) Pers.), где выявлен лишь один митохондриальный гаплотип. В С.-Петербурге *Rh. padi* собрали в начале полевого сезона (июнь) при миграции тли на коллекционные посевы ячменя и пшеницы, после чего размножение природных энтомофагов резко уменьшило численность насекомого. Выборки, собранные на черемухе и ячмене, были очень близки и резко отличались от тли, питавшейся на пшенице, у которой выявлено 11 “новых” гаплотипов (рис. 1, 5). В Краснодарском крае на коммерческом посеве ячменя, с которого насекомое в июле мигрировало на сорго, отмечен один гаплотип насекомого, а в выборках *Rh. padi*, собранных на двух сортах сорго, идентифицированы специфичные для каждого сорта минорные гаплотипы.

Довольно высокая численность насекомого отмечалась в 2022 г. на северо-западе России. Как и ранее, выявлено высокое генетическое сходство выборок с черемухи и ячменя (рис. 5). Существенно отличались от них выборки, собранные на пшенице. Следует отметить значимое различие насекомых, собранных в конце полевого сезона (август) на восприимчивом (Ленинградка) и устойчивом (Дельфи 400) сортах пшеницы (рис. 5). Различия между географически разобщенными популяциями, а также внутри популяций по годам, как для дагестанских, так и северо-западных выборок, вполне очевидны (рис. 6).

Таким образом, нам удалось выявить достаточно высокий полиморфизм фрагмента гена *ND4*, кодирующего субъединицу 4 NADH-дегидрогеназы черемухово-злаковой тли, по частотам минорных гаплотипов мтДНК — как общий, так и сезонный. Установлено, что эта изменчивость зависит прежде всего от ботанической принадлежности и генотипа растения-хозяина. Отбор клонов *Rh. padi*

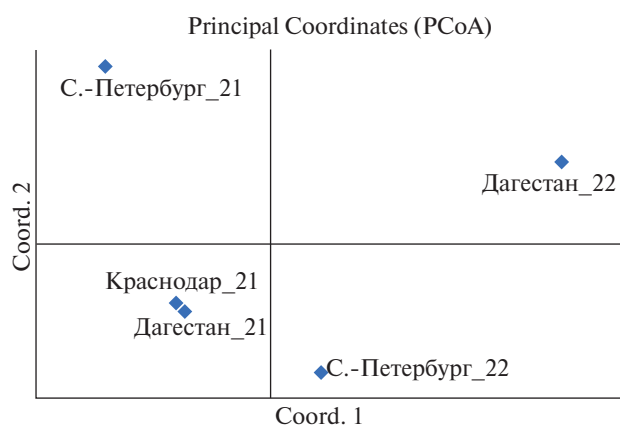


Рис. 6. Многомерная диаграмма генетического сходства по гаплотипам мтДНК между популяциями *Rh. padi* по индексу фиксации F_{st} .

на восприимчивом и устойчивом сортах пшеницы проходит дифференцированно. Значительный однонуклеотидный полиморфизм фрагмента гена *ND4* может быть использован при изучении структуры популяций опасного фитофага.

Наши исследования продемонстрировали значение средообразующей роли растений в биологических сообществах. Степень обеспеченности ресурсом (обилие в пространстве и во времени; площади, занятые под культурой) — важнейший параметр, определяющий внутривидовое разнообразие фитофага. Пригодность растений определяется не только их пищевой ценностью, защитными свойствами и доступностью, но и изменчивостью этих свойств во времени и пространстве.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 20-016-00048) и в рамках Государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № FGEM-2022-0009 “Структурирование и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве”.

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. *Wikteliu S.* Long range migration of aphids into Sweden // *Int. J. Biometeorol.* 1984. V. 28. № 3. P. 185–200. <https://doi.org/10.1007/BF02187959>
2. *Kieckhefer R.W., Lytle W.F.* Summer and autumn flight of cereal aphids in South Dakota // *J. Econ. Entomol.* 1976. V. 69. № 3. P. 421–422. <https://doi.org/10.1093/jee/69.3.421>
3. *Song N., Zhang H., Li H., Cai W.* All 37 mitochondrial genes of aphid *Aphis craccivora* obtained from transcriptome sequencing: Implications for the evolution of aphids // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157857>
4. *Wongsa K., Duangphakdee O., Rattanawanee A.* Genetic structure of the *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae) from Thailand inferred from mitochondrial COI gene sequence // *J. Insect Sci.* 2017. V. 17. № 4. Article 84. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex058>
5. *Guo J., Li J., Massart S. et al.* Analysis of the genetic diversity of two *Rhopalosiphum* species from China and Europe based on nuclear and mitochondrial genes // *Insects.* 2023. V. 14. Article 57. <https://doi.org/10.3390/insects14010057>
6. *Aikhionbare F.O., Mayo Z.B.* Mitochondrial DNA sequences of greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes // *Biomol. Eng.* 2000. V. 16. № 6. P. 199–205. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(99\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(99)00054-4)
7. *Radchenko E.E., Alpatieva N.V., Chumakov M.A., Abdullaev R.A.* Variability of the North Caucasian populations of greenbug for the virulence to host plants and by the molecular markers // *Russ. J. Genet.* 2019. V. 55. № 11. P. 1417–1425. <https://doi.org/10.1134/S1022795419110127>
8. *Radchenko E.E., Berim M.N., Zubov A.A.* Genetic control of different types of the aphid resistance in cereal crops // *Entomol. Rev.* 2007. V. 87. № 3. P. 253–262. <https://doi.org/10.1134/S0013873807030025>
9. *Алпатьева Н.В., Антонова О.Ю., Радченко Е.Е. и др.* ПЦР-диагностика вредных организмов гуара: методические указания / Под ред. Потокиной Е.К. СПб.: ВИР, 2019. <https://doi.org/10.30901/978-5-907145-44-3>
10. *Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 15. P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
11. *Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al.* QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. № 5. P. 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
12. *Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J. et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nat. Methods.* 2016. V. 13. № 7. P. 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
13. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
14. *Tamura K., Nei M., Kumar S.* Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Natl. / Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 30. P. 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
15. *Giraud T., Enjalbert J., Fournier E. et al.* Population genetics of fungal diseases of plants // *Parasite.* 2008. V. 15. № 3. P. 449–454. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153449>
16. *Peakall R., Smouse P.E.* GenAIE 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

17. *Sneath P.H.A., Sokal R.R.* Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.
18. *Kinyanjui G., Khamis F.M., Mohamed S. et al.* Identification of aphid (Hemiptera: Aphididae) species of economic importance in Kenya using DNA barcodes and PCR-RFLP-based approach // Bull. Entomol. Res. 2016. V. 106. № 1. P. 63–72. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000796>
19. *Wang K., Liu G.M., Song C.M. et al.* Mitochondrial genetic diversity in the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) in China // J. Agr. Sci. Tech. 2018. V. 20. № 1. P. 95–107.

Polymorphism of Russian Populations of *Rhopalosiphum padi* L. Based on DNA Markers

E. E. Radchenko*, I. N. Anisimova and N. V. Alpatieva

Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, 190000 Russia

*e-mail: eugene_radchenko@rambler.ru

Using the next-generation sequencing (NGS) technology, the nucleotide polymorphism in a fragment of the *ND4* gene encoding NADH dehydrogenase subunit 4 was studied in 14 samples from three populations of the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.) and the range of nucleotide polymorphism was determined. The insects were collected in 2021 and 2022 in the North-West of Russia (in the vicinity of St. Petersburg) and in the northern Caucasus (Krasnodar Territory and Dagestan). Mitochondrial DNA haplotypes were identified, which have 97.95–99.80% sequence identity with the reference GenBank accession number KT447631.1. The level of intraspecific polymorphism of a 438 bp *ND4* gene fragment in *Rh. padi* varied from 0.2 to 4.3%. In the two-year experiments, 33 polymorphic sites (17 transitions and 16 transversions) were found in the *ND4* sequences, which made it possible to identify 30 mitochondrial DNA haplotypes. The *Rh. padi* populations collected simultaneously on different host plants or at different times on bird cherry (spring) and cereals (summer) differed in the proportion of the main haplotype, as well as in the composition of unique minor haplotypes. Analysis of the ratio of mitochondrial DNA haplotypes suggests the important role of the host plant genotype in the formation of the structure of *Rh. padi* populations.

Keywords: *Rhopalosiphum padi*, populations, gene *ND4*, nucleotide substitutions, mitochondrial DNA haplotype.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА ГЕНА ХОЛОДОВОГО РЕЦЕПТОРА *TRPM8* (rs7593557) В 15 ПОПУЛЯЦИЯХ АЛТАЕ-САЯНСКОГО РЕГИОНА, ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И ДАЛЬНОГО ВОСТОКА

© 2024 г. М. А. Губина^{1, *}, В. Н. Бабенко¹, Е. Ю. Губина²

¹Федеральный исследовательский центр, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991 Россия
*e-mail: marina@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 18.12.2023 г.

После доработки 31.01.2024 г.

Принята к публикации 02.02.2024 г.

Проведен анализ гена терморекцептора *TRPM8* (rs7593557) у населения (15 выборок), проживающего в разных регионах Северной Азии, Алтае-Саянского нагорья, а также в Канаде. Высокие частоты редкого генотипа и аллеля в популяциях Алтае-Саянского региона и Западной Сибири обнаружены у теленгитов (22.2 и 41.7% соответственно), низкие — у сибирских татар (3.2 и 18.5% соответственно), а среди народов севера Сибири и Дальнего Востока высокая частота обнаружена у нанайцев (22.2 и 42.6% соответственно), а низкая — у якутов (1.1 и 10.9% соответственно). Отклонений от равновесия Харди–Вайнберга не обнаружено. Проведена трансассоциация полиморфизмов генов *TRPV1*, *TRPA1* и *TRPM8* с помощью метода регрессионного анализа в 14 популяциях. Из всех трех пар только в одной — *TRPV1/TRPM8* была выявлена положительная корреляция (0.55, $df = 13$, $P\text{-value} = 0.032$). В парах *TRPV1/TRPA* и *TRPA1/TRPM8* выявлена отрицательная корреляция (–0.545, $df = 13$, $P\text{-value} = 0.048$) и (–0.46, $df = 13$, $P\text{-value} = 0.097$). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что изученные полиморфные варианты генов *TRPV1* и *TRPM8* скоррелированы между собой и отрицательно скоррелированы с *TRPA*. Полученные результаты возможно свидетельствуют о коэволюции данных генов. Ранее было показано, что *TRPV1*, так же как и *TRPM8*, выявлен с высокой частотой в популяции нанайцев. Вероятно, эти две мутации пришли одновременно с Восточной Азии и распространились по территории России, тем самым и объясняется то, что они скоррелированы между собой положительно.

Ключевые слова: гены *TRPA1* и *TRPM8*, терморекцепторы, популяции, полиморфные варианты.

DOI: 10.31857/S0016675824080079 **EDN:** BFMVVGK

В связи с тем, что коренные жители Алтае-Саянского нагорья, Западной Сибири и Дальнего Востока проживают на территориях, климатической особенностью которых являются низкие температуры, исследования TRP-ионных каналов актуальны. Восприятие холода играет основную роль в терморегуляции и выживании в холодных условиях, поэтому основным фактором для всех живых организмов является температура окружающей среды.

Гены *TRP* были открыты при исследовании мутантов *Drosophila* с нарушением зрения из-за дефицита катионов кальция в фоторецепторах, позже они были найдены во всех многоклеточных организмах [1]. TRP-ионные каналы принимают участие в регуляции метаболизма кальция и магния,

роста нейронов, терморекцепции, восприятия боли, а также отвечают за передачу температурных, физических и химических стимулов [2]. Всего у млекопитающих известно 30 белков, которые разделяются на семь подсемейств, из них только четыре участвуют в передаче температурного сигнала [2–4]. К холодочувствительным, т. е. активирующимся при понижении температуры, относится только два: *TRPA1* (ниже 17 °C) и *TRPM8* (ниже 28 °C) [5].

Ранее проведено исследование гена *TRPA1* (rs13268757), активация которого происходит при температуре ниже 17 °C и гена *TRPV1* (rs222747), который активируется при температуре выше 42 °C в 15 популяционных выборках, проживающих в разных регионах Северной Азии, Алтае-Саянского нагорья и Канады [6, 7]. Оба полиморфизма

являются расоспецифичными [8]. При исследовании гена *TRPA1* (rs13268757) у коренных жителей Алтае-Саянского региона, Западной Сибири и Дальнего Востока было выявлено, что данная мутация вероятно возникла в популяции якутов (16.7%) и распространилась по территории России в трех направлениях: восточном, юго-восточном и западном [7]. При изучении гена *TRPV1* (rs222747) обнаружено, что наиболее близкими (по частоте данной мутации) к популяциям Восточной Азии были только нанайцы и коряки (56 и 64% соответственно). Сибирские татары, якуты, эвенки наиболее близки к европеоидам. Все популяции Алтае-Саянского региона заняли промежуточное значение между европеоидами и восточными монголоидами. Выявлена отрицательная корреляция между двумя изученными генами -0.545 , число степеней свободы $df = 13$, оценка достоверности P -value $= 0.048$. Полученные данные свидетельствуют о том, что изученные полиморфизмы скоррелированы, что подтверждает ранее полученные данные о том, что присутствие *TRPA1* ингибирует функции *TRPV1*. Результаты, возможно, свидетельствуют о коэволюции данных генов.

Ионный канал TRPM8 является не только холодовым, но и ментоловым, температурный порог активации которого менее $25-28^{\circ}\text{C}$. *TRPM8* кодирует катионный канал, который, на сегодняшний день, является единственным известным температурным рецептором, опосредующим эндогенный ответ на умеренный холод. Ген *TRPM8* расположен на коротком плече второй хромосомы человека и обладает генетическим разнообразием [9]. При повышенной внутриклеточной концентрации Ca^{2+} данный ионный канал может активироваться эвкалиптом и ицилином [10, 11]. TRPM8 обнаружен в эпителиоцитах трахеи и клетках предстательной железы [12], на сенсорных нейронах с малым диаметром заднекорешкового ганглия [13] и на мелких заднекорешковых нейронах с низким порогом температурной активации при охлаждении (около 30°C) [14], а также при различных типах рака [15].

В связи с вышеизложенным цель данной работы — продолжить исследование генов *TRP* в 15 популяциях Алтае-Саянского региона, Западной Сибири и Дальнего Востока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор образцов и исследованные популяции

Образцы крови были собраны в ходе экспедиционных работ 1982–1994 гг. под руководством М.И. Воеводы. Сбор крови проводился из локтевой вены стерильно у добровольцев (взрослых и детей старше десяти лет) с использованием “информированного согласия” обследуемых.

Выборки чукчей были сформированы в поселках Канчалан и Усть-Белая (Анадырского р-на, Чукотского автономного округа), коряков — в п. Оссора (Карагинский район Корякского автономного округа), нанайцев из жителей Хабаровского края, канадских эскимосов — в п. Иглулик (Канада). Выборки эвенков были отобраны из жителей Тындинского р-она, Амурской обл., юкагиров — из п. Нелемное (Верхнеколымского р-на, Республики Саха), якутов — в поселках Тюлях и Верхневилюйск, Республика Саха (табл. 1). Хакасы обследовались в Республике Хакасия, г. Абакан, тувинцы — в Республике Тыва, северные и южные алтайцы и теленгиты — в Усть-Канском, Кош-Агачском и Турочакском р-нах (Республика Алтай), и шорцы в Мысковском и Таштагольском районах Кемеровской обл., а казахи — в Кош-Агачском р-не. Выборка татар была сформирована из проживающих в Чановском и Венгеровском р-нах Новосибирской обл. (п. Аул-Тebис, Воробьево, Тебисское, Аул-Кошкуль, Белехта, Чаргары) в ходе экспедиционных работ в 2006–2007 гг. под руководством М.А. Губиной.

Молекулярно-генетические методы

Тотальную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракцией с использованием протеиназы К [16]. Генотипирование было выполнено методом ПЦР в реальном времени на приборе AB StepOnePlus с использованием TaqMan-зондов (Applied Biosystems, USA), следуя стандартному протоколу. Для подтверждения полученных результатов 10% образцов были прогенотипированы повторно с помощью ПЦР с использованием аллель-специфичных праймеров. Нами был проанализирован полиморфный сайт rs7593557 гена *TRPM8*.

Статистические методы

Межпопуляционные различия оценивали по дистанции F_{st} [19] с помощью программы Arlequin v.3.5.1.2. Уровень значимости дистанций F_{st} оценивали стохастически, число перестановок — 100, уровень значимости $P = 0.05$. Вычисление ожидаемой гетерозиготности и статистической достоверности отклонения от равновесия Харди–Вайнберга производилось с помощью программы Arlequin v.3.5.1.2 [20] точным критерием с оценкой Монте–Карло. Число шагов Марковской цепи — 1000000, число обнулений состояния памяти — 100000. Многомерное шкалирование, основанное на частотах генотипов, было посчитано с помощью программ XLStat [21] на основе матрицы попарных различий F_{st} . Подсчет достоверности регрессии выполнен с помощью программы XLStat.com, для расчета использовалась

частота редкого аллеля, а число степеней свободы – это число популяций минус 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ распространения гена терморесептора *TRPM8* (rs7593557) в 15 популяционных выборках (1503 человека), относящихся к различным языковым группам и проживающих в регионах Алтае-Саянского нагорья, Западной Сибири, Дальнего Востока, а также в Канаде (табл. 1). В табл. 2 представлены частоты генотипов и аллелей в исследованных популяциях. Самая высокая частота среди популяций Алтае-Саянского региона и Западной Сибири (не только редкого генотипа, но и аллеля) обнаружена у теленгитов (22.2 и 41.7% соответственно), а самая низкая – у сибирских татар (3.2 и 18.5% соответственно). Среди народов севера Сибири и Дальнего Востока высокая частота редкого генотипа и аллеля обнаружена у нанайцев (22.2 и 42.6% соответственно), а самая низкая – у якутов (1.1 и 10.9% соответственно). По данным о частотах генотипов рецептора *TRPM8* (табл. 2)

проведен анализ на соответствие равновесию Харди–Вайнберга, отклонений не обнаружено (табл. 3).

Статистически значимые межпопуляционные различия (F_{ST}) гена *TRPM8*, приведенные в табл. 4, показывают, что наибольшие различия выявлены между якутами и теленгитами, нанайцами, коряками, казахами, чукчами, тувинцами; хакасами и теленгитами, нанайцами, коряками, эвенками и шорцами; нанайцами и сибирскими татарами. Наиболее близко друг к другу располагаются пять популяций: теленгиты, шорцы, южные и северные алтайцы и казахи, все они относятся к тюркской группе алтайской языковой семьи. На рис. 1 представлены результаты многомерного шкалирования попарных генетических расстояний в исследованных популяциях. Из рисунка следует, что ближе всех друг с другом располагаются теленгиты, нанайцы, коряки, казахи, чукчи и тувинцы.

Нами была проведена трансассоциация полиморфных локусов генов *TRPV1*, *TRPA1* и *TRPM8* с помощью метода регрессионного анализа в 14 популяциях. В связи с малой выборкой и отсутствием

Таблица 1. Лингвистическая принадлежность, размер, место проживания исследованных популяций и размер проанализированных выборок

Популяция	Лингвистическая принадлежность [17, 18]	Количество образцов	Размер популяции, тыс. человек	Локализация
Тувинцы	Алтайская языковая семья, тюркская группа	151	235	Республика Тыва
Хакасы	То же	78	80.3	Республика Хакасия
Алтайцы южные	«	210	70.8	Республика Алтай
Алтайцы северные	«	40	80	То же
Казахи	«	131	6540	То же
Шорцы	«	141	16	Кемеровская обл.
Теленгиты	«	62	3.8	Республика Алтай
Сибирские татары	«	188	6.7	Новосибирская обл.
Якуты	«	92	478	Республика Саха
Канадские эскимосы	Эскимосско-алеутская яз. семья, эскимосская группа	15	170	Канада
Чукчи	Палеоазиатская языковая семья, чукотско-камчатская группа	224	16	Чукотский АО
Коряки	Палеоазиатская языковая семья, северо-восточная группа	56	8.7	Камчатская обл.
Нанайцы	Алтайская языковая семья, тунгусо-маньчжурская группа	56	16	Хабаровский край
Юкагиры	Уральско-юкагирская языковая семья, юкагирская группа	83	1.6	Республика Саха
Эвенки	Алтайская языковая семья, тунгусо-маньчжурская группа	38	77	Амурская обл.

Таблица 2. Частота генотипов и аллелей rs7593557 гена *TRPM8* в исследованных популяциях

Популяции	Южные алтайцы <i>n</i> = 193	Теленгиты <i>n</i> = 18	Хакасы <i>n</i> = 77	Тувинцы <i>n</i> = 153	Шорцы <i>n</i> = 143	Северные алтайцы <i>n</i> = 41	Сибирские татары <i>n</i> = 189
Генотипы							
<i>AA</i>	12 (6.2)	4 (22.2)	8 (10.4)	13 (8.5)	7 (4.9)	4 (9.7)	6 (3.2)
<i>AG</i>	77 (39.9)	7 (38.8)	23 (29.9)	69 (45.1)	56 (39.2)	11 (26.8)	58 (30.7)
<i>GG</i>	104 (53.9)	7 (38.8)	46 (59.7)	71 (46.4)	80 (55.9)	26 (63.4)	125 (66.1)
Аллель							
<i>A</i>	101 (26.2)	15 (41.7)	39 (25.3)	95 (31.0)	70 (24.5)	19 (23.2)	70 (18.5)
<i>G</i>	285 (73.8)	2 (58.3)	115 (74.7)	211 (69.0)	216 (75.5)	63 (76.8)	308 (81.5)

Популяции	Казахи <i>n</i> = 132	Канадские эскимосы <i>n</i> = 14	Чукчи <i>n</i> = 222	Коряки <i>n</i> = 56	Нанайцы <i>n</i> = 54	Юкагиры <i>n</i> = 68	Эвенки <i>n</i> = 35	Якуты <i>n</i> = 92
Генотипы								
<i>AA</i>	12 (9.1)	2 (14.3)	28 (12.6)	6 (10.7)	12 (22.2)	5 (7.4)	5 (14.3)	1 (1.1)
<i>AG</i>	66 (50)	2 (14.3)	95 (42.8)	26 (46.4)	22 (40.7)	27 (39.7)	16 (45.7)	18 (19.6)
<i>GG</i>	54 (40.9)	10 (71.4)	99 (44.6)	24 (42.9)	20 (37.1)	36 (52.9)	14 (40)	73 (79.3)
Аллели								
<i>A</i>	90 (34.1)	6 (21.4)	151 (34)	38 (33.9)	46 (42.6)	37 (27.2)	26 (37.1)	20 (10.9)
<i>G</i>	174 (65.9)	22 (78.6)	293 (66)	74 (66.1)	62 (57.4)	99 (72.8)	4 (62.8)	164 (89.1)

Примечание. В скобках даны %.

полиморфизма по гену *TRPA1* популяция канадских эскимосов была исключена из всех расчетов. На рис. 2, *a–в* представлены результаты регрессионного анализа трех пар генов: *TRPV1/TRPM8*, *TRPV1/TRPA* и *TRPA/TRPM8*. Из всех трех пар только в одной – *TRPV1/TRPM8* – была выявлена положительная корреляция – 0.55, *df* = 13, *P*-value – 0.032 (рис. 2, *a*). Ранее была выявлена отрицательная корреляция (–0.545) в паре *TRPV1/TRPA*, *df* = 13, *P*-value – 0.048 (рис. 2, *б*) [7]. В третьей паре также была выявлена отрицательная корреляция –0.46, *df* = 13, *P*-value – 0.097 (рис. 2, *в*). Наши данные свидетельствуют о том, что изученные полиморфизмы генов *TRPV1* и *TRPM8* скоррелированы между собой и отрицательно скоррелированы с

TRPA. Полученные результаты, возможно, свидетельствуют о коэволюции данных генов.

Ранее проведенные исследования полиморфных вариантов (ОНП) rs28901637, rs11562975, rs13004520, rs17868387, rs7593557 и rs11563071 гена холодового рецептора *TRPM8* в этнических группах Сибири и Дальнего Востока показали, что состав гаплотипов русских, немцев и хантов наиболее гомогенны. Центральназиатские монголоиды (казахи, тувинцы, шорцы, хакасы) по частотам гаплотипов были близки, в то время как другие сибирские популяции – чукчи тундровые, чукчи приморские, эскимосы – различались между собой. Основные различия были выявлены по полиморфному локусу

Таблица 3. Проверка соответствия распределению Харди–Вайнберга гена *TRPM8*

Гетерозиготность	Канадские эскимосы	Чукчи	Казахи	Эвенки	Якуты	Юкагиры	Хакасы	Теленгиты
Ожидаемая	0.349	0.456	0.450	0.473	0.198	0.377	0.380	0.5000
Наблюдаемая	0.142	0.439	0.496	0.457	0.200	0.375	0.298	0.388
<i>P</i> -value	0.064	0.652	0.327	1.000	1.000	1.000	0.073	0.378

Гетерозиготность	Коряки	Нанайцы	Северные алтайцы	Шорцы	Южные алтайцы	Татары	Тувинцы
Ожидаемая	0.456	0.493	0.366	0.372	0.390	0.450	0.432
Наблюдаемая	0.472	0.418	0.275	0.391	0.401	0.496	0.456
<i>P</i> -value	1.000	0.279	0.178	0.648	0.850	0.329	0.573

Таблица 4. Статистически значимые межпопуляционные различия (F_{ST})

популяции	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0														
2	0.0096	0													
3	0.0215	0.0252	0												
4	0.0144	0.0000	0.0243	0											
5	0.0091	0.0046	0.0056	0.0032	0										
6	0.0521	0.0639	0.1421	0.0782	0.0734	0									
7	0.0000	0.0028	0.0239	0.0048	0.0037	0.0403	0								
8	0.0000	0.0252	0.0231	0.0365	0.0114	0.0397	0.0002	0							
9	0.0333	0.0231	0.0067	0.0184	0.0217	0.1878	0.0365	0.0622	0						
10	0.0167	0.0000	0.0283	0.0000	0.0044	0.0656	0.0061	0.0331	0.0287	0					
11	0.0154	0.0049	0.0423	0.0032	0.0073	0.0298	0.0028	0.0178	0.0598	0.0021	0				
12	0.0067	0.0236	0.0331	0.0303	0.0098	0.0263	0.0028	0.0000	0.0756	0.0254	0.0061	0			
13	0.0091	0.0000	0.0306	0.0000	0.0051	0.0527	0.0008	0.0237	0.0307	0.0000	0.0001	0.0195	0		
14	0.0955	0.0645	0.1639	0.0625	0.0776	0.0317	0.0654	0.1096	0.1904	0.052	0.0271	0.0672	0.0528	0	
15	0.0091	0.0046	0.0056	0.0032	0.0000	0.0734	0.0037	0.0114	0.0217	0.0044	0.0073	0.0098	0.0051	0.0776	0

Примечание. 1 – чукчи, 2 – алтайцы, 3 – нанайцы, 4 – северные алтайцы, 5 – казахи, 6 – канадские эскимосы, 7 – тувинцы, 8 – теленгиты, 9 – коряки, 10 – шорцы, 11 – хакасы, 12 – эвенки, 13 – юкагиры, 14 – якуты, 15 – сибирские татары.

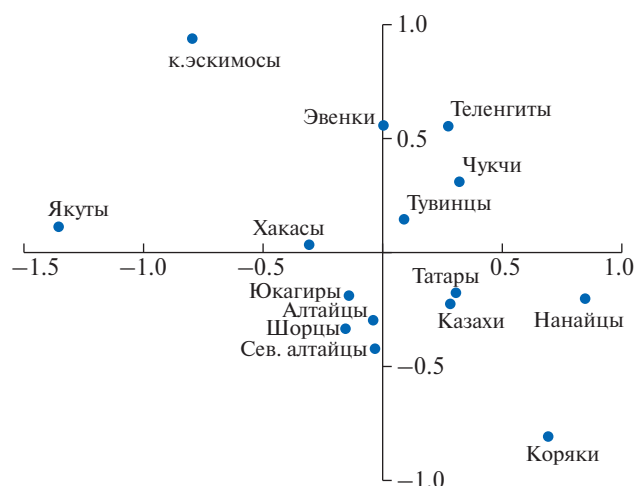


Рис. 1. Многомерное шкалирование попарных генетических расстояний в 15 исследованных популяциях.

в экзоне 11 (rs7593557), между популяциями чукчей и русских. Авторы выдвинули гипотезу, что в процессе колонизации человеком Евразии минорные аллели исследованных ОНП дивергировали в зависимости от структуры rs7593557 в экзоне 11 [22, 23]. Полученные нами данные по *TRPM8* (rs7593557) согласуются с ранее полученными результатами по этому полиморфизму.

Таким образом, исходя из полученных в настоящем исследовании данных, можно предположить, что мутация rs7593557 гена *TRPM8*, вероятнее всего, пришла на Дальний Восток из Восточной Азии и далее распространилась в двух направлениях — восточном и западном. В восточном направлении — у нанайцев (42.6%), эвенков (37.1%), якутов (10.9%), чукчей (34%), коряков (33.9%), юкагиров (27.2%), и далее у канадских эскимосов (21.4%). В западном направлении — на территорию Алтае-Саянского нагорья и Западной Сибири. На территории Алтае-Саянского нагорья частота данной мутации варьирует от 41.7 в популяции теленгитов до 23.2% у северных алтайцев. Самая низкая частота выявлена на территории Западной Сибири у сибирских татар (18.5%). По всей видимости, данная мутация несет на себе ответственность за регуляцию температурного режима, так как высокие частоты выявлены в популяциях, проживающих на территории Дальнего Востока. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что изученные полиморфные варианты генов *TRPV1* и *TRPM8* скоррелированы между собой и отрицательно скоррелированы с *TRPA*, что, возможно, свидетельствует о коэволюции данных генов. Ранее было показано, что *TRPV1*, так же как *TRPM8*, выявлен с высокой частотой в популяции нанайцев. Вероятно обе мутации этих генов пришли одновременно с

Восточной Азии и распространились по территории России; этим объясняется тот факт, что они скоррелированы между собой положительно.

Работа выполнена при финансовой поддержке Бюджетного проекта: № R2022-0021.

Исследование одобрено Этическим комитетом Института цитологии и генетики СО РАН 31.08.2023 г., протокол № 9. 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.

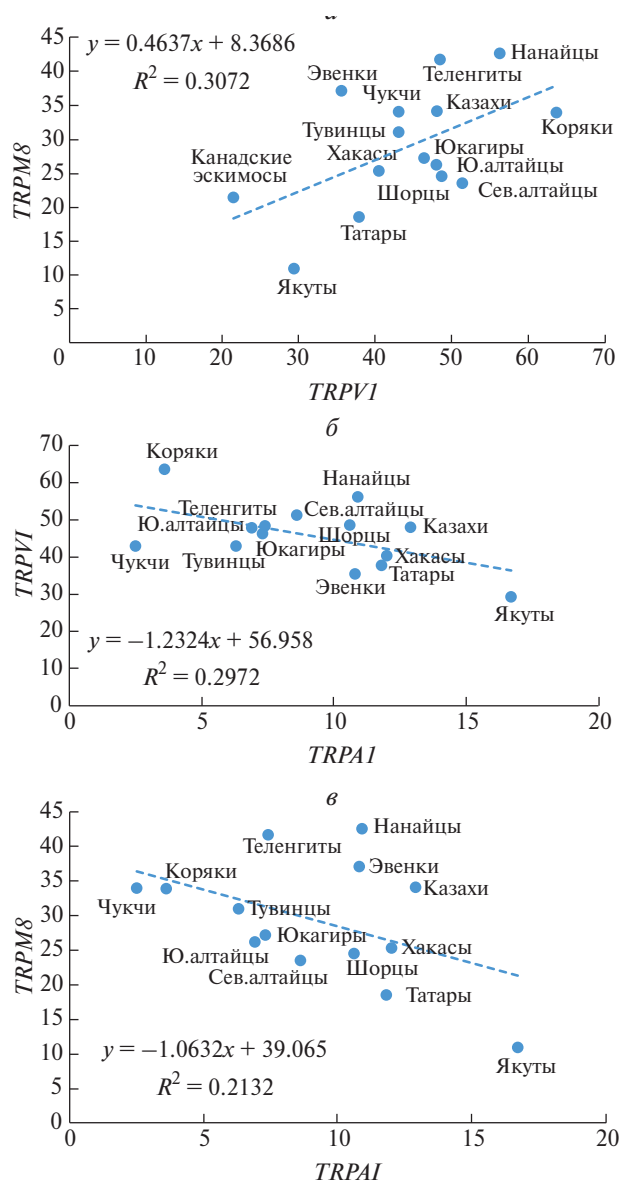


Рис. 2. График линейной регрессии частот полиморфизмов генов *TRPV1/TRPM8* (а), *TRPV1/TRPA* (б) и *TRPA/TRPM8* (в) в 14 популяциях.

От каждого участника исследования или его представителя было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Montell C., Rubin G.M.* Molecular characterization of the *Drosophila TRP* locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction // *Neuron*. 1989. V. 2. P. 1313–1323. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90069-x](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90069-x)
2. *Diaz-Franulic I., Poblete H., Miño-Galaz G. et al.* Allosterism and structure in thermally activated receptor potential channels // *Annu. Rev. Biophys.* 2016. V. 5. P. 371–398. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-011034>
3. *Talavera K., Yasumatsu K., Voets T. et al.* Heat activation of *TRPM5* underlies thermal sensitivity of sweet taste // *Nature*. 2005. V. 438. P. 1022–1025. <https://doi.org/10.1038/nature04248>
4. *Nilius B., Owsianik G., Voets T.* Transient receptor potential cation channels in disease // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. P. 165–217. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2006>
5. *Jordt S.E., McKemy D.D., Julius D.* Lessons from peppers and peppermint: The molecular logic of thermosensation // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003. V. 13. P. 487–492. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(03\)00101-6](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(03)00101-6)
6. *Laursen W.J., Anderson E.O., Hoffstaetter L.J. et al.* Species-specific temperature sensitivity of *TRPA1* // *Temperature (Austin)*. 2015. V. 11. P. 214–226. <https://doi.org/10.1080/23328940.2014.1000702>
7. Губина М.А., Орлов П.С., Бабенко В.Н. и др. Полиморфизм генов терморецепторов *TRPV1* и *TRPA1* человека в популяциях Алтае-Саянского региона и Дальнего Востока // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 2. 243–252.
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/?q=rs13268757>.
9. *Key F.M., Abdul-Aziz M.A., Mundry R. et al.* Human local adaptation of the *TRPM8* cold receptor along a latitudinal cline // *PLoS Genetics*. 2018. V. 14. № 5. P. 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007298>
10. *Wei E., Seid D.* AG-3-5: A chemical producing sensation of cold // *J. Pharm. Pharmacol.* 1983. V. 35. P. 110–112.
11. *McKemy D.D., Neuhauss W.M., Julius D.* Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation // *Nature*. 2002. V. 416. № 6876. P. 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature719>
12. *Tsavalier L., Shapero M.H., Morkowski S., Laus R.* Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 3760–3769.
13. *Patapoutian A., Peier A., Story G., Viswanath V.* Thermo TRP channels and beyond: Mechanisms of temperature sensation // *Neuroscience*. 2003. V. 4. P. 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrn1141>
14. *Nealen M.L., Gold M.S., Thut P.D., Caterina M.J.* *TRPM8* mRNA is expressed in a subset of cold-responsive 148 trigeminal neurons from rat // *J. Neurophysiol.* 2003. V. 90. № 1. P. 515–520. <https://doi.org/10.1152/jn.00843.2002>
15. *Yee N.S., Zhou W., Lee M.* Transient receptor potential channel *TRPM8* is overexpressed and required for cellular proliferation in pancreatic adenocarcinoma // *Cancer Lett.* 2010. V. 297. P. 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.04.023>
16. *Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: CSHL, 1982.
17. *Ruhlen M.A.* Guide to the World's Languages. Classification. London: Edward Arnold, 1991.
18. *Greenberg J.* Indo-European and Its Closest Relatives: The Eurasiatic Family: Grammar. Stanford, CA: Stanford University Press. 2000.
19. *Slatkin M.* An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution // *Genet. Res.* 1994. V. 64. P. 71–74. <https://doi.org/10.1017/s0016672300032560>
20. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics dataanalysis // *Evol. Bioinform. Online*. 2005. V. 1. P. 47–50.
21. XLStat.com
22. *Потанова Т.А., Юдин Н.С., Бабенко В.Н. и др.* Полиморфизм гена холодового рецептора *TRPM8* в этнических группах Сибири и Дальнего Востока // *Вестник ВОГиС*. 2008. Т. 12. № 4. С. 749–754.
23. *Потанова Т.А., Ромащенко А.Г., Юдин Н.С., Воевода М.И.* Этноспецифическое распределение вариантов гена *TRPM8* в евразийских популяциях: знаки отбора // *Вавилов. журнал генет. и селекции*. 2020. Т. 24. № 3. С. 292–298. <https://doi.org/18699/VJ20.45-o>

Study of a Polymorphic Variant of the Cold Receptor Gene *TRPM8* (rs7593557) in 15 Populations of the Altai-Sayan Region and the Far East

M. A. Gubina^{1, *}, V. N. Babenko¹, E. Yu. Gubina¹

¹*Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: marina@bionet.nsc.ru*

The thermoreceptor gene *TRPM8* (rs7593557) was analyzed in 15 population samples living in different regions of Northern Asia, the Altai-Sayan Highlands and Canada. High frequencies of a rare genotype and allele in the populations of the Altai-Sayan region and Western Siberia were found among the Telengits (22.2 and 41.7% respectively), low among the Siberian Tatars (3.2 and 18.5% respectively), and among the peoples of northern Siberia and the Far East high frequency was found among the Nanais (22.2 and 42.6% respectively), and a low frequency among the Yakuts (1.1 and 10.9% respectively). No deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were found. Trans-association of *TRPV1*, *TRPA1* and *TRPM8* gene polymorphisms was carried out using the regression analysis method in 14 populations. Of all three pairs, only one, *TRPV1/TRPM8*, showed a positive correlation (0.55, $df = 13$, P -value = 0.032). In pairs *TRPV1/TRPA* and *TRPA1/TRPM8*, a negative correlation was revealed (−0.545, $df = 13$, P -value = 0.048) and (−0.46, $df = 13$, P -value = 0.097) respectively. Our data indicate that the studied polymorphisms of the *TRPV1* and *TRPM8* genes are correlated with each other and negatively correlated with *TRPA*. The results obtained may indicate the coevolution of these genes. It was previously shown that *TRPV1*, as well as *TRPM8*, was detected with high frequency in the Nanai population. It is likely that these two mutations came simultaneously from East Asia and spread throughout Russia, which explains the fact that they are positively correlated with each other.

Keywords: TRPV1 and TRPM8 genes, thermoreceptors, populations, polymorphic variants.

РОЛЬ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ПРЕЭКЛАМПСИИ

© 2024 г. А. А. Бабовская¹*, Е. А. Трифонова¹, В. Н. Сереброва¹, В. А. Степанов¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального
исследовательского медицинского центра, Томск, 634050 Россия

*e-mail: anastasia.babovskaya@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 27.12.2023 г.

После доработки 06.02.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Выявление наследственной основы преэклампсии остается актуальным направлением для медицинской генетики. Несмотря на многочисленные попытки поиска главных предопределяющих факторов, до настоящего времени не сформулировано общепринятых гипотез патогенеза этого осложнения беременности ввиду многофакторной природы рассматриваемой патологии. Одним из прогрессивных подходов к изучению сложных заболеваний является модельный анализ ген-генных взаимодействий, позволяющий выделять из большого массива факторов те сочетания генотипов, которые могут определять высокий или низкий риск предрасположенности в рамках рассматриваемой патологии. В представленной работе анализ межгенных взаимодействий применен для создания модели, прогнозирующей риск тяжелого течения преэклампсии, получены ключевые сочетания генов, предрасполагающие к развитию преэклампсии в русской популяции. Впервые был продемонстрирован прогностический потенциал сочетаний локусов rs3774298 *BCL6* и rs2071045 *LEP* в отношении развития тяжелой формы исследуемой патологии (OR = 2,97). Дополнительно установлено, что полиморфный вариант rs3774298 гена *BCL6* локализуется в функционально активном регионе генома, расположенном в сайте связывания транскрипционного фактора *CTCF*, который может функционировать как активатор транскрипции, так и репрессор, что подчеркивает роль регуляторных систем клетки в механизмах формирования и течения преэклампсии.

Ключевые слова: преэклампсия, SNP×SNP взаимодействия, межгенные взаимодействия, однонуклеотидные полиморфные варианты, плацента.

DOI: 10.31857/S0016675824080081 **EDN:** BFLNHI

Характеристика наследственной природы полигенных заболеваний человека остается актуальным направлением медицинской генетики. Большой интерес обусловлен прежде всего их широким распространением — среди всех наследственных болезней доля многофакторных заболеваний (МФЗ) составляет около 90% всех случаев, что делает их изучение высокосignificantным для общества [1].

Одним из характерных примеров такого заболевания с многофакторной природой является преэклампсия (ПЭ)— тяжелое гестационное осложнение, определяющее около 5% материнской и перинатальной заболеваемости и смертности во всем мире. Преэклампсия — это мультисистемное осложнение течения беременности, характеризующееся наличием артериальной гипертензии с началом протеинурии после 20-й недели беременности, приводящее к маточно-плацентарной дисфункции.

Выявление наследственной основы преэклампсии по-прежнему остается актуальным направлением, существенный вклад в которое также внесли российские научные коллективы, всесторонне изучающие различные группы генов-кандидатов, биологические продукты которых вовлечены в патогенез данного осложнения беременности [2–5]. Так, на сегодняшний день в мире проведен ряд полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) по преэклампсии, выявивших основные гены подверженности заболеванию, часть которых была также успешно реплицирована в качестве кандидатных и на российских выборках [3, 6].

Однако, несмотря на многочисленные попытки поиска главных предопределяющих факторов, до настоящего времени не сформулировано общепринятых гипотез патогенеза этого осложнения беременности. Одной из причин этого является

сочетание ряда факторов, обуславливающих возникновение клинически гетерогенных форм заболевания. Так, например, носительство тех или иных аллельных сочетаний генов может определять тяжесть заболевания, различные клинические проявления, что также осложняет установление единой картины и приводит к возникновению разных этиопатогенетических концепций. В дополнение к классическим методам ассоциативного анализа и анализа блоков сцепления для комплексной оценки все чаще исследователи прибегают к подходам модельного анализа эпистатических взаимодействий генов [1]. Для анализа межгенных взаимодействий было предложено множество методов, большинство из которых основано на моделях статистической регрессии и машинного обучения. Так, широкое распространение получила группа методов, основанных на подходе многофакторного уменьшения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction – MDR). Оригинальный метод MDR был впервые описан Ritchie et al. [7] для экспериментов вида “случай – контроль”. Основная идея метода состоит в том, чтобы уменьшить количество анализируемых параметров путем объединения генотипов ряда SNP в модели с последующим разделением полученных сочетаний на группы высокого и низкого риска для последующего детального анализа роли таких сочетаний в патогенезе заболевания.

Целью настоящего исследования является анализ ген-генных взаимодействий полиморфных вариантов плацентарных генов в контексте детерминации риска развития преэклампсии в русской популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В обследовании приняли участие 298 женщин с физиологической беременностью и 192 женщины с клинически диагностированной преэклампсией разной степени тяжести (умеренная, $n = 114$ и тяжелая, $n = 78$). Настоящая работа продолжает исследования, проводимые в НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, посвященные поиску ассоциаций ряда плацентарных генов с риском развития ПЭ [8], и сконцентрирована на анализе межгенных взаимодействий по 83 локусам изученных ранее 18 плацентарных генов (*SIGLEC6*, *NDRG1*, *RDH13*, *NRIP1*, *LEP*, *BCL6*, *BHLHE40*, *PLIN2*, *CORO2A*, *GPT2*, *CCSAP*, *RDH13*, *SYDE1*, *LRP2BP*, *ZNF175*, *NRIP1*, *LYN*, *RAC2*). Полный перечень изученных в настоящей работе SNP доступен по запросу у автора. Необходимо отметить, что представленные гены в предыдущем исследовании продемонстрировали дифференциальную экспрессию в плацентарной ткани женщин с ПЭ и с физиологическим течением беременности [9]. Кроме того, была показана ассоциация SNP некоторых из этих

локусов с развитием ПЭ [8, 10]. Для моделирования ген-генных взаимодействий использовали программное обеспечение Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) [11]. В программе MDR с помощью многократного перекрестного пересчета вводимых данных выбиралась модель межгенного взаимодействия, позволяющая с наиболее высокой точностью и с наименьшей ошибкой определить повышенный или пониженный риск развития заболевания. Оптимальной считалась модель с воспроизводимостью не менее девяти из десяти тестов кросс-валидации и чувствительностью не менее 70%. Верификацию значимости выявленных комбинаций генотипов с развитием ПЭ в обследованных группах осуществляли по критерию χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ:

Характеристика моделей межгенных взаимодействий полиморфных локусов плацентарных генов

В настоящей работе построение моделей ген-генных взаимодействий однонуклеотидных вариантов генов подверженности ПЭ проводилось в общей группе, а также отдельных подгруппах, как для тяжелой, так и для умеренной степени тяжести. Так, при анализе ген-генных взаимодействий в подгруппе с умеренной формой ПЭ не было установлено достоверно значимых моделей, которые бы прошли проверку в перекрестном тестировании, тогда как для подгруппы с тяжелой формой заболевания была получена одна оптимальная прогностически значимая модель, состоящая из двух локусов (табл. 1). Согласно анализу MDR, выбранная модель включала локусы rs3774298 и rs2071045 генов *BCL6* и *LEP*, обладала чувствительностью 71.8%, точностью предсказания 64.7%, специфичностью 71.5% при коэффициенте перекрестной проверки 9/10 непротиворечивых тестов кросс-валидации ($p < 0.0001$) (табл. 1). Анализ межгенных взаимодействий в когорте всех обследованных женщин определил аналогичное сочетание локусов как оптимальную предсказательную модель, которая, однако, характеризовалась меньшими коэффициентами перекрестной проверки (8/10), точностью предсказания 60.1%, специфичностью 40.6% и большей чувствительностью, что, по-видимому, является следствием увеличения численности тестируемой группы больных против контроля и носит технический характер, поэтому дальнейший анализ будет приведен для модели, полученной в подгруппе с тяжелой степенью ПЭ.

Анализ распределения генотипов в группах больных и здоровых женщин выявил комбинации генотипов повышенного и пониженного риска развития ПЭ. Силу ассоциации выражали в значениях

Таблица 1. Характеристика моделей межгенных взаимодействий исследуемых полиморфных локусов

№	Модель ген-генных взаимодействий	Тренировочная сбалансированная точность (%)	Тестируемая сбалансированная точность (%)	Чувствительность модели (%)	Специфичность модели (%)	Отношение шансов (95% доверительный интервал)	Критерий χ^2 (p -уровень)	Коэффициент кросс-валидации
Модель ген–генных взаимодействий для подгруппы с умеренной степенью тяжести ПЭ								
1	Двухлокусная модель rs1056947 <i>NR1P1</i> , rs2071045 <i>LEP</i>	67.82	52.64	75.44	57.72	4.1927 (2.5829–6.806)	36.2907 ($p < 0.0001$)	2/10
2	Трехлокусная модель rs3774298 <i>BCL6</i> , rs6982669 <i>LYN</i> , rs2071045 <i>LEP</i>	74.75	55.55	74.56	73.15	7.9871 (4.8772–13.08)	78,1918 ($p < 0.0001$)	4/10
3	Четырехлокусная модель rs3774298 <i>BCL6</i> , rs2719229 <i>LYN</i> , rs6982669 <i>LYN</i> , rs2071045 <i>LEP</i>	82.04	58.45	92.98	68.79	29.207 (13.6691–62.4069)	126.0093 ($p < 0.0001$)	4/10
Модель ген–генных взаимодействий для подгруппы с тяжелой степенью тяжести ПЭ								
1	Двухлокусная модель rs3774298 <i>BCL6</i> , rs2071045 <i>LEP</i>	71.84	64.78	71.79	71.48	6.3786 (3.667–11.0954)	49.3871 ($p < 0.0001$)	9/10
2	Трехлокусная модель rs3774298 <i>BCL6</i> , rs2719229 <i>LYN</i> , rs2071045 <i>LEP</i>	79.37	64.05	76.92	79.87	13.2222 (7.271–24.0446)	91.7495 ($p < 0.0001$)	4/10
3	Четырехлокусная модель rs3774298 <i>BCL6</i> , rs113968629 <i>PLIN2</i> , rs2124910 <i>SIGLEC6</i> , rs2071045 <i>LEP</i>	86.5	60.08	88.46	82.55	36.2692 (17.0245–77.2684)	142.8352 ($p < 0.0001$)	3/10
Модель ген–генных взаимодействий для общей группы								
1	Двухлокусная модель rs3774298 <i>BCL6</i> , rs2071045 <i>LEP</i>	67.37	60.14	93.75	40.6	10.2542 (5.4699–19.2233)	69.6866 ($p < 0.0001$)	8/10
2	Трехлокусная модель rs3774298 <i>BCL6</i> , rs6982669 <i>LYN</i> , rs2071045 <i>LEP</i>	74.75	64.8	78.65	70.13	8.6487 (5.6539–13.2298)	111.1852 ($p < 0.0001$)	7/10
3	Четырехлокусная модель rs3774298 <i>BCL6</i> , rs10985257 <i>CORO2A</i> , rs6982669 <i>LYN</i> , rs2071045 <i>LEP</i>	81.33	65.49	76.56	84.23	17.4454 (11.0498–27.5428)	180.424 ($p < 0.0001$)	3/10

Таблица 2. Сочетания генотипов, полученные в рамках двухлокусной модели (rs3774298 *BCL6*, rs2071045 *LEP*)

Комбинации генотипов rs3774298 <i>BCL6</i> , rs2071045 <i>LEP</i>	Группа с тяжелой формой ПЭ ($n = 78$), %	Контрольная группа ($n = 298$), %	Группа предрасположенности (согласно алгоритму MDR)*	Критерий χ^2	p -уровень
CT-CC	0	2.01	0	0.548	0.46
CC-CC	0	0.67	0	0.023	0.879
CC-CT	2.56	4.03	0	0.063	0.803
CT-CT	8.97	11.41	0	0.123	0.727
CT-TT	15.38	19.46	0	0.278	0.599
TT-TT	17.95	16.44	1	0.01	0.921
TT-CT	11.54	7.72	1	0.568	0.452
CC-TT*	8.97	3.02	1	4.783	0.029
TT-CC	1.28	0.36	1	0.02	0.887

Примечание. n — количество индивидов в группе. В таблице не приведены варианты сочетаний, включающих пропуски одного из генотипов; * 0 — группа пониженного риска, 1 — группа повышенного риска.

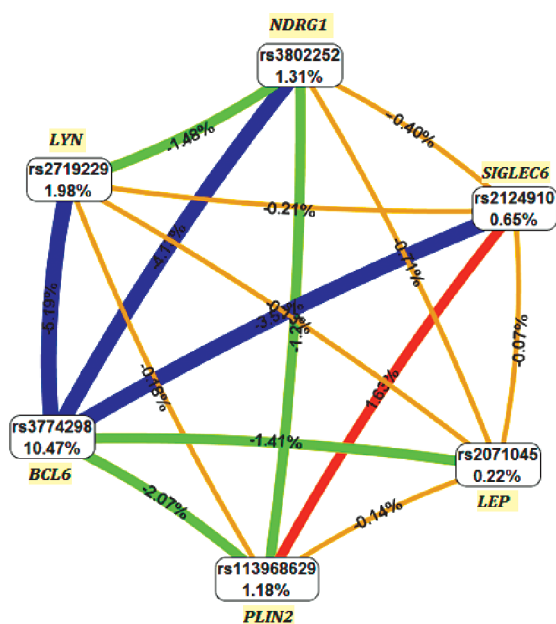


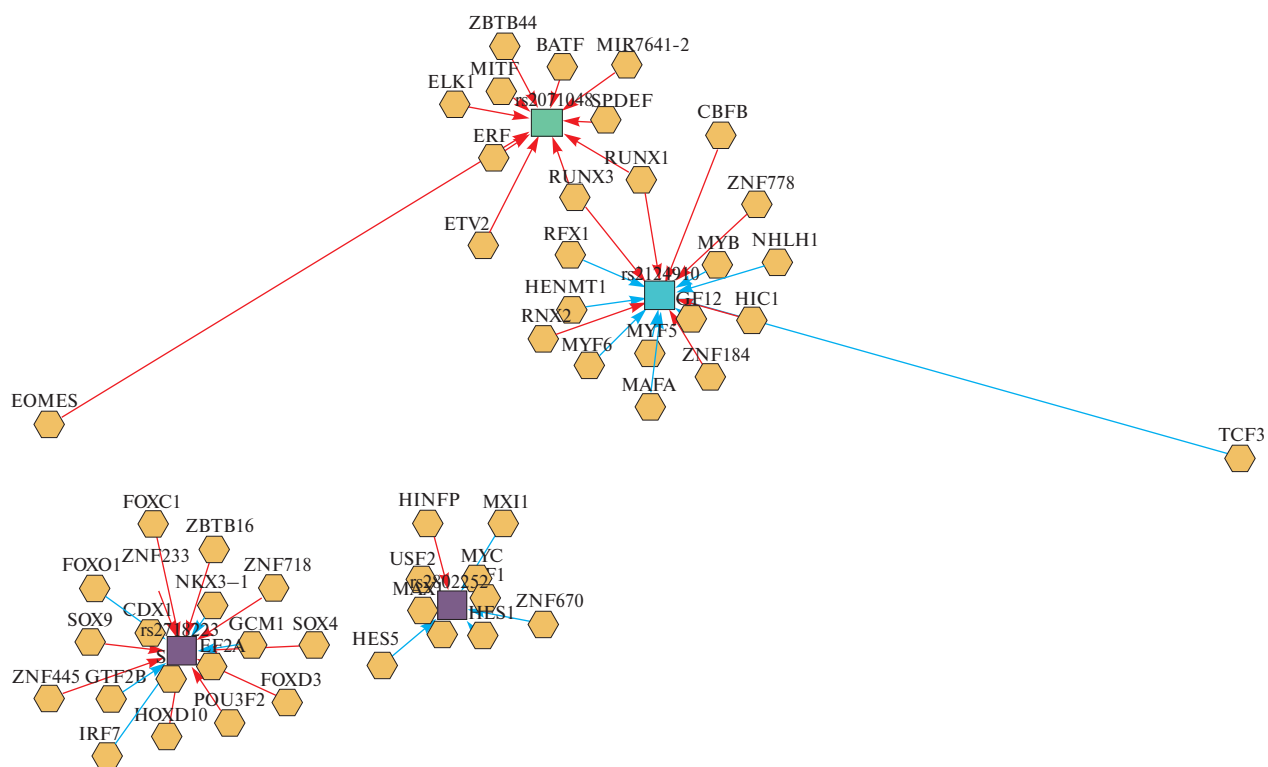
Рис. 1. Радиальный график на основе энтропии (Fruchterman – Rheingold), отражающий межгенные взаимодействия для фенотипа тяжелой формы ПЭ. Значения энтропии в ячейках отдельных факторов (локусов) указывают на основные независимые эффекты, тогда как значения энтропии, отмеченные на линиях, соединяющих два фактора, представляют эффект взаимодействия пары локусов [8]. Характер взаимодействия между генами характеризуется цветом линии: красный — выраженный синергизм, оранжевый — умеренный синергизм, синий и зеленый — антагонизм, коричневый — аддитивное взаимодействие. Сила и направленность взаимодействия выражены в % энтропии.

При этом для данной модели статистическая значимость была показана только для одного сочетания генотипов *CC* варианта rs3774298 гена *BCL6* и *TT* варианта rs2071045 гена *LEP* (табл. 2) при $OR = 2.97$, 95%CI 1.073–8.23. Примечательно, что ранее уже была установлена ассоциация маркера rs2071045 с развитием тяжелой формы ПЭ, но у пациенток якутской популяции [12].

отношения шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (95%CI). Ассоциацию расценивали как отрицательную при $OR < 1$ (“фактор устойчивости”), положительную при $OR > 1$ (“фактор риска”) и отсутствие ассоциации при $OR = 1$. Так, предрасполагающими (группа 1 в табл. 2) для формирования тяжелой формы ПЭ явились сочетания генотипов *TT-TT*, *TT-CT*, *CC-TT**, *TT-CC* генов *BCL6* (rs3774298) и *LEP* (rs2071045) соответственно.

На рис. 1 представлена схема, визуализирующая характер и силу ген-генных взаимодействий для всех вариантов генов, входящих в модели для тяжелой формы ПЭ (без учета коэффициента кросс-валидации). Для построения представленной схемы использовался метод энтропического моделирования. Показатель энтропии (%) указывает силу влияния отдельных генотипов и их сочетаний на реализацию клинического фенотипа,

В рамках рассматриваемой модели также интересно проследить связи между локусами изученных генов. Установлено, что характер взаимодействия между локусами rs3774298 *BCL6* и rs2071045 *LEP* – умеренно антагонистический (–1.41% энтропии). Для полиморфного варианта rs3774298 гена *BCL6* характерен преимущественно антагонистический тип взаимодействий, тогда как вариант rs2071045 гена *LEP* демонстрирует в основном аддитивный характер взаимосвязей с другими генными вариантами, вошедшими в модели (rs3802252 (*NDRG1*), rs2719229 (*LYN*), rs113968629 (*PLIN2*), rs2124910



ГЕНЕТИКА том 60 № 8 2024

(*SIGLEC6*)), построенными для тяжелой формы ПЭ.

*Функциональный анализ генов, входящих
в модели подверженности к преэклампсии*

Для изучения функциональных связей между изучаемыми вариантами шести генов, входящих в модели MDR, дополнительно применяли сетевой анализ в онлайн-ресурсе Polympract (<https://bcglib.cibio.unitn.it/polympract/>). Примечательно, что из пяти изученных SNP (в данном ресурсе не представлено данных для rs3774298 гена *BCL6*) только варианты генов *LEP* и *SIGLEC6* локализованы в сайтах связывания общих факторов транскрипции (рис. 2). Согласно проведенному анализу установлено, что определенные аллельные варианты маркеров rs2124910 и rs2071045 способствуют увеличению показателей связывания RUNX1 и RUNX3, факторов транскрипции, которые известны как гены-супрессоры опухоли и изучались при широком спектре эпителиальных и мезенхимальных новообразований. RUNX1 контролирует молекулярные и клеточные механизмы, опосредующие процессы ангиогенеза, дифференцировки трофобласта и, как следствие, ремоделирование сосудов матки, которые являются важными этапами развития плаценты [9]. RUNX3 играет решающую роль в регуляции инвазии, миграции и пролиферации злокачественных клеток. Также показано, что высокая экспрессия *RUNX3* в пограничных тканях между матерью и плодом способствует процессам инвазии трофобласта и имплантации эмбриона [18, 19]. Поскольку нарушение инвазии клеток трофобласта является ключевым патогенетическим фактором развития ПЭ, вероятно, rs2124910 гена *SIGLEC6* и rs2071045 гена *LEP* могут принимать участие в формировании подверженности ПЭ посредством регуляции сигнальных путей, связанных с транскрипционными факторами RUNX1 и RUNX3. Стоит отметить, что при анализе регуляторного потенциала исследуемых полиморфизмов генов *LEP* и *SIGLEC6* в базах HaploReg v4.2 и RegulomeDB v2.2 интронный вариант rs2071045 не продемонстрировал связи с регуляторными участками генома, тогда как участок rs2124910 является eQTL (ранг 1f) и проявляет функции энхансера транскрипции.

Поскольку имеется мало сведений о ключевой роли изученных нами полиморфных вариантов генов rs3774298 *BCL6* и rs2071045 *LEP* в патогенезе ПЭ, были охарактеризованы сами гены и связанные с ними процессы, нарушение работы которых может приводить к развитию дисфункции эндотелия. Анализ функциональной активности и сетевых взаимодействий генов, образующих лучшую прогностическую модель ПЭ, выявил, что данные гены могут играть значительную роль в молекулярных механизмах рассматриваемой патологии

за счет различных патофизиологических процессов. Многочисленные исследования транскриптома плаценты и его изменений во время беременности у человека показали, что *BCL6* в норме высоко экспрессируется в плаценте, а гиперэкспрессия этого локуса связана с такими заболеваниями как ПЭ и эндометриоз [10, 13, 20]. Ряд исследований показывает, что *BCL6* важен для пролиферации, выживания, дифференцировки, миграции и инвазии клеток трофобласта. Ген *BCL6* высоко экспрессируется в клетках цитотрофобласта в первом триместре [21], и его экспрессия значительно падает во втором триместре [22], что свидетельствует о важности данного гена для роста трофобласта на ранних этапах развития плаценты. Показано, что *BCL6* aberrантно активируется при преэклампсии и эндометриозе за счет различных механизмов, таких как изменения в транскрипции генов и трансляции мРНК, а также посредством посттранскрипционных модификаций [23]. ПЭ характеризуется возникновением ряда процессов, таких как окисление, гипоксия и воспаление, в ответ на которые активируются механизмы реагирования на стресс [24, 25]. Так, активация белков теплового шока HSP90 в ответ на воспаление может приводить к гиперэкспрессии *BCL6*, поскольку HSP90 является основным регулятором, стабилизирующим и активирующим *BCL6* [26–28]. Также экспрессия *BCL6* может проходить опосредованно через белки семейства HSP, активность которых увеличивают провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и IL8 [29]. *BCL6* также может регулироваться за счет посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование митоген-активируемой протеинкиназой (MAPK) и ацетилирование белком, связывающим цАМФ, которые, как сообщается, нарушаются при ПЭ [30, 31].

В свою очередь, лептин важен для функционирования различных системных процессов, играя роль в метаболизме липидов, чувствительности к инсулину, ангиогенезе, росте костей и хрящей, иммунитете, воспалительной реакции, начале полового созревания, фертильности, репродуктивной функции, развитии плаценты, беременности, а также во внутриутробном развитии плода [32]. Лептин имеет решающее значение для развития и функционирования плаценты. Он регулирует образование бластоцисты и играет критическую роль в имплантации и плацентации, где за его счет происходят индукция выработки хорионического гонадотропина человека в клетках трофобласта и модуляция пролиферации, синтеза белка, инвазии и апоптоза в плацентарных клетках [33, 34]. Лептин, помимо его роли в метаболических процессах организма, в высоких концентрациях способен вызывать окислительное повреждение эндотелиоцитов и отложение солей кальция в сосудистой стенке.

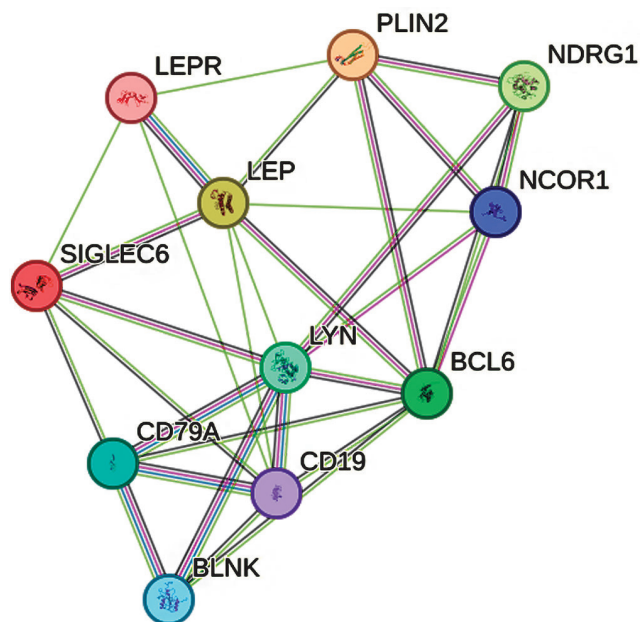


Рис. 3. Сеть белок-белковых взаимодействий генов, ассоциированных с развитием ПЭ у русских. Белки представлены на рисунке в виде кругов, цвет линии между которыми указывает на категорию доказательства белок-белковых взаимодействий: желтый — литературные данные (“text mining”), черный — согласно анализу коэкспрессии генов, фиолетовый — результаты экспериментальных работ, голубой — свидетельства, полученные из баз данных, розовый — совокупные доказательства.

Эти изменения приводят к нарушению структуры сосудистой стенки, снижению ее эластичности и могут способствовать развитию атеросклероза. За счет сужения кровеносных сосудов нарушается их способность расслабляться, что приводит к эндотелиальной дисфункции. Кроме того, лептин можно отнести к семейству провоспалительных цитокинов за счет его участия в созревании Т-лимфоцитов, поддержании пула НК-клеток, хемоаттракции и активации нейтрофилов, которые являются основными эффекторными клетками в децидуальной оболочке.

Несмотря на большое количество сообщений о роли вышеобозначенных генов в патогенетике ПЭ, взаимодействие этих генов впервые обнаружено в настоящей работе. Интересным представляется, что в экспериментах не доказана прямая связь белковых продуктов генов *BCL6* и *LEP*, однако при моделировании состояния гипоксии и ишемии в сочетании с гиперэкспрессией *BCL6* на клеточной культуре трофобласта BeWo было зафиксировано изменение уровней экспрессии 11 генов, в частности значительное увеличение экспрессии *LEP* и *FLT1* по сравнению с нормоксическим контролем [35]. Согласно онлайн-базе

STRING DB (рис. 3), взаимодействие белков данных генов осуществляется также и опосредованно через киназу LYN, роль которой в патогенезе ПЭ не установлена, хотя и есть сообщения о ее возможной кандидатной способности в отношении этого осложнения беременности [36–38], а также транскрипционный фактор, кодируемый геном *NCOR1*, функционирующий преимущественно как репрессор, для которого показана ассоциация с развитием гиперплазии эндометрия [39]. Также известно, что работа NCOR1 регулируется молекулами экзосомной микроРНК miRNA-199a-5p, для которой была установлена гиперэкспрессия в случаях тяжелой формы ПЭ [40–42]. За последние 10 лет накопилось много данных о роли микроРНК в механизмах развития ПЭ. Изменение уровня экспрессии микроРНК обнаружено как для легкой, так и для тяжелой формы ПЭ. В основном эти молекулы регулируют работу генов, связанных с сигнальными путями, задействованными в процессах иммунной защиты, ангиогенеза, пролиферации и инвазии трофобласта — фундаментальных процессах развития плаценты [43, 44]. Примечательно, что в настоящей работе обращает на себя внимание значительное участие факторов транскрипции и молекул микроРНК при анализе полиморфных маркеров генов, продемонстрировавших потенциал в прогнозировании тяжелой формы ПЭ в мультилокусном анализе генных взаимодействий. Вероятно, этот факт указывает на большое значение транскрипционных и посттранскрипционных регуляторных систем клеток в молекулярных механизмах ПЭ.

Проведенный анализ межгенных взаимодействий позволил выявить ключевые сочетания генов, предрасполагающие к развитию преэклампсии в русской популяции. Так, сочетание локусов rs3774298 *BCL6* и rs2071045 *LEP* впервые в настоящем исследовании было определено как наилучшая прогностическая модель для тяжелой формы преэклампсии (OR = 2,97). Следует отметить, что, несмотря на отношение шансов, данная модель не показала валидности при тестировании ее на выборке женщин с умеренной степенью тяжести преэклампсии, что снижает ее прогностический потенциал в диагностике. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что основополагающими в развитии умеренной формы заболевания являются другие сочетания генов, не вошедшие в исследование; также это может демонстрировать, что межгенные взаимодействия обуславливают преимущественно тяжелое течение заболевания, тогда как развитие умеренной ПЭ связано с рядом иных факторов, не включающих генные взаимосвязи. Анализ функциональной активности генов *BCL6* и *LEP* позволил установить, что они, участвуя в различных патофизиологических процессах, имеют решающее значение в

развитии плаценты, осуществлении физиологических механизмов в эндометрии, а нарушения в регуляции и активности данных генов тесно связаны с патогенезом ПЭ, эндометриоза и рядом других гестационных осложнений [23]. Полученные нами результаты также указывают на значительную роль транскрипционных и посттранскрипционных регуляторных систем клеток в молекулярных механизмах подверженности ПЭ. Так, согласно HaploReg v4.2 участок rs3774298 гена *BCL6* находится в сайте связывания транскрипционного фактора CTCF и выполняет функции энхансера или промотора транскрипции. Анализ генов в Polympact установил, что rs2124910 гена *SIGLEC6* и rs2071045 гена *LEP* локализованы в сайтах связывания общих факторов транскрипции RUNX1 и RUNX3 и могут принимать участие в формировании подверженности ПЭ посредством регуляции сигнальных путей, связанных с ними. Приведенные данные подчеркивают, что роль генетических факторов в развитии ПЭ является сложной и малоизученной и необходимы дальнейшие исследования в этом направлении с привлечением независимых выборок для сравнения и подтверждения выявленных в работе связей и закономерностей, а также для уточнения механизмов, с помощью которых идентифицированные гены могут влиять на возникновение и течение преэклампсии.

Исследование выполнено за счет средств Государственного задания по теме ФНИ № 122020200083-8.

Настоящее исследование прошло экспертизу комитета по биомедицинской этике Научно-исследовательского института медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр» (протокол № 4 от 25.11.2019).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам Институционального 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. Все обследованные — совершеннолетние.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Lvovs D., Фаворова О.О., Фаворов А.В.* Полигенный подход к исследованиям полигенных заболеваний // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 3. С. 62–75.
2. *Абрамова М.Ю.* Генетические маркеры тяжелого течения преэклампсии // *Науч. рез. биомед. исследований*. 2022. Т. 8. № 3. С. 305–316.
3. *Абрамова М.Ю., Пономаренко И.В., Орлова В.С. и др.* Полиморфный локус rs1799945 гена HFE определяет риск развития тяжелого течения преэклампсии // *Гинекология*. 2023. Т. 25. № 2. С. 234–238. <https://doi.org/10.26442/20795696.2023.2.202062>.
4. *Решетников Е.А.* Полиморфизм rs34845949 гена SASH1 ассоциирован с риском развития преэклампсии // *Науч. рез. биомед. исследований*. 2021. Т. 7. № 1. С. 44–55. <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-7-1-0-4>
5. *Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А.* Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *CORO2A* в формировании наследственной предрасположенности к преэклампсии у русских и якутов // *Науч. рез. биомед. исследований*. 2018. Т. 4. № 3. С. 38–48.
6. *Абрамова М.Ю., Чурносоев М.И.* Генетические исследования преэклампсии // *Рос. вестник акушера-гинеколога*. 2022. Т. 22. № 6. С. 27–34. <https://doi.org/10.17116/rosakush20222206127>
7. *Ritchie M.D., Hahn L.W., Roodi N. et al.* Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 69. № 1. P. 138–147. <https://doi.org/10.1086/321276>
8. *Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Габидулина Т.В. и др.* Выявление новых маркеров предрасположенности к преэклампсии путем анализа регуляторных участков генов, дифференциально экспрессирующихся в плацентарной ткани // *Мол. биология*. 2016. Т. 50. № 5. С. 870–879. <https://doi.org/10.7868/S0026898416050165>
9. *Трифопова Е.А., Габидулина Т.В., Ершов Н.И. и др.* Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). 2014. Т. 6. № 2(21). С. 77–90. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-2-71-83>
10. *Trifonova E.A., Gabidulina T., Serebrova V.N., Stepanov V.A.* Association study of differentially expressed genes regulatory SNPs and preeclampsia: Results of a pilot study in Russia // *Europ. J. Hum. Genet.* 2015. V. 23. № S1. P. 69.
11. *Motsinger A.A., Ritchie M.D.* Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies // *Human Genomics*. 2006. V. 2. № 5. P. 318–328. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-2-5-318>
12. *Ворожжищева А.Ю.* Генетические факторы развития преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск: 2014. 24 с.

13. *Hu T., Sinnott-Armstrong N.A., Kiralis J.W. et al.* Characterizing genetic interactions in human disease association studies using statistical epistasis networks // *BMC bioinformatics*. 2011. V. 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-364>
14. *Pośpiech E., Ligęza J., Wilk W. et al.* Variants of *SCARB1* and *VDR* involved in complex genetic interactions may be implicated in the genetic susceptibility to clear cell renal cell carcinoma // *BioMed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/860405>
15. *Kim S., Yu N.K., Kaang B.K.* CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression // *Experim. Mol. Medicine*. 2015. V. 47. e166. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.33>
16. *Jeong D.S., Kim M.H., Lee J.Y.* Depletion of CTCF disrupts PSG gene expression in the human trophoblast cell line Swan 71 // *FEBS Open Bio*. 2021. V. 11. № 3. P. 804–812. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13087>
17. *Chen Q., Jiang S., Liu H. et al.* Association of lncRNA SH3PXD2A-AS1 with preeclampsia and its function in invasion and migration of placental trophoblast cells // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. № 7. P. 583. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02796-0>
18. *Kannan A., Beal J.R., Neff A.M. et al.* Runx1 regulates critical factors that control uterine angiogenesis and trophoblast differentiation during placental development // *PNAS Nexus*. 2023. V. 2. № 7. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad215>
19. *Sakuma A., Fukamachi H., Ito K., et al.* Loss of Runx3 affects ovulation and estrogen-induced endometrial cell proliferation in female mice // *Mol. Reprod. Dev.* 2008. V. 75. P. 1653–1661.
20. *Enquobahrie D.A., Meller M., Rice K. et al.* Differential placental gene expression in preeclampsia // *Am. J. Obstetrics and Gynecology*. 2008. V. 199. № 5. P. 566.e1. – 566.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.04.020>
21. *Ritter A., Roth S., Kreis N.N. et al.* Primary cilia in trophoblastic cells: Potential involvement in preeclampsia // *Hypertension*. 2020. V. 76. № 5. P. 1491–1505. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15433>
22. *Prater M., Hamilton R.S., Wa Yung H. et al.* RNA-Seq reveals changes in human placental metabolism, transport and endocrinology across the first-second trimester transition // *Biol. Open*. 2021. V. 10. № 6. P. bio058222.
23. *Louwen F., Kreis N.N., Ritter A. et al.* BCL6, a key oncogene, in the placenta, pre-eclampsia and endometriosis // *Hum. Reprod. Update*. 2022. V. 28. № 6. P. 890–909. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac027>
24. *Phan R.T., Saito M., Kitagawa Y. et al.* Genotoxic stress regulates expression of the proto-oncogene Bcl6 in germinal center B cells // *Nat. Immunol.* 2007. V. 8. № 10. P. 1132–1139. <https://doi.org/10.1038/ni1508>
25. *Fernando T.M., Marullo R., PeraGresely B. et al.* BCL6 evolved to enable stress tolerance in vertebrates and is broadly required by cancer cells to adapt to stress // *Cancer Discov.* 2019. V. 9. № 5. P. 662–679. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1444>
26. *Cardenas M.G., Oswald E., Yu W. et al.* The expanding role of the BCL6 oncoprotein as a cancer therapeutic target // *Clin. Cancer Res.* 2017. V. 23. P. 885–893.
27. *Padmini E., Uthra V., Lavanya S.* Effect of HSP70 and 90 in modulation of JNK, ERK expression in preeclamptic placental endothelial cell // *Cell Biochem. Biophys.* 2012. V. 64. P. 187–195.
28. *Ren Z., Gao Y., Gao Y. et al.* Distinct placental molecular processes associated with early-onset and late-onset preeclampsia // *Theranostics*. 2021. V. 11. P. 5028–5044.
29. *Jee B., Dhar R., Singh S., Karmakar S.* Heat shock proteins and their role in pregnancy: Redefining the function of “Old Rum in a New Bottle” // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 648463.
30. *Qi H., Yao C., Xing J., Qin Y.* Hypoxia-induced GPR4 suppresses trophoblast cell migration and proliferation through the MAPK signaling pathway // *Reprod. Toxicol.* 2021. V. 99. P. 1–8.
31. *Sadeghi H., Esmkhani S., Pirjani R. et al.* CREB-binding protein (CREBBP) and preeclampsia: A new promising target gene // *Mol. Biol. Rep.* 2021. V. 48. P. 2117–2122.
32. *DeKnegt V.E., Hedley P.L., Kanters J.K. et al.* The role of leptin in fetal growth during pre-eclampsia // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 9. <https://doi.org/10.3390/ijms22094569>
33. *Pérez-Pérez A., Toro A., Vilariño-García T. et al.* Leptin action in normal and pathological pregnancies // *J. Cell. Mol. Med.* 2017. V. 22. P. 716–727. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13369>
34. *Schanton M., Maymó J.L., Pérez-Pérez A. et al.* Involvement of leptin in the molecular physiology of the placenta // *Reproduction*. 2018. V. 155. P. R1–R12. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0512>
35. *Than N.G., Romero R., Tarca A.L. et al.* Integrated systems biology approach identifies novel maternal and placental pathways of pre-eclampsia // *Front. Immunology*. 2018. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01661>
36. *Tejera E., Bernardes J., Rebelo I.* Preeclampsia: A bioinformatics approach through protein–protein interaction networks analysis // *BMC Syst. Biology*. 2012. V. 6. P. 97. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-97>
37. *Kaartokallio T., Cervera A., Kyllönen A. et al.* Gene expression profiling of preeclamptic placentae by RNA sequencing // *Sci. Reports*. 2015. V. 5. <https://doi.org/10.1038/srep14107>

38. *Tejera E., Bernardes J., Rebelo I.* Co-expression network analysis and genetic algorithms for gene prioritization in preeclampsia // *BMC Med. Genomics*. 2013. V. 6. P. 51.
<https://doi.org/10.1186/1755-8794-6-51>
39. *Kashima H., Horiuchi A., Uchikawa J. et al.* Up-regulation of nuclear receptor corepressor (NCoR) in progesterone-induced growth suppression of endometrial hyperplasia and carcinoma // *Anticancer Res*. 2009. V. 29. № 4. P. 1023–1029.
40. *Maldonado E., Morales-Pison S., Urbina F. et al.* Role of the mediator complex and microRNAs in breast cancer etiology // *Genes*. 2022. V. 13. № 2. P. 234.
<https://doi.org/10.3390/genes13020234>
41. *Chen Z., Wu M., Huang H. et al.* Plasma exosomal miR-199a-5p derived from preeclampsia with severe features impairs endothelial cell function via targeting SIRT1 // *Reproductive Sci*. 2022. V. 29. № 12. P. 3413–3424.
<https://doi.org/10.1007/s43032-022-00977-0>
42. *Mei Z., Huang B., Zhang Y. et al.* Histone deacetylase 6 negatively regulated microRNA-199a-5p induces the occurrence of preeclampsia by targeting VEGFA in vitro // *Biomed. & Pharmacotherapy*. 2019. V. 114.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108805>
43. *Ning W., Wu B., Chen Y. et al.* Role of microRNAs regulating trophoblast cell function in the pathogenesis of preeclampsia (Review) // *Experim. and Therapeutic Med*. 2022. V. 25. № 1. P. 50.
<https://doi.org/10.3892/etm.2022.11749>
44. *Laganà A.S., Vitale S.G., Sapia F. et al.* miRNA expression for early diagnosis of preeclampsia onset: hope or hype? // *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine*. 2018. V. 31. № 6. P. 817–821.
<https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1296426>

The Role of Gene-Gene Interactions in the Formation of Predisposition to Preeclampsia

A. A. Babovskaya¹, *, E. A. Trifonova¹, V. N. Serebrova¹, V. A. Stepanov¹

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center
of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia
*e-mail: anastasia.babovskaya@medgenetics.ru

Identification of the hereditary basis of preeclampsia remains a relevant area for medical genetics. Despite numerous attempts to search for the main predetermining factors due to the multifactorial nature of the preeclampsia no generally accepted hypotheses for the pathogenesis of this pregnancy complication. One of the progressive approaches to the study of complex diseases is a analysis of gene-gene interactions which makes it possible to isolate from a large array of combinations factors that can determine a high or low risk of predisposition within the pathology under consideration. In the presented work the analysis of gene-gene interactions was used to create a model that predicts the risk of severe preeclampsia and find key combinations of genes predisposing to the development of preeclampsia in the Russian population were obtained. For the first time was demonstrated the prognostic potential of combinations of the rs3774298 *BCL6* and rs2071045 *LEP* loci in the development of a severe form of preeclampsia (OR = 2.97). Additionally it was found that the rs3774298 polymorphic variant of the *BCL6* gene is localized in a functionally active region of the genome, located in the binding site of the transcription factor CTCF, which can function as both a transcription activator and a repressor. That emphasizes the role of cell regulatory systems in the mechanisms of the formation and course of preeclampsia.

Keywords: preeclampsia, SNP×SNP interactions, gene-gene interactions, single nucleotide polymorphisms, placenta.

СХОДСТВО СПЕКТРОВ НУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА, РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ ЧЕРЕЗ ОДНО И МНОГИЕ ПОКОЛЕНИЯ

© 2024 г. Б. А. Малярчук¹, *

¹ Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Магадан, 685000 Россия

*e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

Поступила в редакцию 22.01.2024 г.

После доработки 19.02.2024 г.

Принята к публикации 13.03.2024 г.

С помощью филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей целых митохондриальных геномов (мтДНК), позволяющего исследовать генетические изменения на протяжении многих поколений, реконструирован спектр нуклеотидных замен (по L-цепи мтДНК) в популяциях Европы. Также проанализированы спектры нуклеотидных замен мтДНК, наблюдаемых в состоянии гетероплазмии (на уровне $\geq 1\%$ и $\geq 5\%$) у детей первого поколения. Обнаружено, что спектры нуклеотидных замен, реконструированных через одно и многие поколения, практически не различаются по основным параметрам: по распределению пиримидиновых и пуриновых замен (с преобладанием транзиций T>C), соотношению числа транзиций и трансверсий. Анализ филогенетического дерева гаплотипов мтДНК у европейцев отчетливо выявил влияние отрицательного (очищающего) отбора на митохондриальный генофонд. Предполагается, что селективные процессы, направляющие эволюцию мтДНК в одном и многих поколениях, имеют сходный характер, то есть обусловлены отрицательным отбором. Обсуждается проблема появления и распространения мутаций в митохондриях клеток зародышевой линии.

Ключевые слова: митохондриальный геном, нуклеотидные замены, гетероплазмия, популяции человека, зародышевая линия.

DOI: 10.31857/S0016675824080092 EDN: BFKIGS

Митохондриальный геном человека представлен кольцевыми молекулами ДНК (мтДНК) длиной примерно 16569 пар нуклеотидов. В отличие от аутосомных участков, молекулы мтДНК присутствуют в сотнях и тысячах копий на клетку и наследуются строго по материнской линии [1]. Матричный характер наследования мтДНК и отсутствие рекомбинации между молекулами приводят к эволюции митохондриальных геномов посредством последовательного накопления мутаций из поколения в поколение и к стохастическому распределению мутантных форм мтДНК в процессе клеточных делений [1, 2]. В связи с этим мтДНК представляет собой достаточно простую генетическую систему для изучения макро- и микроэволюционных процессов, а в случае популяций человека — для исследования демографической истории и биомедицинских аспектов, связанных с дифференциацией населения по мере расселения на планете.

Основным проявлением мутационного процесса в митохондриальных геномах является

гетероплазмия мтДНК, т. е. гетерогенность молекул ДНК в митохондриях. В состоянии гетероплазмии молекулы мтДНК различаются по одному или более нуклеотидным основаниям и формируют, тем самым мажорные и минорные (мутантные) гаплотипы мтДНК. Более ранние исследования изменчивости мтДНК, выполненные с помощью метода дидезоксисеквенирования ДНК (секвенирование по Сэнгеру), показали, что гетероплазмия встречается довольно редко: в популяциях человека частота индивидуумов с гетероплазмией составляла примерно 1–2% [3, 4]. При этом выявление минорного варианта полиморфизма возможно на уровне 10–20% и выше [5, 6]. Однако применение высокопроизводительных технологий массового параллельного секвенирования ДНК (МПС) показало, что гетероплазмия мтДНК распространена намного чаще. Так, например, при исследовании препаратов мтДНК, полученных из цельной крови, в выборке из 1526 пар матерей и их детей примерно 45% индивидуумов характеризовались гетерогенностью молекул мтДНК — с гетероплазмией

оснований, наблюдаемой на уровне 1% и выше [7]. В популяционных исследованиях, выполненных с помощью МПС, гетероплазмия мтДНК выявлена у 25–30% исследованных индивидуумов, характеризовавшихся минорными основаниями на уровне 5% и выше [5, 8].

Согласно современным представлениям эволюция мтДНК начинается с мутации в одной из молекул мтДНК клеток зародышевой линии, появления состояния гетероплазмии в митохондриях и последующей сегрегации молекул мтДНК на две (иногда более чем две) гомогенные линии [9–11]. Сегрегация мтДНК, приводящая к гомоплазмии, ускоряется с помощью механизма “бутылочного горлышка”, резко снижающего количество молекул мтДНК в первичных (примордиальных) зародышевых клетках [10]. В результате этого пропорции молекул мтДНК дикого и мутантного типов случайно сдвигаются вплоть до гомоплазмии каждого из типов молекул.

Исследования полиморфизма мтДНК в популяциях человека практически не учитывали влияние гетероплазмии на мутационные спектры, поскольку большая часть популяционных данных получена с помощью метода дидезоксисеквенирования ДНК, позволяющего выявлять лишь небольшие фракции минорных вариантов полиморфизма. Таким образом, межпопуляционные различия основываются на результатах распределения “мажорных” гаплотипов мтДНК, присутствующих в митохондриях с наиболее высокими частотами. Для реконструкции спектров нуклеотидных замен мтДНК для популяционных данных применяются методы филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей мтДНК, позволяющие проследить, как в процессе эволюции происходили генетические изменения (нуклеотидные замены, делеции и инсерции нуклеотидов) митохондриальных геномов в направлении от предков к потомкам. Результаты этих исследований показали, что в мутационных спектрах мтДНК наблюдаются преимущественно транзиции, а среди них пиримидиновые замены преобладают над пуриновыми (если вести учет мутаций по L-цепи мтДНК). Самыми частыми в различных этногеографических группах человека являются замены Т>С [12, 13]. Обнаружено также отсутствие различий в распределении мутаций мтДНК у населения высокогорных и негорных районов [13], хотя ожидалось, что спектры нуклеотидных замен мтДНК в норме и при гипоксии должны различаться — особенно по частоте транзиций Т>С, которые предположительно более всего чувствительны к уровню окислительного стресса в митохондриях [14].

Отмеченные выше особенности мутационных спектров мтДНК обнаружены с помощью филогенетического анализа нуклеотидных замен, насчитываемых по материнской линии из поколения в

поколение в очень широком временном интервале, вполне достаточном для выявления генетических эффектов, связанных с адаптацией популяций к различным условиям проживания и отбором. Между тем первичным источником мутаций мтДНК являются те генетические изменения, которые происходят в митохондриальных геномах клеток зародышевой линии и сохраняются в состоянии гетероплазмии у матерей и их детей. Поэтому представляется важным вопрос о том, насколько совпадают спектры нуклеотидных замен, наблюдаемых в состоянии гетероплазмии у первого поколения, и спектры унаследованных в череде поколений мутаций, реконструированных с помощью филогенетического анализа популяционных данных об изменчивости мтДНК. Рассмотрение этого вопроса является целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализировано распределение нуклеотидных замен в митохондриальных геномах 649 индивидуумов, характеризующихся гетероплазмией мтДНК на уровне от 1% и выше, по результатам исследования 1526 пар матерей и их детей [7]. Для анализа сформированы выборки нуклеотидных замен, унаследованных в состоянии гетероплазмии от матерей к их детям (категория “inherited” согласно работе [7]; 416 замен), и мутаций, возникших у детей и выявленных у них в состоянии гетероплазмии (категория “de novo” согласно работе [7]; 477 замен).

Поскольку по сведениям проекта Национального института исследования здоровья Великобритании (NIHR) [15] указанные выше данные были получены для индивидуумов преимущественно европейского происхождения (более 80% в общей выборке), то для сравнительного анализа нами реконструирован с помощью филогенетического анализа спектр нуклеотидных замен мтДНК у населения Европы. Для этого были использованы представленные в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) нуклеотидные последовательности целых митохондриальных геномов у русских ($N = 377$), поляков ($N = 96$), чехов ($N = 102$), венгров ($N = 78$), сербов ($N = 163$), басков ($N = 176$), датчан ($N = 174$) (всего 1166 митохондриальных геномов). Для филогенетического анализа применяли метод максимальной экономии, реализованный в пакете компьютерных программ mtPhyl v4.015 (<https://sites.google.com/site/mtphyl/home>). Порядок появления нуклеотидных замен на филогенетическом древе мтДНК регистрировали в направлении от предков к потомкам. Статистическую значимость различий между частотами нуклеотидных замен в популяциях оценивали с помощью двустороннего варианта точного теста

Фишера. Все спектры нуклеотидных замен реконструировали относительно L-цепей мтДНК.

Для оценки действия отбора на изменчивость мтДНК исследовали распределение несинонимичных (NS) и синонимичных мутаций (S) в группах замен, ассоциированных с гаплогруппами (H), и частных (P) замен в концевых ветвях филогенетического дерева согласно методологии, предложенной в работе [16]. Анализ основывается на сравнении значений соотношений NS/S в группах H и P с помощью точного теста Фишера. Индекс нейтральности NI определяли соотношением $(NS/S)_P / (NS/S)_H$. Предполагается, что в отсутствии отбора индекс нейтральности NI имеет значения, близкие к 1.0; при $NI > 1.0$ ожидается действие отрицательного (очищающего) отбора, при $NI < 1.0$ ожидается действие положительного отбора.

Для сравнительного анализа использованы также реконструированные ранее спектры нуклеотидных замен целых митохондриальных геномов населения Евразии: Северо-Восточной Сибири (эскимосы, алеуты, чукчи, коряки и юкагиры; $N = 336$), Южной Сибири и прилегающих территорий Северо-Восточного Китая (буряты, баргуты и хамнигане; $N = 430$), Западной Азии (персы, кашкайцы и ливанцы; $N = 340$) [12], а также у коренных народов Памира ($N = 202$) и Тибета ($N = 268$) [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа спектров нуклеотидных замен митохондриальных геномов, реконструированных с помощью филогенетического анализа у населения Европы в сравнении с другими регионами Евразии, показали примерно одинаковую распространенность транзиций и трансверсий в различных популяциях (табл. 1). Соотношение транзиций к трансверсиям в региональных группах варьирует от 23.5 : 1 в южносибирской группе до 27.8 : 1 в тибетской; у европейцев оно зарегистрировано на промежуточном уровне 24.7 : 1.

Во всех региональных спектрах мтДНК преобладают пиримидиновые транзиции из них — замены $T > C$, составляющие среди всех нуклеотидных замен, в среднем примерно 33.4%. Следующими по распространенности в большинстве региональных групп располагаются замены $A > G$, а в памирской и северо-восточноазиатской группах — замены $G > A$. Из трансверсий во всех популяциях преобладают замены $C > A$, кроме тибетской, где чаще замены $A > C$ (табл. 1). Тем не менее в целом по распределению частот нуклеотидных замен в спектрах мтДНК исследованные группы населения статистически значимо не различаются ($P > 0.1$, точный тест Фишера).

В исследовании спектров нуклеотидных замен, наблюдаемых в состоянии гетероплазмии на

Таблица 1. Спектры филогенетически реконструированных нуклеотидных замен мтДНК (по L-цепи) в различных популяциях человека

Нуклеотидные замены	Европа ($N = 1166$)	Западная Азия ($N = 340$)	Южная Сибирь ($N = 430$)	Северо-Восточная Сибирь ($N = 336$)	Памир ($N = 202$)	Тибет ($N = 268$)
$T > C$	33.6 (1187)	33.8 (647)	32.3 (404)	33.5 (106)	34.5 (308)	33.0 (356)
$C > T$	20.3 (723)	20.3 (388)	20.2 (252)	19.0 (60)	19.9 (178)	18.2 (196)
$A > G$	22.1 (787)	21.5 (412)	22.3 (278)	19.6 (62)	19.1 (171)	24.1 (260)
$G > A$	20.2 (718)	20.4 (391)	21.1 (264)	24.4 (77)	23.0 (206)	21.2 (229)
$C > A$	1.4 (51)	1.3 (25)	1.4 (18)	0.95 (3)	1.0 (9)	0.65 (7)
$A > C$	0.7 (25)	0.52 (10)	0.32 (4)	0.63 (2)	0.45 (4)	1.0 (11)
$T > A$	0.17 (6)	0.36 (7)	0.56 (7)	0.32 (1)	0.34 (3)	0.46 (5)
$A > T$	0.62 (22)	0.68 (13)	0.64 (8)	0.63 (2)	0.67 (6)	0.65 (7)
$G > C$	0.2 (7)	0.31 (6)	0.48 (6)	0.63 (2)	0.45 (4)	0.46 (5)
$C > G$	0.28 (10)	0.16 (3)	0.16 (2)	0	0.22 (2)	0.09 (1)
$T > G$	0.39 (14)	0.31 (6)	0.24 (3)	0.32 (1)	0.22 (2)	0.09 (1)
$G > T$	0.08 (3)	0.42 (8)	0.24 (3)	0	0.11 (1)	0.09 (1)
Всего замен	3553	1916	1249	316	894	1079

Примечание. N — размер выборки. Частоты нуклеотидных замен приводятся в процентах, в скобках указано количество нуклеотидных замен. Данные для населения Западной Азии, Южной и Северо-Восточной Сибири приводятся по работе [12], для коренных народов Памира и Тибета — по данным работы [13].

уровне от 1% и выше у первого поколения, использованы данные о полиморфизме мтДНК в парах матерей и их детей по данным [7]. Проанализированы выборки унаследованных детьми нуклеотидных замен в состоянии гетероплазмии (категория “inherited”) и замен, возникших у детей (категория “de novo”). Для анализа эти выборки объединены в одну, так как у детей замены мтДНК унаследованы от матерей (через ооциты), а также возникли на эмбриональной стадии и позже (табл. 2). Поскольку в работе [7] использована платформа МПС, предназначенная для секвенирования коротких участков ДНК (секвенатор Illumina HiSeq 2500), то существует опасность загрязнения участков мтДНК последовательностями ядерных копий митохондриального генома. Для снижения такого риска рекомендуется повысить уровень регистрации минорных оснований в гетероплазмических смесях до 5% и выше; это позволяет избавиться от низкочастотных мутаций, в том числе исходящих от ядерных копий мтДНК [17]. Таким образом, в табл. 2 показано распределение нуклеотидных замен и для спектра мутаций, наблюдаемых в состоянии гетероплазмии на уровне 5% и выше.

Результаты сравнительного анализа показывают, что оба мутационных спектра характеризуются преобладанием пиримидиновых транзиций, и среди них замен Т>С (табл. 2). Статистически

Таблица 2. Спектры нуклеотидных замен мтДНК, наблюдаемых в состоянии гетероплазмии у первого поколения (по L-цепи)

Нуклеотидные замены	Гетероплазмия на уровне 1% и выше	Гетероплазмия на уровне 5% и выше
Т>С	34.8 (311)	35.3 (177)
С>Т	13.5 (121)	18.5 (93)
А>Г	21.9 (196)	20.5 (103)
Г>А	23.5 (210)	21.9 (110)
С>А	0.67 (6)	0.4 (2)
А>С	2.5 (22)	0.2 (1)
Т>А	0.67 (6)	0.8 (4)
А>Т	0.78 (7)	0.8 (4)
Г>С	0.56 (5)	0.8 (4)
С>Г	0.34 (3)	0.2 (1)
Т>Г	0.67 (6)	0.6 (3)
Г>Т	0	0
Всего замен	893	502

Примечание. Частоты нуклеотидных замен приводятся в процентах, в скобках указано количество нуклеотидных замен.

значимые различия выявляются только по частоте транзиции С>Т ($P = 0.016$) и трансверсии А>С ($P = 6.7 \times 10^{-4}$). В целом исследуемые спектры нуклеотидных замен различаются (хотя и не достоверно) по частоте трансверсий: 1%-й спектр содержит больше трансверсий, чем 5%-й (6.2 против 3.8%). Сравнение филогенетически реконструированного мутационного спектра митохондриальных геномов европейцев со спектрами замен мтДНК в состоянии гетероплазмии показало, что первый спектр существенно больше отличается от второго (1%-го), чем от третьего (5%-го). Филогенетический спектр мтДНК отличается от спектра для гетероплазмии на уровне 1% и выше по частоте транзиций С>Т и Г>А ($P = 2 \times 10^{-6}$ и 0.034 соответственно) и трансверсий А>С и Т>А ($P = 5.6 \times 10^{-5}$ и 0.02 соответственно), а от спектра для гетероплазмии на уровне 5% и выше только по одной замене — трансверсии Т>А ($P = 0.026$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о сходстве спектров распределения нуклеотидных замен, реконструированных с помощью филогенетического анализа популяционных данных об изменчивости мтДНК, и нуклеотидных замен, наблюдаемых в состоянии гетероплазмии у первого поколения, особенно при гетероплазмии на уровне 5% и выше.

Филогенетический анализ позволяет реконструировать мутационные изменения мтДНК во времени, по меньшей мере, на двух иерархических уровнях: на более древнем уровне для нуклеотидных замен, унаследованных во многих поколениях и прошедших отбор (эти замены находятся в узлах и стволах филогенетического дерева и определяют собой гаплогруппы мтДНК), и на более «молодом» уровне для нуклеотидных замен, которые расположены в одиночных концевых ветвях дерева [16]. С использованием данного аналитического подхода было выявлено действие отрицательного отбора в процессе эволюции мтДНК в различных популяциях человека, поскольку на периферии филогенетических деревьев, как правило, обнаруживается большее число несинонимичных замен, чем в стволах и узлах, особенно у основания дерева [16, 18–20].

Анализ данных об изменчивости мтДНК у европейцев показал, что спектры нуклеотидных замен, ассоциированных с гаплогруппами и концевыми ветвями филогенетического дерева, различаются лишь по частоте замен Г>А ($P = 0.037$), которые чаще находятся на периферии дерева, чем в стволах (табл. 3). В обоих спектрах доминируют пиримидиновые замены и среди них замена Т>С. Частоты трансверсий также не различаются — 4.1% в стволах дерева и 3.8% в концевых ветвях. Анализ белок-кодирующих участков мтДНК показал, что митохондриальные геномы европейцев находятся под действием отрицательного отбора (индекс нейтральности $NI = 1.32$, $P = 0.006$) (табл. 4). При

Таблица 3. Частота нуклеотидных замен, ассоциированных с гаплогруппами и концевыми ветвями филогенетического дерева мтДНК европейцев (по L-цепи)

Нуклеотидные замены	Замены, ассоциированные с гаплогруппами	Замены в концевых ветвях
T>C	34.1 (441)	33.0 (746)
C>T	21.5 (278)	19.7 (445)
A>G	21.9 (283)	22.3 (504)
G>A	18.3 (237)	21.3 (481)
C>A	1.8 (23)	1.24 (28)
A>C	0.62 (8)	0.75 (17)
T>A	0.15 (2)	0.18 (4)
A>T	0.46 (6)	0.71 (16)
G>C	0.15 (2)	0.22 (5)
C>G	0.31 (4)	0.26 (6)
T>G	0.54 (7)	0.31 (7)
G>T	0.08 (1)	0.09 (2)
Всего замен	1292	2261

Примечание как в табл. 2.

рассмотрении распределения нуклеотидных замен в филогенетическом дереве видно, что влияние отрицательного отбора статистически значимо испытывают лишь замены G>A ($P = 5.8 \times 10^{-4}$); это проявляется в том, что в концевых ветвях несинонимичные замены преобладают над синонимичными. Примечательно, что в спектрах

нуклеотидных замен преобладание пиримидиновых транзаций над пуриновыми (и среди них замен T>C) наблюдается только в группах синонимичных замен; в группах несинонимичных замен наоборот превалируют пуриновые замены (табл. 4). Причем в спектрах несинонимичных замен (как в стволах гаплогрупп, так и в концевых ветвях) наблюдается преобладание транзаций G>A, для которых ранее была показана высокая степень гомоплазии [21, 22].

В настоящей работе с помощью филогенетического анализа данных об изменчивости митохондриальных геномов исследованы спектры нуклеотидных замен, наблюдаемых в популяциях человека. Эти замены представляют собой «мажорные» варианты полиморфизма мтДНК, вышедшие из состояния гетероплазии на протяжении многих поколений, т. е. в эволюционном масштабе времени. Кроме этого, проанализированы спектры нуклеотидных замен мтДНК, наблюдаемых в состоянии гетероплазии у первого поколения. В результате, оказалось, что сопоставляемые спектры мутаций (по L-цепи мтДНК) практически не различаются по основным параметрам: по распределению пиримидиновых и пуриновых замен (с преобладанием транзаций T>C), соотношению числа транзаций и трансверсий.

Поэтому полученные данные могут свидетельствовать о том, что селективные процессы, направляющие эволюцию мтДНК в одном и многих поколениях, имеют сходный характер, т. е. обусловлены отрицательным отбором, который вполне надежно регистрируется при анализе филогенетических деревьев гаплотипов мтДНК в популяциях человека. Так, по данным настоящей и других работ [16, 18–20, 23, 24] в белок-кодирующих участках митохондриальных геномов влияние отрицательного

Таблица 4. Анализ распределения несинонимичных (NS) и синонимичных (S) замен в филогенетическом дереве мтДНК европейцев (тест Elson et al. [16])

Тип замен	Количество замен, ассоциированных с гаплогруппами			Количество замен в концевых ветвях			<i>P</i>	<i>NI</i>
	NS	S	NS/S	NS	S	NS/S		
T>C	43 (20.2)	142 (29.8)	0.3	107 (23.3)	246 (31.7)	0.43	0.086	1.43
C>T	35 (16.4)	96 (20.2)	0.36	38 (8.3)	168 (21.7)	0.23	0.078	0.64
A>G	67 (31.5)	124 (26.0)	0.54	106 (23.1)	182 (23.5)	0.58	0.77	1.07
G>A	56 (26.3)	95 (20.0)	0.59	183 (39.9)	154 (19.9)	1.19	0.00058	2.02
Tv	12 (5.6)	19 (4.0)	0.63	25 (5.4)	25 (3.2)	1.0	0.36	1.59
Все	213	476	0.45	459	775	0.59	0.0061	1.32

Примечание. Частоты нуклеотидных замен (в процентах) приводятся в скобках. Tv – трансверсии. *P* – достоверность различий для двустороннего точного теста Фишера, *NI* – индекс нейтральности.

отбора связано с увеличением числа несинонимичных нуклеотидных замен на периферии филогенетических деревьев гаплотипов мтДНК. Кроме этого, возможное действие отрицательного отбора, связанное с различиями в распределении патогенных несинонимичных замен, было выявлено при сравнении митохондриальных геномов в парах мать–ребенок [25]. Таким образом, если принять, что гетероплазмичные смеси мутаций, наблюдаемые в первом поколении, испытывают влияние отрицательного отбора, то было бы важно понять истоки этого явления и изучить распределение нуклеотидных замен на более ранних стадиях — в ооцитах и первичных зародышевых клетках. Однако полученные к настоящему времени данные в этом направлении довольно противоречивы — в основном, видимо, из-за малых объемов проанализированных мутаций. В одной из работ в спектре нуклеотидных замен мтДНК, находящихся в митохондриях ооцитов в состоянии гетероплазмии, наблюдалось преобладание пуриновых замен над пиримидиновыми [26], а в другой, наоборот — причем, даже с преобладанием транзиций T>C [27].

Исследование изменчивости мтДНК в примордиальных зародышевых клетках показало, что по мере развития зародышевых клеток наблюдается усиление отрицательного отбора, что проявляется в уменьшении величины соотношения числа несинонимичных замен к синонимичным на более поздних стадиях эмбрионального развития [10]. Однако позже этот вывод был оспорен в связи с возможной примесью мутаций, связанных с ядерными копиями мтДНК [28]. По результатам реанализа был предложен вывод о том, что характер отбора мутаций мтДНК в ходе раннего эмбрионального развития нельзя связывать только с влиянием отрицательного отбора, поскольку на некоторых этапах возможны проявления положительного отбора (даже в пользу вредных мутаций) [28]. Таким образом, для прояснения вопросов, связанных с изучением генетических изменений в клетках зародышевой линии, необходимы дальнейшие исследования спектров мутаций мтДНК на различных стадиях эмбриогенеза.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов. Работа выполнена по литературным данным.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C.* Maternal inheritance of human mitochondrial DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. P. 6715–6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6715>
2. *Case J.T., Wallace D.C.* Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts // *Somat. Cell Genet*. 1981. V. 7. P. 103–108. <https://doi.org/10.1007/BF01544751>
3. *Howell N., Kubacka I., Mackey D.A.* How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? // *Am. J. Hum. Genet*. 1996. V. 59. P. 501–509.
4. *Lightowlers R.N., Chinnery P.F., Turnbull D.M., Howell N.* Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease // *Trends Genet*. 1997. V. 13. P. 450–455. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(97\)01266-3](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(97)01266-3)
5. *Just R.S., Irwin J.A., Parson W.* Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing // *Forensic Sci. Int. Genet*. 2015. V. 18. P. 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.003>
6. *Skonieczna K., Malyarchuk B., Jawień A. et al.* Heteroplasmic substitutions in the entire mitochondrial genomes of human colon cells detected by ultra-deep 454 sequencing // *Forensic Sci. Int. Genet*. 2015. V. 15. P. 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.021>
7. *Wei W., Tuna S., Keogh M.J. et al.* Germline selection shapes human mitochondrial DNA diversity // *Science*. 2019. V. 364. <https://doi.org/10.1126/science.aau6520>
8. *Taylor C.R., Kiesler K.M., Sturk-Andreaggi K. et al.* Platinum-quality mitogenome haplotypes from United States populations // *Genes*. 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3390/genes11111290>
9. *Shoubridge E.A., Wai T.* Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte // *Curr. Topics in Developmental Biol*. 2007. V. 77. P. 87–111. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)77004-1](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77004-1)
10. *Floros V.I., Pyle A., Dietmann S. et al.* Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos // *Nat. Cell. Biol*. 2018. V. 20. P. 144–151. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0017-8>
11. *Wallace D.C., Chalkia D.* Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2013. V. 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021220>
12. *Малыарчук Б.А.* Сравнительный анализ мутационных спектров митохондриальных геномов в популяциях человека // *Мол. биология*. 2023. Т. 57. № 5. С. 792–796. <https://doi.org/10.31857/S0026898423050117>
13. *Малыарчук Б.А.* Характеристика спектра нуклеотидных замен митохондриальной ДНК в популяциях человека в условиях высокогорья // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 11. С. 1313–1318. <https://doi.org/10.31857/S0016675823110085>

14. *Mikhailova A.G., Mikhailova A.A., Ushakova K. et al.* A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand // *Nucl. Ac. Res.* 2022. V. 50. P. 10264–10277. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac779>
15. *Turro E., Astle W.J., Megy K. et al.* Whole-genome sequencing of patients with rare diseases in a national health system // *Nature.* 2020. V. 583. P. 96–102. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2434-2>
16. *Elson J.L., Turnbull D.M., Howell N.* Comparative genomics and the evolution of human mitochondrial DNA: Assessing the effects of selection // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. P. 229–238. <https://doi.org/10.1086/381505>
17. *Li M., Schroeder R., Ko A., Stoneking M.* Fidelity of capture-enrichment for mtDNA genome sequencing: Influence of NUMTs // *Nucl. Ac. Res.* 2012. V. 40. P. e137. <https://doi.org/10.1093/nar/gks499>
18. *Moilanen J.S., Majamaa K.* Phylogenetic network and physicochemical properties of nonsynonymous mutations in the protein-coding genes of human mitochondrial DNA // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20. P. 1195–1210. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg121>
19. *Kivisild T., Shen P., Wall D.P. et al.* The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes // *Genetics.* 2006. V. 172. P. 373–387. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.043901>
20. *Деренко М.В., Малярчук Б.А.* Молекулярная филогеография населения Северной Евразии по данным об изменчивости митохондриальной ДНК. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2010. 376 с.
21. *Малярчук Б.А.* Анализ распределения нуклеотидных замен в генах митохондриальной ДНК человека // *Генетика.* 2005. Т. 41. № 1. С. 93–99.
22. *Galtier N., Enard D., Radondy Y. et al.* Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA // *Genome Res.* 2006. V. 16. P. 215–222. <https://doi.org/10.1101/gr.4305906>
23. *Ельцов Н.П., Володько Н.В., Стариковская Е.Б. и др.* Роль естественного отбора в эволюции митохондриальных гаплогрупп Северо-Восточной Евразии // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 9. С. 1247–1249.
24. *Литвинов А.Н., Малярчук Б.А., Деренко М.В.* Характер молекулярной эволюции митохондриальных геномов русского населения Восточной Европы // *Вестник СВНЦ ДВО РАН.* 2020. № 2. С. 107–113. <https://doi.org/10.34078/1814-0998-2020-2-107-113>
25. *Cavadas B., Soares P., Camacho R. et al.* Fine time scaling of purifying selection on human nonsynonymous mtDNA mutations based on the worldwide population tree and mother-child pairs // *Hum. Mut.* 2015. V. 36. P. 1100–1111. <https://doi.org/10.1002/humu.22849>
26. *Boucret L., Bris C., Seegers V. et al.* Deep sequencing shows that oocytes are not prone to accumulate mtDNA heteroplasmic mutations during ovarian ageing // *Hum. Rep.* 2017. V. 32. P. 2101–2109. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex268>
27. *Kang E., Wu J., Gutierrez N. et al.* Mitochondrial replacement in human oocytes carrying pathogenic mitochondrial DNA mutations // *Nature.* 2016. V. 540. P. 270–275. <https://doi.org/10.1038/nature20592>
28. *Fleischmann Z., Cote-L'Heureux A., Franco M. et al.* Reanalysis of mtDNA mutations of human primordial germ cells (PGCs) reveals NUMT contamination and suggests that selection in PGCs may be positive // *Mitochondrion.* 2024. V. 74. P. 101817. doi: 10.1016/j.mito.2023.10.005

Similarity of Human Mitochondrial DNA Nucleotide Substitution Spectra Reconstructed Over One and Many Generations

B. A. Malyarchuk^{1, *}

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*

Using phylogenetic analysis of mitochondrial whole genome nucleotide sequences (mtDNA), allowing the study of genetic changes over many generations, a spectrum of nucleotide substitutions (along the L-strand of mtDNA) was reconstructed in European populations. The spectra of mtDNA nucleotide substitutions observed in a heteroplasmic state (at $\geq 1\%$ and $\geq 5\%$ levels) in first generation children were also analyzed. It was found that the spectra of nucleotide substitutions reconstructed over one and many generations do not differ practically in the main parameters: the distribution of pyrimidine and purine substitutions (with predominance of transitions T>C), the ratio of the number of transitions and transversions. Analysis of the phylogenetic tree of mtDNA haplotypes in Europeans clearly revealed the influence of negative (purifying) selection on mitochondrial gene pools. It is suggested that the selective processes guiding the mtDNA evolution in one and many generations are of a similar nature, i.e., caused by negative selection. The problem of how mutations occur and spread in mitochondria of germ line cells is discussed.

Keywords: mitochondrial genome, nucleotide substitutions, heteroplasmy, human populations, germ line.

ДИНАМИКА ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ НАСЕЛЕНИЯ ЮГА ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ ЗА 130-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД. МИГРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ

© 2024 г. К. Н. Сергеева¹, С. Н. Сокорев¹, И. В. Батлуцкая¹, И. Н. Сорокина^{1,*}

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

*e-mail: Sorokina_5@mail.ru

Поступила в редакцию 12.02.2024 г.

После доработки 12.03.2024 г.

Принята к публикации 18.03.2024 г.

В настоящей статье оценена динамика показателей, характеризующих брачно-миграционные параметры среди населения юга Центральной России с 1890 г. по 2018 г. В структуре браков за 130-летний период произошло значительное снижение (в 1.6–2.2 раза) удельного веса изоляционных браков и существенно увеличилась доля гетеролокальных браков (практически в 11 раз), при этом размер элементарной популяции увеличился с уровня села до уровня района/области. В 1890–2018 гг. среди городского населения более выражена динамика изоляционных браков, а среди сельских жителей — динамика гетеролокальных браков. За 130-летний период положительная брачная ассортативность по месту рождения супругов снизилась в 1.5 раза без существенных различий в уровне и динамике брачной избирательности по месту рождения супругов между городским и сельским населением (за исключением периода 1951–1953 гг.). Установлена выраженная сильная прямая корреляционная зависимость уровня брачной ассортативности от доли браков, заключаемых в пределах одной области и одного района ($r = 0.90$, $p < 0.05$), и отрицательная — от доли гетеролокальных браков (заключаемых между выходцами разных областей) ($r = -0.90$, $p < 0.05$).

Ключевые слова: брачная структура, миграции, ассортативность браков.

DOI: 10.31857/S0016675824080103 **EDN:** BFIYQJ

Современное население является миграционно активным, и тенденция увеличения интенсивности миграционных процессов среди народонаселения, зарегистрированная в последние десятилетия, продолжает оставаться значимой в настоящее время. По данным ВОЗ на 2022 г. мигрантами во всем мире являются около одного миллиарда человек, т. е. приблизительно каждый восьмой человек [1]. Не менее значимы миграционные процессы и для России, где на протяжении многих веков они способствовали расширению границ государства за счет освоения и заселения новых территорий. Современное размещение населения Российской Федерации является результатом миграционных процессов, происходивших в Российской империи, Советском Союзе и на постсоветском этапе развития РФ. За последние 50 лет население России в целом устойчиво увеличивалось за счет миграционного притока [2, 3].

Интенсивные миграции современного населения оказывают значимое влияние на популяционно-генетическую структуру: изменяют численность

популяций, этнический и половозрастной состав, генетическое разнообразие, создают условия для аутбридинга, влияют на частоту и распространенность патологий и др. Как показано в работе О.Л. Курбатовой и Н.К. Янковского [2] на примере городского населения России при интенсивности миграций на уровне 1990-х годов практически полная замена генофонда коренного населения России возможна за 10 поколений.

На протяжении нескольких десятилетий различными научными коллективами проводились исследования генетически значимых параметров миграций среди народонаселения, преимущественно занимающего европейскую часть России [4–9]. Вместе с тем проблема динамики генофонда под воздействием миграционных процессов имеет особую актуальность для коренного русского населения, занимающего южные окраины Центральной России. Население областных популяций юга Центральной России, отличающееся гетерогенностью в связи с особенностями географического

положения и историческим прошлым, остается недостаточно изученным [10–15].

В настоящем сообщении представлены результаты изучения брачно-миграционных показателей среди населения юга Центральной России (Белгородская обл.) в динамике за 130-летний период (с 1890-х гг. по 2018 г.).

Данное сообщение открывает серию работ, посвященных изучению динамики ряда демографических показателей (миграционные показатели, параметры изоляции расстоянием, возрастные параметры, национальный состав) среди населения юга Центральной России (Белгородская область) за 130-летний период.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект настоящего исследования – население Белгородской области. Географически область располагается на юго-западных и южных склонах Среднерусской возвышенности, в бассейнах рек Днепр и Дон. В современных границах Белгородская область была образована в послевоенный период – 6 января 1954 г. вследствие объединения ряда районов Курской и Воронежской областей [16]. Из Курской области выделились Белгородский, Борисовский, Грайворонский, Валуйский, Волоконовский, Новооскольский, Губкинский, Ивнянский, Корочанский, Краснояружский, Прохоровский, Ракитянский, Старооскольский, Чернянский, Шебекинский, Яковлевский районы. Из Воронежской области выделились Алексеевский, Красненский, Красногвардейский, Вейделевский, Ровеньский районы. На данный момент времени Белгородская область включает 21 район. Значимое влияние на формирование структуры современной белгородской популяции оказывали миграционные процессы, за счет которых наблюдался рост численности. Численность области постепенно увеличивалась, но в различные временные периоды причины роста различались: 1) в конце XIX – начале XX в. – развитие инфраструктуры, сельского хозяйства и промышленности (через Белгород в 1869 г. прошла Курско-Харьковско-Азовская железная дорога, что расширяло связи с промышленными центрами и другими уездами; в 1871 г. было установлено водоснабжение за счет проведения первого водопровода; добыча мела и т. д.); 2) послевоенные миграции; 3) естественный прирост населения в 60-е годы; 4) в 70-е годы – приток людей в область, вызванный формированием территориально-природного комплекса на базе минеральных ресурсов Курской Магнитной Аномалии (КМА); 5) активный приток мигрантов из стран СНГ (Средняя Азия, Закавказье, Прибалтика и т. д.) в 90-х годы [16, 17]. Следует отметить, что в 90-е годы в потоке мигрантов из стран СНГ в значительной мере имела место возвратная

миграция на историческую родину, при которой лица, ранее эмигрировавшие, а также их потомки возвращались на исконные территории, где ранее проживали их предки. Во все временные периоды притоку мигрантов благоприятствовали и природно-климатические условия региона, которые всегда привлекали жителей северных регионов РФ. По данным Росстата численность населения области на 1 января 2023 г. составляла 1514527 человек, при этом на долю городского населения приходилось 66.25%.

Для исследования были отобраны восемь районов области: Белгородский, Старооскольский, Новооскольский, Корочанский, Грайворонский, Валуйский, Алексеевский, Красногвардейский (рис. 1). Критериями подбора районных популяций являлись:

1) исторические особенности формирования области из уездов (районов) Курской и Воронежской губерний (областей). Были включены Белгородский, Грайворонский, Корочанский, Новооскольский, Старооскольский районы (уезды), которые входили ранее в состав Курской губернии, затем Курской обл., а после 1954 г. отошли к Белгородской обл. Другие районы – Бирючанский (позже Красногвардейский и частично Алексеевский) и Валуйский районы (уезды) до 1954 г. входили в состав Воронежской губернии, затем Воронежской обл., после 1954 г. являются районами Белгородской области;

2) уровень урбанизации населения. В анализ были включены районы с высоким уровнем урбанизации – Белгородский и Старооскольский, в состав которых входят два крупных города областного значения – Белгород и Старый Оскол, концентрирующие 2/3 городского населения [18]; районы со средним уровнем урбанизации, где районным центром являлись малые города (Алексеевский, Валуйский, Новооскольский р-ны); районы с низким уровнем урбанизации населения, где районным центром являлись малые города численностью до 10 тыс. человек (Красногвардейский, Корочанский, Грайворонский р-ны);

3) географическое положение районов в различных частях области. Грайворонский район является самой западной частью области, Красногвардейский и Алексеевский (включен в анализ с 1951 г.) (ранее оба района входили в состав Бирючанского уезда) районы располагаются на востоке области, Старооскольский р-н – самая северная, а Валуйский р-н – самая южная часть Белгородской обл. Корочанский, Новооскольский р-ны занимают центральную часть региона, а Белгородский р-н, являясь областным центром, представляет юго-западные отроги региона;

4) национальный состав районных популяций. На протяжении двух веков (XVI–XVII вв.)

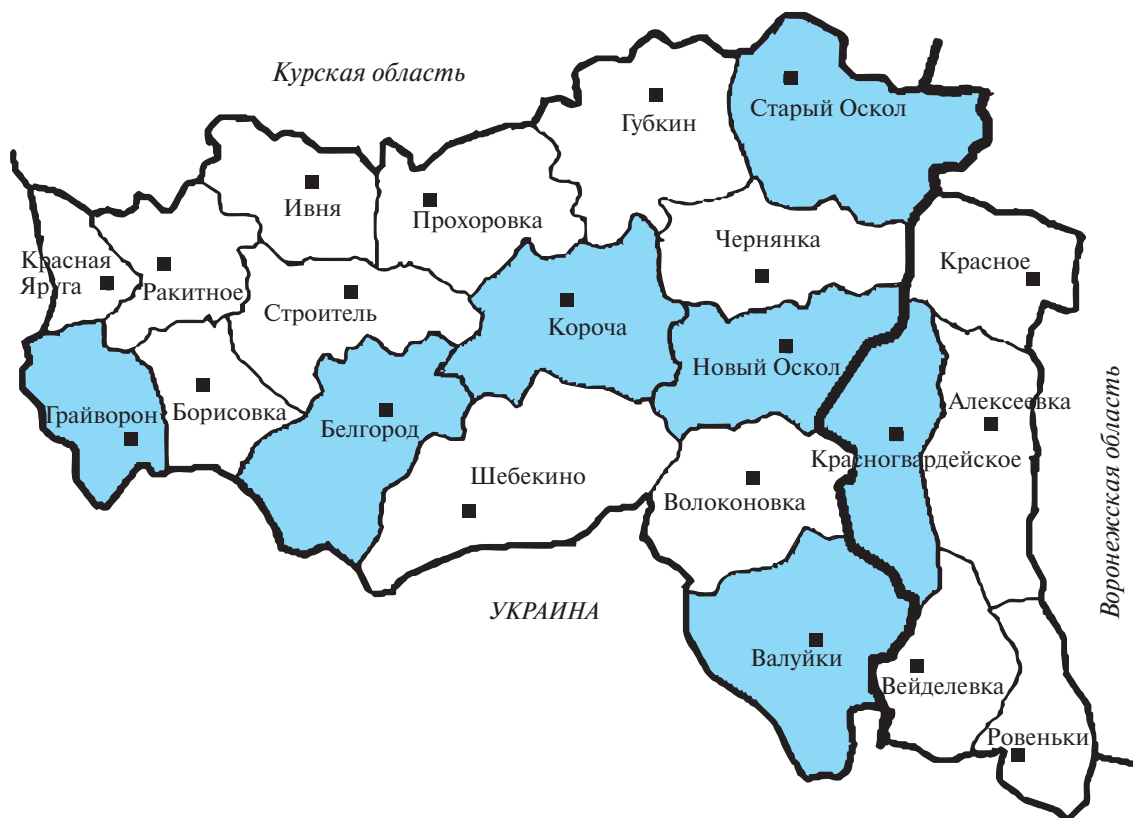


Рис. 1. Территориальное расположение районов Белгородской области (цветом выделены изучаемые районы; жирная линия — граница между Курской и Воронежской областями до 1954 г. — года формирования Белгородской обл.).

регион являлся практически биэтническим (русско-украинским) за счет заселения переселенцами из Центральной России и Правобережной Украины. Лишь с начала XX в. начались значимые этно-территориальные трансформации. В изучаемых нами районах (уездах) Белгородской обл. русские и украинцы проживали дисперсно: в северной и центральной части преобладало русское население, в западной, южной и восточной был высокий удельный вес украинцев. Так, к концу XIX в. доля русских была максимальной в Старооскольском, Белгородском и Корочанском уездах (районах). В четырех из семи уездов Курской и Воронежской губерний (территории которых теперь входят в состав Белгородской обл.) преобладали украинцы: в Бирючанском уезде, в Грайворонском, в Валуйском и Новооскольском [19].

Изучение динамики популяционно-демографической структуры населения Белгородской обл. за последние 130 лет проводилось на материалах брачных записей церковно-приходских книг Архива ЗАГС Белгородской обл. конца XIX — начала XX в. (1890—1910 гг. — 4925 записей), а также актов гражданского состояния областного архива ЗАГС за 1951—1953 гг. (5128 записей), 1978—1980 гг. (14819

записей), 1991—1993 гг. (6128 записей) и 2016—2018 гг. (8130 записей). Из актов гражданского состояния использовали сведения о местах рождения супругов. Общий объем выборки — 39130 записей актов гражданского состояния. Статистическая обработка информации проводилась с использованием программ Excel (10), Statistica (v10).

Был проведен анализ структуры браков, основываясь на информации о местах рождения супругов; браки, согласно О.Л. Курбатовой и Е.Ю. Победоносцевой [20], подразделялись на изолакальные и гетеролокальные. К изолакальным относились браки между уроженцами одной области (губернии), включая браки между уроженцами одного района (уезда), в том числе одного села (города). К гетеролокальным относились браки между уроженцами разных областей (губерний). С целью оценки величины брачной ассортативности по признаку “место рождения” использовался коэффициент полихорической связи K [20—22].

Для количественной оценки степени локальной изоляции популяций применяли индекс эндогамии, который рассчитывался по данным брачных миграций как доля женихов и невест, родившихся в данной популяции [23]. За элементарную

принималась та популяция, в которую поступает не более 50% гамет [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Миграционные параметры населения юга Центральной России

1. 1890–1910 гг. Изучение брачной структуры в уездах Курской и Воронежской губерний показало, что в 1890–1910 гг. в среднем 96.38% всех браков заключалось внутри губерний (табл. 1), в том числе 92.43% из них в пределах одного уезда и 54.80% в пределах одного села. Таким образом, элементарной популяцией в конце XIX – начале XX в. являлось село. В целом изменчивость доли браков, заключенных в пределах одного села (43.86–67.54%), была выше по сравнению с вариабельностью доли браков, регистрируемых в одном уезде (85.16–97.71%) или губернии (93.17–98.22%). На долю браков, заключенных жителями разных губерний, приходилось в среднем 3.62% (1.78–6.83%) (табл. 1).

В целом в Воронежской губернии чаще, чем в Курской губернии, заключались браки между жителями разных губерний (в 1.7 раза) и реже между жителями одного села (в 1.3 раза). Среди городского населения удельный вес браков, заключенных между уроженцами одного села (города) (61.28%), выше в 1.2 раза, а доля браков, заключенных между жителями разных губерний (6.74%), в 2.8 раза выше по сравнению с сельским населением (50.81 и 2.41% соответственно) (табл. 1).

Во всех уездах Курской и Воронежской губерний наблюдалась брачная ассортативность по месту рождения супругов (в среднем $K = 0.394$) без выраженных различий между городским ($K = 0.331$) и сельским ($K = 0.337$) населением (табл. 1).

2. 1951–1953 гг. В ходе административно-территориальных реорганизаций середины XX в. Курская и Воронежская губернии были преобразованы в соответствующие области, а уезды – в районы, причем границы бывших уездов не всегда совпадали с границами нынешних районов. Так, Бирючанский уезд Воронежской губернии в 1918 г. был ликвидирован с переносом уездного центра в слободу Алексеевка и с 1 апреля 1918 г. переименован в Алексеевский уезд [24], поэтому в данный период времени (1951–1953 гг.) вместо Бирючанского района в анализ был включен Алексеевский район. В 1951–1953 гг. в среднем 87.72% всех браков заключалось внутри области, в том числе 85.50% из них в пределах одного района и 62.90% в пределах одного села (табл. 2). Таким образом, как и в конце XIX в., в 1951–1953 гг. элементарной популяцией являлось село. К середине XX в. в 3.4 раза увеличилась доля

браков, заключенных жителями разных областей (до 12.28%).

В целом в Воронежской обл. в 1.5 раза чаще, чем в Курской обл. заключались браки между жителями разных областей (16.32 и 10.67% соответственно). Среди городского населения удельный вес браков, заключенных между уроженцами одного села (города) (76.19%), выше в 1.3 раза, а доля браков, заключенных между жителями разных областей (13.19%), в 1.2 раза выше по сравнению с сельским населением (59.19 и 11.32%, соответственно) (табл. 2). Брачная ассортативность по месту рождения супругов наблюдалась во всех исследуемых районах Курской и Воронежской областей (в среднем $K = 0.381$) и была наиболее выражена среди сельского населения ($K = 0.342$), среди городских жителей $K = 0.252$.

3. 1978–1980 гг. В современных границах Белгородская обл. (21 район) была сформирована в 1954 г. путем объединения ряда районов Курской и Воронежской областей. В ходе административных преобразований некоторые районы претерпели территориальные изменения. Так, с марта 1964 г. из части Алексеевского района был выделен Красногвардейский район (с центром в г. Бирюч) и таким образом в данный период времени (1978–1980 гг.) нами отдельно рассматривались образованные из Алексеевского района два района – Красногвардейский и Алексеевский. Ввиду малых выборок среди сельского населения и не сохранившихся архивных данных по ряду районов дальнейший анализ популяционно-демографической структуры проводился по районам в целом (без их подразделения на сельское и городское население). Исключение составили Белгородский и Старооскольский районы, где достаточный объем выборки и наличие крупного города позволили продолжить анализ брачно-миграционных показателей как среди городского, так и сельского населения.

В 1978–1980 гг. в структуре браков в среднем 64.12% всех браков заключались внутри области, в том числе 48.14% из них в пределах одного района и 23.45% в пределах одного села (табл. 3). Таким образом, размер элементарной популяции в 1980-е гг. в подавляющем большинстве исследуемых популяций соответствовал территориальным границам района или несколько превышал его. Ко второй половине XX в. в 2.9 раза увеличилась доля браков, заключенных жителями разных областей (до 35.88%). Анализ городского и сельского населения Белгородской обл. показал, что в среднем доля браков, заключенных в пределах города (села), практически не различалась в городской (21.31%) и сельской (20.8%) частях. При этом среди городского населения удельный вес браков, заключенных между уроженцами одной области (45.81%), в том числе одного района (28.56%), ниже (в 1.3 и 1.5 раза соответственно), чем среди сельского населения

Таблица 1. Структура браков среди населения Курской и Воронежской губерний в 1890—1910 гг.

Популяции	N	Доля браков (%) между выходцами из										K
		разных областей (губерний)		одной области (губернии)		в том числе одного района (уезда)		в том числе одного села (города)				
		n	%	n	%	n	%	n	%			
Уезды Курской губернии	Белгородский уезд (в целом)	844	31	3.68	813	96.32	770	91.23	454	53.79	0.450	
	город	253	19	7.51	234	92.49	223	88.14	175	69.17	0.403	
	село	591	12	2.03	579	97.97	547	92.56	279	47.21	0.298	
	Старооскольский уезд (в целом)	795	32	4.02	763	95.98	677	85.16	394	49.56	0.358	
	город	167	17	10.18	150	89.82	144	86.23	92	55.09	0.260	
	село	628	15	2.39	613	97.61	533	84.87	302	48.09	0.277	
	Новооскольский уезд (в целом)	727	15	2.06	712	97.94	690	94.91	491	67.54	0.448	
	город	302	11	3.64	291	96.36	279	92.38	237	78.47	0.376	
	село	425	4	0.95	421	99.05	411	96.70	254	59.76	0.327	
	Корочанский уезд (в целом)	364	13	3.57	351	96.43	340	93.41	218	59.89	0.435	
	город	162	12	7.41	150	92.59	146	90.12	124	76.54	0.387	
	село	202	1	0.50	201	99.50	194	96.03	94	46.53	0.321	
	Грайворонский уезд (в целом)	789	14	1.78	775	98.22	771	97.71	474	60.07	0.469	
	город	320	4	1.24	316	98.76	314	98.13	199	62.19	0.381	
	село	469	10	2.12	459	97.88	457	97.45	275	58.64	0.328	
	В среднем по губернии	704	21	3.02	683	96.98	650	92.48	406	58.17	0.432	
город	241	13	6.00	228	94.00	221	91.00	165	68.29	0.361		
село	463	8	1.60	455	98.40	428	93.52	241	52.05	0.310		

Таблица 1. Окончание

Популяции	N	Доля браков (%) между выходцами из								K		
		разных областей (губерний)		одной области (губернии)		в том числе одного района (уезда)		в том числе одного села (города)				
		n	%	n	%	n	%	n	%			
Уезды Воронежской губернии	Валуйский уезд (в целом)	820		56	6.83	764	93.17	740	90.24	401	48.90	0.390
	город	190		29	15.26	161	84.74	153	80.53	87	45.79	0.326
	село	630		27	4.29	603	95.71	587	93.17	314	49.84	0.501
	Бирючанский уезд (в целом)	586		20	3.41	566	96.59	553	94.37	257	43.86	0.323
	город	259		5	1.93	254	98.07	250	96.53	108	41.70	0.276
	село	327		15	4.59	312	95.41	303	92.66	149	45.57	0.227
	В среднем по губернии	703		38	5.12	665	94.88	647	92.31	329	46.38	0.357
	город	224		17	8.60	208	91.41	202	88.53	98	43.75	0.301
В среднем по региону	село	479		21	4.44	458	95.56	445	92.92	232	47.71	0.364
	В среднем по региону	704		26	3.62	678	96.38	649	92.43	384	54.80	0.394
	город	236		14	6.74	222	93.26	216	90.29	146	61.28	0.331
	село	468		12	2.41	455	97.59	433	93.35	238	50.81	0.337

Таблица 2. Структура браков среди населения Курской и Воронежской областей в 1951—1953 гг.

Популяции	N	Доля браков (%) между выходцами из								K	
		разных областей (страны)		одной области (губернии)		одного района (уезда)		одного села (города)			
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Районы Курской области	Белгородский район (в целом)	1170	141	12.05	1029	87.95	1012	86.50	859	73.42	0.447
	город	404	64	15.83	340	84.17	338	83.67	334	82.68	0.219
	село	766	77	10.05	689	89.95	674	87.99	525	68.54	0.534
	Старооскольский район (в целом)	675	42	6.22	633	93.78	627	92.89	539	79.85	0.383
	город	197	13	6.80	184	93.20	184	93.40	171	86.80	0.187
	село	478	29	6.06	449	93.94	443	92.68	368	76.99	0.281
	Новооскольский район (в целом)	645	117	18.14	528	81.86	512	79.38	401	62.17	0.394
	город	102	11	10.79	91	89.21	91	89.21	84	82.35	0.066
	село	543	106	19.53	437	80.47	421	77.52	317	58.37	0.367
	Корочанский район (в целом)	633	54	8.53	579	91.47	570	90.05	297	46.92	0.375
	город	156	16	10.25	140	89.75	140	89.75	122	78.21	0.490
	село	477	38	7.97	439	92.03	430	93.15	175	36.69	0.249
	Грайворонский район (в целом)	643	54	8.40	589	91.60	584	90.82	402	62.52	0.286
	город	112	16	14.29	96	85.71	94	83.93	86	76.79	0.142
	село	531	38	7.16	493	92.84	490	92.28	316	59.51	0.259
	В среднем по области	753	82	10.67	672	89.33	661	87.93	500	64.98	0.377
	город	194	24	11.59	170	88.41	169	87.99	159	81.37	0.221
	село	559	58	10.15	501	89.85	492	88.72	340	60.02	0.338

Таблица 2. Окончание

Популяции	N	Доля браков (%) между выходцами из								K	
		разных областей (страны)		одной области (губернии)		одного района (уезда)		одного села (города)			
		n	%	n	%	n	%	n	%		
Районы Воронежской губернии	Валуйский район (в целом)	724	91	12.57	633	87.43	609	84.12	426	58.84	0.407
	город	193	14	7.25	179	92.75	177	91.71	146	75.65	0.314
	село	531	77	14.50	454	85.50	432	81.36	280	52.73	0.341
	Алексеевский район (в целом)	638	128	20.06	510	79.94	477	74.76	361	56.58	0.361
	город	295	80	27.12	215	72.88	190	64.41	150	50.85	0.253
	село	343	48	13.99	295	86.01	287	83.67	211	61.52	0.349
	В среднем по области	681	110	16.32	572	83.69	543	79.44	394	57.71	0.384
	город	244	47	17.19	197	82.82	184	78.06	148	63.25	0.284
	село	437	63	14.25	375	85.76	360	82.52	246	57.13	0.345
	В среднем по региону	733	90	12.28	643	87.72	627	85.50	469	62.90	0.381
город	208	31	13.19	178	86.81	173	85.15	156	76.19	0.252	
село	524	59	11.32	465	88.68	454	86.95	313	59.19	0.342	

Таблица 3. Структура браков среди населения Белгородской области в 1978–1980 гг.

Популяции	N	Доля браков (%) между выходцами из										K
		разных областей (страны)		одной области (Белгородской)		одного района		одного села (города)				
n	%	n	%	n	%	n	%					
Белгородский район	4737	2230	47.08	2507	52.92	1383	29.19	940	19.84	0.270		
город	3378	1577	46.68	1801	53.32	951	28.15	769	22.76	0.259		
село	1359	653	48.05	706	51.95	432	31.79	171	12.58	0.252		
Старооскольский район	3320	1748	52.65	1572	47.35	1252	37.71	760	22.89	0.276		
город	2165	1336	61.71	829	38.29	627	28.96	430	19.86	0.267		
село	1155	412	35.67	743	64.33	625	54.11	330	28.57	0.258		
Новооскольский район	1120	334	29.82	786	70.18	581	51.88	248	22.15	0.267		
Корочанский район	1034	302	29.20	732	70.80	487	47.10	193	18.67	0.267		
Грайворонский район	613	260	42.42	353	57.58	264	43.06	145	23.65	0.271		
Валуйский район	1837	610	33.20	1227	66.80	986	53.68	470	25.59	0.277		
Красногвардейский район	1145	282	24.63	863	75.37	696	60.78	328	28.64	0.270		
Алексеевский район	1013	284	28.03	729	71.97	625	61.70	265	26.16	0.278		
В среднем по области	1852	756	35.88	1096	64.12	784	48.14	419	23.45	0.272		
город	2772	1457	54.20	1315	45.81	789	28.56	600	21.31	0.263		
село	1257	533	41.86	725	58.14	529	42.95	251	20.58	0.255		

(58.14 и 42.95% соответственно). А удельный вес браков, заключенных между жителями разных областей в городах (54.20%), в 1.3 раза выше по сравнению с селами (41.86%). Во всех исследуемых районах Белгородской обл. наблюдалась положительная брачная ассортативность по месту рождения супругов (в среднем $K = 0.272$) без выраженных различий между городским ($K = 0.263$) и сельским населением ($K = 0.255$) (табл. 3).

4. 1991–1993 гг. В 1991–1993 гг. в среднем 61.73% всех браков заключались внутри Белгородской области, в том числе 46.69% из них в пределах одного района и 25.16% в пределах одного села. Размер элементарной популяции в 1990-е гг. соответствовал территориальным границам района (табл. 4). Среди городских жителей в 1.9 раза выше доля браков, заключаемых в пределах одного города (села) (34.19%), чем среди сельского населения (18.21%). В 1990-е гг. во всех исследуемых районах области наблюдалась положительная брачная ассортативность по месту рождения супругов (в среднем $K = 0.284$) без различий между городским ($K = 0.250$) и сельским населением ($K = 0.246$).

5. 2016–2018 гг. В 2016–2018 гг. в среднем 59.48% всех браков заключались внутри области, в том числе 43.35% из них в пределах одного района и 25.80% в пределах одного села (табл. 5). К началу XXI в. размер элементарной популяции в 1/3 анализируемых районных популяций (37.5%) соответствовал уровню района (Алексеевский, Красногвардейский, Старооскольский р-ны), тогда как в большинстве (62.50%) рассматриваемых популяций (Белгородский, Новооскольский, Корочанский, Грайворонский, Валуйский р-ны), он соответствовал практически уровню области (52.46–58.00% браков в этих районах заключались в пределах Белгородской обл.) Среди городского населения Белгородского района удельный вес браков, заключенных между уроженцами одной области (49.50%), в том числе одного района (34.85%) и одного села (29.60%), ниже в 1.2–1.3 раза, чем среди сельского населения (60.54, 44.70, 34.41% соответственно), а удельный вес браков, заключенных между жителями разных областей, в городе в 1.3 раза выше по сравнению с селом (табл. 5).

В 2016–2018 гг. наблюдалась положительная брачная ассортативность по месту рождения супругов во всех исследуемых районах Белгородской обл. (в среднем $K = 0.264$) без различий между городским ($K = 0.272$) и сельским ($K = 0.276$) населением Белгородского р-на.

Тенденции динамики миграционных параметров среди населения юга Центральной России

На завершающем этапе нашей работы проведен анализ основных направлений динамики брачной структуры населения юга Центральной России

(Белгородская обл.) за 130 лет (с 1890 г. по 2018 г.) в разрезе пяти временных периодов (данные представлены на рис. 2–5). Были выявлены следующие тенденции.

Во-первых, размер элементарной популяции за 130 лет изменился с уровня, ограниченного территорией села, до территориальных границ района (37.5% рассматриваемых районов) и области (62.5% изучаемых районов) (рис. 2).

Во-вторых, с конца XIX до начала XXI в. значительно уменьшилась доля браков, заключаемых между уроженцами одной губернии (области) (в 1.6 раза), одного уезда (района) (в 2 раза) и одного села (в 2.2 раза), тогда как удельный вес браков, заключаемых между выходцами разных областей, возрос в 10.6 раза (рис. 2). Установлена сильная прямая корреляционная связь между долями изо-локальных браков ($r = 1.00$, $p < 0.05$), удельный вес которых отрицательно коррелировал с долей гетеролокальных браков ($r = -1.00$, $p < 0.05$).

В-третьих, динамика брачно-миграционных показателей, характеризующих изо-локальные браки, с 1890 г. по 2018 г. среди городского населения (рис. 3) была более выражена, чем среди сельских жителей (рис. 4) юга Центральной России: доли внутри-областных (внутригубернских) браков снизились в 2 раза в городе и в 1.6 раза в селе, внутрирайонных (внутриуездных) браков — в 2.6 раза и в 2 раза соответственно, браков между односельчанами — в 2 раза и 1.5 раза соответственно. При этом доля браков, заключаемых между уроженцами разных областей, увеличилась в 7.5 раз в городе и в 16.4 раза в селе с максимальной динамикой в период 1951–1953 гг. — 1978–1980 гг. (рис. 3, 4).

В-четвертых, за 130-летний период положительная брачная ассортативность по месту рождения супругов снизилась в 1.5 раза (с 0.394 до 0.264) (рис. 5) без существенных различий в уровне и динамике между городским и сельским населением (за исключением периода 1951–1953 гг., когда показатель брачной ассортативности в городе был в 1.4 раза выше, чем в селе) (рис. 5, табл. 2).

В-пятых, установлена выраженная сильная прямая корреляционная зависимость уровня брачной ассортативности от доли браков, заключаемых в пределах одной области и одного района ($r = 0.90$, $p < 0.05$), и отрицательная — от доли гетеролокальных браков (заключаемых между выходцами разных областей) ($r = -0.90$, $p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

За 130-летний период (с 1890 по 2018 г.) в среднем по Белгородскому региону произошло значительное уменьшение (в 1.6–2.2 раза) удельного веса изо-локальных браков и выраженное увеличение (практически в 11 раз) доли гетеролокальных

Таблица 4. Структура браков среди населения Белгородской области в 1991–1993 гг.

Популяции	N	Доля браков (%) между выходцами из										K
		разных областей (страны)		одной области (Белгородской)		одного района		одного села (города)				
		n	%	n	%	n	%	n	%			
Белгородский район	1654	604	36.52	1050	63.48	700	42.32	538	32.53	0.264		
город	1350	444	32.89	906	67.11	608	45.04	509	37.70	0.255		
село	304	160	52.63	144	47.37	92	30.26	29	9.54	0.245		
Старооскольский район	1052	492	46.77	560	53.23	459	43.63	308	29.28	0.260		
город	665	351	52.78	314	47.22	248	37.29	204	30.68	0.245		
село	387	141	36.43	246	63.57	211	54.52	104	26.87	0.247		
Новооскольский район	408	133	32.60	275	67.40	209	51.22	95	23.28	0.281		
Корочанский район	479	171	35.69	308	64.31	215	44.89	87	18.17	0.274		
Грайворонский район	310	138	44.52	172	55.48	132	42.58	75	24.19	0.303		
Валуйский район	893	322	36.07	571	63.93	420	47.02	187	20.93	0.287		
Красногвардейский район	620	263	42.42	357	57.58	270	43.55	147	23.71	0.296		
Алексеевский район	712	225	31.61	487	68.39	415	58.28	208	29.21	0.307		
В среднем по области	766	294	38.28	473	61.73	353	46.69	206	25.16	0.284		
город	1008	398	42.84	610	57.17	428	41.17	357	34.19	0.250		
село	346	151	44.53	195	55.47	152	42.39	67	18.21	0.246		

Таблица 5. Структура браков среди населения Белгородской области в 2016–2018 гг.

Популяции	N	Доля браков (%) между выходцами из								K
		разных областей (страны)		одной области (Белгородской)		одного района		одного села (города)		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Белгородский район	2001	901	45.03	1100	54.97	795	39.73	640	31.98	0.277
город	1010	510	50.50	500	49.50	352	34.85	299	29.60	0.272
село	991	391	39.46	600	60.54	443	44.70	341	34.41	0.276
Старооскольский район	1959	630	32.16	1329	67.84	1203	61.41	1032	52.68	0.265
Новооскольский район	519	218	42.00	301	58.00	179	34.49	87	16.76	0.254
Корочанский район	448	213	47.54	235	52.46	155	34.60	63	14.06	0.262
Грайворонский район	411	194	47.21	217	52.79	134	32.60	79	19.22	0.253
Валуйский район	1225	563	45.96	662	54.04	493	40.25	240	19.59	0.266
Красногвардейский район	656	225	34.30	431	65.70	311	47.41	132	20.12	0.276
Алексеевский район	911	273	29.96	638	70.04	513	56.32	291	31.95	0.258
В среднем по области	1016	402	40.52	614.13	59.48	473	43.35	321	25.80	0.264

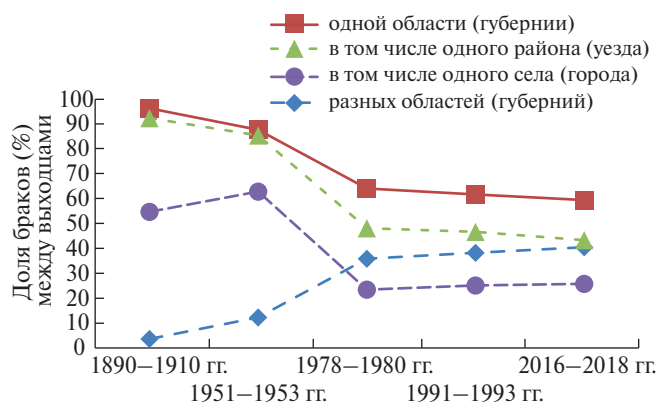


Рис. 2. Динамика структуры браков по месту рождения супругов.

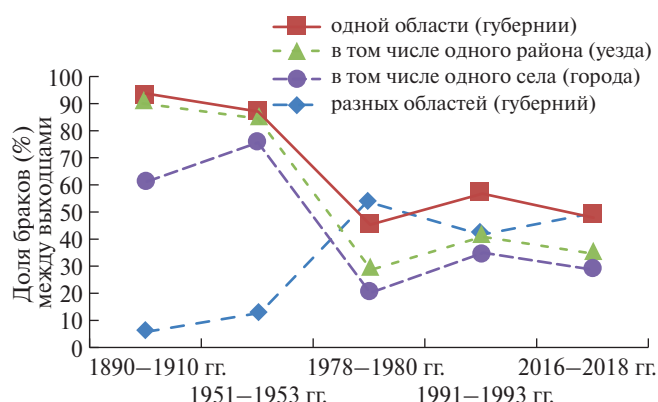


Рис. 3. Динамика структуры браков по месту рождения супругов среди городского населения.

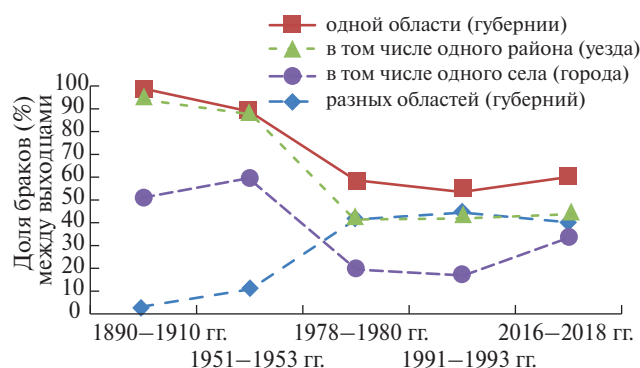


Рис. 4. Динамика структуры браков по месту рождения супругов среди сельского населения.

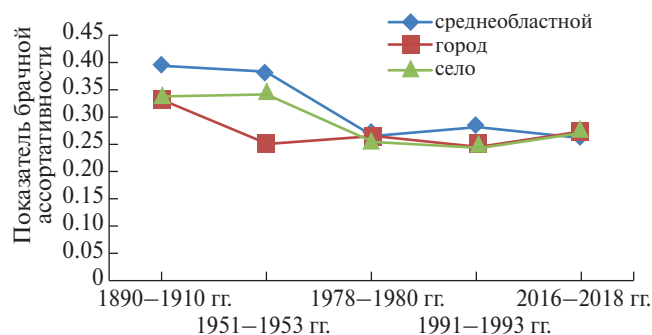


Рис. 5. Динамика брачной ассортативности по месту рождения супругов.

браков. Так, с конца XIX в. (1890–1910 гг.) до середины XX в. (1951–1953 гг.) более половины браков заключалось между односельчанами. Остальные браки регистрировались между уроженцами разных населенных пунктов одного уезда или губернии и в сумме данные браки (изолакальные) превышали 95%. На гетеролокальные браки приходилось менее 5%. Население в конце XIX — начале XX в. было достаточно консервативно в своих социальных связях и предпочитало заключать браки в рамках родственно-клановых групп. Это, с одной стороны, обуславливалось “приоритетом хозяйственно-экономических соображений при заключении брака” и вело “к ограничению выбора брачного партнера и социальной замкнутости” [25]. Поэтому невест и женихов предпочитали выбирать в пределах своего села. “Но в том случае, если не могли подыскать невесту в своем селе, украинцы ездили сватать в украинские села, как бы далеко они не были расположены, а русские — в села, населенные русскими”, пишет Л.Н. Чижилова [26]. С другой стороны, многие десятилетия вплоть до 1917 г. в России условия заключения

браков регулировались церковным брачным законодательством (существовал церковный брак). Это определяло условия поиска брачных партнеров и заключения браков. После революции была упразднена церковная форма брака. За достаточно короткий промежуток времени было принято несколько брачно-семейных кодексов, закреплявших отделение брака от церкви [27], и введено заключение брака в государственных органах записи актов гражданского состояния (ЗАГС). Таким образом, условия заключения браков в конце XIX — начале XX в. способствовали преобладанию изолакальных браков на всех уровнях популяционной структуры (внутриобластных, в том числе внутрирайонных и между односельчанами) вплоть до середины XX в. Значимые изменения брачной структуры Белгородского региона с 1951–1953 гг. по 1978–1980 гг. являлись следствием больших потерь мужского населения в годы войны и вызванной ими последующей диспропорции в соотношении полов. За годы войны число зарегистрированных браков упало более чем в 2 раза [27]. Лишь к концу 50-х — началу 60-х годов XX в. стала увеличиваться

доля мужского населения, когда женихи являлись представителями поколения мужчин, не участвовавших в войне. Однако демографические волны среди мужского и женского населения и дисбаланс между полами продолжали играть значимую роль в формировании брачно-миграционной структуры далее в 60–80-е гг. Так, например, число женщин брачного “возраста определялось поколением, родившимся в годы войны, когда рождаемость резко упала, и вследствие этого на брачном рынке отмечался дефицит молодых невест. К 1964 г. достигли совершеннолетия девушки, родившиеся в период послевоенного компенсационного повышения рождаемости” [27], но при этом наблюдался дисбаланс в соотношении полов (максимален в 1956 г.: на 1000 женщин 641 мужчина). Колебания уровня рождаемости оказывали влияние на формирование брачной структуры Белгородского региона вплоть до 80-х годов. XX в. Лишь к 1979 г. намечилось сокращение диспропорций между полами: на 1000 женщин было 784 мужчины [28]. Можно предположить, что еще одной из причин гендерного дисбаланса данного периода являлась трудовая миграция, которая могла приводить к оттоку населения (преимущественно мужчин). Следует отметить, что в 40–50-е гг., вплоть до 70-х гг. область оставалась малоразвитым в экономическом отношении аграрным регионом, что приводило к оттоку трудовой силы. Индекс эндогамии уменьшился на 21% за 130 лет, причем с конца XIX века до 1978–1980 гг. отток населения из области увеличился на 19.6%. При этом максимальный отток населения на всех уровнях организации популяционной структуры (более выраженный на уровне села и района) приходился на период с 1951–1953 гг. по 1978–1980 гг. С 1980 г. по 2018 г. наблюдалась стабилизация брачно-миграционной структуры населения региона. Этому способствовали, с одной стороны, повышение рождаемости и восстановление пропорций между полами, с другой стороны, – активные миграции населения на территорию Белгородской области (особенно в 90-е гг.) из других регионов РФ, что нашло отражение в росте гетеролокальных браков.

Анализ динамики брачной структуры городского и сельского населения Белгородского региона показал, что в конце XIX – начале XX в. более 50% браков в сельской местности и более 60% в городах заключались между выходцами данной популяции. Остальные браки как среди городского населения, так и среди сельского населения в основном заключались между уроженцами одной губернии (порядка 90% и выше), в том числе одного уезда. На долю браков, регистрируемых между уроженцами разных губерний в данный период, приходилось менее 7%, и она была несколько выше среди городского населения (6.74%), чем среди сельского (2.41%). Как было описано выше, сельские поселения были более “закрыты”, чем городские

популяции. Однако если учесть, что в 1897 г. доля городского населения на территории, относящейся сейчас к Белгородской области, составляла всего 7.0%, то это объясняет преобладание изолакальных браков вплоть до середины XX в. [19]. Политические, социально-экономические и административно-территориальные преобразования начала-середины XX в. нашли свое отражение в изменении брачной структуры как сельского, так и городского (наиболее выражено) населения Белгородского региона. С 1951–1953 гг. по 1978–1980 гг. происходило экспоненциальное уменьшение доли внутриобластных браков, в том числе внутрирайонных, и наблюдался значительный рост гетеролокальных браков. Последующие десятилетия среди городских жителей продолжалось незначительное снижение доли изолакальных браков (на всех уровнях популяционной структуры) и увеличение гетеролокальных браков. Среди сельского населения, наоборот: увеличилась доля браков, регистрируемых между выходцами из одной области, практически не изменилась доля внутрирайонных браков и увеличилась доля браков между односельчанами, на фоне снижения доли гетеролокальных браков.

Наши данные согласуются с данными по соседней Курской обл., где в XIX в. 97–98% браков заключалось внутри губернии, в том числе внутри одного уезда и одного села (50%) [12]. Такой же высокий уровень локальных браков был характерен и для малых городов Курского региона, за исключением г. Курска. Ко второй половине XX в. в популяциях всех уровней существенно снизилась доля изолакальных браков: браки между выходцами из одной (Курской) области были на уровне 74% среди сельского населения (в том числе 16% среди односельчан) и 55% в городах (4% между жителями города). Тенденция снижения всех типов изолакальных браков сохранилась только для сельских популяций Курского региона, тогда как в городских – доля внутрирайонных браков и браков, заключаемых между уроженцами Курской области, увеличилась. С 1865–1873 гг. по 1993–1995 гг. на территории Курского региона произошло уменьшение в несколько раз изолакальных браков (на 1/3 во всех популяциях) [10–12].

Следует отметить, что за 130-летний период эндогамность браков существенно уменьшилась (в среднем в 2 раза). Размер элементарной популяции в Белгородской области изменился с уровня, ограниченного территорией села, до территориальных границ района и области. Аналогичная изменчивость показателя индекса эндогамии была установлена ранее на территории соседней Курской области, где с 1865 г. по 1995 г. произошло снижение (в 2 раза) данного параметра. Авторами работ [10–12] показано, что в 1987–1990 гг. в сельских районных популяциях Курской области индекс эндогамии составлял 0.460, а в 1995 г. – 0.419 в

городах и 0.440 в селах. Эти результаты полностью соответствуют нашим данным по районным популяциям Белгородской обл., где к 1993 г. уровень эндогамии составил 0.467 (0.412 в городах и 0.424 в селах). Данные по уровню эндогамии Центрального Черноземья согласуются с результатами популяционно-демографических исследований, выполненных в Костромской обл., где по районам области индекс эндогамии изменялся от 0.48 до 0.64 [29].

При популяционно-генетическом изучении населения Ростовской обл. получены несколько иные результаты [30–33]). Средневзвешенное значение индекса эндогамии составляло 0.34 среди сельского населения Ростовской обл. При этом в пределах Ростовской области регистрировалось от 41 до 69% браков, а в пределах России — от 78 до 85%. Эти данные позволили авторам [30–32] заключить, что к началу XXI в. уровень элементарной популяции для сельского населения Ростовской области ограничивается территорией практически всей области.

Следует отметить, что брачно-миграционные характеристики популяций имеют важное медико-генетическое значение, так как влияют на распространенность как моногенной наследственной патологии, так и других наследственно детерминированных заболеваний среди населения [14, 32–40]. В связи с этим данные показатели необходимо учитывать при планировании популяционно-генетических и медико-генетических исследований [2, 5, 14, 34].

Среди населения юга Центральной России за 130-летний период положительная брачная ассортативность по месту рождения супругов снизилась в 1.5 раза (с 0.394 до 0.264) без существенных различий в уровне и динамике между городским и сельским населением (за исключением периода 1951–1953 гг., когда показатель брачной ассортативности в городе был в 1.4 раза выше, чем в селе) ($K = 0.252$).

Можно отметить, что наши результаты анализа динамики брачной ассортативности по месту рождения супругов согласуются с аналогичными данными по соседней Курской области за период с 1865 г. по 1995 г. Автором работы [12] было показано, что положительная брачная ассортативность среди населения была максимальна в конце XIX в. и снизилась к 1995 г. Так же, как и в белгородской популяции, брачная избирательность по месту рождения в курской популяции в 1895–1900 гг. была более значима среди сельских жителей (0.491), чем среди городских (0.443), а спустя столетие эти различия стали менее выраженными.

Анализ брачной структуры московской популяции [41] показал, что ассортативность по признаку “место рождения” была особенно велика в конце XIX — начале XX в. (0.71). Как отмечают авторы, в

этот период высокие индексы брачной избирательности были характерны для коренных москвичей и уроженцев большинства центральных и белорусских губерний, а также Кавказа [41, 42]. К концу XX в. данный показатель значительно снизился и составил 0.12 в Московском регионе [41].

Снижение индекса ассортативности по месту рождения супругов за два поколения было зарегистрировано и в Кемеровской обл. (среди шорцев Таштагольского района): с 79.63% в 1970–1975 гг. до 70.64% в 2000–2005 гг. [38].

Работа выполнена без финансирования, на личные средства.

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. <https://www.who.int/ru/news/item/20-07-2022-who-report-shows-poorer-health-outcomes-for-many-vulnerable-refugees-and-migrants> (дата обращения 14.01.2023 г.)
2. Курбатова О.Л., Янковский Н.К. Миграция — основной фактор популяционной динамики городского населения России // Генетика. 2016. Т. 52. № 7. С. 831–851. <https://doi.org/10.7868/S0016675816070067>
3. Щербакова Е.М. Демографический барометр. Международная миграция по оценкам 2022 года // Демоскоп Weekly. 2023. № 973–974.
4. Парадеева Г.М. Факторы подразделенности русских популяций Нечерноземья: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 1987. 22 с.
5. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Свежинский Е.А. Генетико-демографические процессы в московской популяции в середине 1990-х годов. Миграция и эмиграция как факторы изменения генетического разнообразия популяции // Генетика. 1997. Т. 33. № 12. С. 1688–1696.
6. Тарская Л.А., Ельчинова Г.И., Винокуров В.Н. Анализ брачных миграций в двух районах Республики Саха (Якутия) // Генетика. 2003. Т. 39. № 12. С. 1698–1701.
7. 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>
8. Ельчинова Г.И., Зинченко Р.А. Гендерная дифференциация межэтнических браков населения северного Кавказа // Мед. генетика. 2023. Т. 22. №

2. С. 48–51.
<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.02.48-51>
9. *Ельчинова Г.И., Макаов А.Х., Ревазова Ю.А. и др.* Брачно-миграционная характеристика черкесов (конец XX века) // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 3. С. 385–387.
<https://doi.org/10.7868/S0016675816030061>
10. *Иванов В.П., Чурносоев М.И., Кириленко А.И.* Брачная структура популяции г. Курска // *Генетика*. 1996. Т. 32. № 3. С. 440–444.
11. *Иванов В.П., Чурносоев М.И., Кириленко А.И.* Популяционно-демографическая структура населения Курской области. Миграционные процессы // *Генетика*. 1997. Т. 33. № 3. С. 375–380.
12. *Васильева Л.И.* Динамика генетико-демографической структуры населения Курской области. Миграционные процессы // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 4. С. 546–553.
13. *Чурносоев М.И., Сорокина И.Н., Балановская Е.В.* Генофонд населения Белгородской области. Динамика индекса эндогамии в районных популяциях // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 8. С. 1117–1125.
14. *Сорокина И.Н., Рудых Н.А., Безменова И.Н. и др.* Популяционно-генетические характеристики и генетико-эпидемиологическое исследование ассоциаций генов-кандидатов с мультифакториальными заболеваниями // *Науч. результаты биомед. исследований*. 2018. Т. 4. № 4. С. 20–30.
15. *Сергеева К.Н., Сорокина И.Н.* Генетико-демографические особенности белгородского региона // *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия Естественные и технические науки*. 2022. № 9. С. 56–60.
<https://doi.org/10.37882/2223-2966.2022.09.31>
16. *Шаповалова В.А.* Белгородоведение: Учебник для общеобразовательных учреждений. Белгород: БелГУ, 2002. 410 с.
17. *Григорьева Г.Н.* География Белгородской области. Белгород: БелГУ, 1996. 144 с.
18. *Чугунова Н.В., Полякова Т.А., Романова И.В.* Результаты и тренды развития региональной системы расселения в эпоху неолиберальной урбанизации (на материалах Белгородской области) // *Географический вестник Geographical bulletin*. 2019. Т. 2(49). С. 34–45.
<https://doi.org/10.17072/2079-7877-2019-2-34-45>.
19. *Бубликов В.В., Маркова В.В.* Формирование этнического состава населения Белгородской области (часть первая: XIX век–середина XX столетия) // *Науч. ведомости. Серия Философия. Социология. Право*. 2013. № 23 (166). Вып. 26. С. 49–59.
20. *Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю.* Роль миграционных процессов в формировании брачной структуры московской популяции. Сообщ. 3. Брачная ассортативность как фактор, противодействующий аутбридингу // *Генетика*. 1988. Т. 24. № 9. С. 1689–1695.
21. *Плохинский Н.А.* Биометрия. М.: МГУ. 1970. 365 с.
22. *Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю.* Городские популяции: возможности генетической демографии (миграция, подразделенность, аутбридинг) // *Информ. вестник ВОГиС*. 2006. Т. 10. № 1. С. 155–188.
23. *Ельчинова Г.И.* Опыт применения методов популяционно-генетического анализа при изучении популяций России с различной генетико-демографической структурой: Автореф. дисс....докт. биол. наук. М., 2001. 48 с.
24. Белгородская энциклопедия. Белгород, 2023. — URL: <https://beluezd.ru/alekseevka-istoricheskaya-khronika.html> (дата обращения 14.01.2023).
25. *Полищук Н.С., Пономарев А.П.* Украинцы. М., 2000. 271 с.
26. *Чижикова Л.Н.* Русско-украинское пограничье. М.: Наука, 1988. 256 с.
27. *Иванова Е.И.* Трансформация брачности в России в XX веке: основные этапы // *Демоскоп Weekly*. Электронная версия бюлл. Население и общество. http://www.demoscope.ru/weekly/knigi/konfer/konfer_010.html (Дата обращения 25.04.2023).
28. Как эхо войны отразилось на молодом поколении россиян // *Информ. выпуск* от 22.06.2021 г. <http://zato-znamensk.ru/node/3112> (дата обращения 02.05.2023).
29. *Ельчинова Г.И., Зинченко Р.А., Осипова Е.В.* Методы обработки популяционно-генетических данных: демографические анкеты // *Мед. генетика*. 2004. Т. 3. № 7. С. 313–320.
30. *Кривенцова Н.В.* Индекс эндогамии в Ростовской области // *Мед. генетика*. 2005. Т. 4. № 5. С. 212b–212.
31. *Кривенцова Н.В., Ельчинова Г.И., Амелина С.С., Зинченко Р.А.* Брачно-миграционная характеристика населения Ростовской области // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 7. С. 981–985.
32. *Амелина С.С.* Эпидемиология моногенной наследственной патологии и врожденных пороков развития у населения Ростовской области: Дисс. ... докт. мед. наук. ГУ “Медико-генетический научный центр РАМН”, 2006. 258 с.
33. *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2004. 431 с.
34. *Сергеева К.Н., Сокорев С.Н., Ефремова О.А. и др.* Анализ уровня эндогамии популяции как основа популяционно-генетических и медико-генетических исследований // *Науч. результаты биомед. исследований*. 2021. Т. 7. № 4. С. 375–387.
35. *Рашина О.В.* Ассоциации полиморфных вариантов генов-кандидатов с развитием *H. pylori* — негативной язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у жителей Центрального

- Черноземья России // Науч. результаты биомед. исследований. 2023. Т. 9. № 3. С. 333–346. <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2023-9-3-0-4>
36. Иванова Т.А. Пол-специфические особенности межлокусных взаимодействий, определяющих подверженность к гипертонической болезни // Науч. результаты биомед. исследований. 2024. Т. 10. № 1. С. 53–68. <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-3>
37. Eliseeva N., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al. *LOXL1* gene polymorphism candidates for exfoliation glaucoma are also associated with a risk for primary open-angle glaucoma in a Caucasian population from central Russia // Mol. Vis. 2021. V. 27. P. 262–269.
38. Moskalenko M.I., Milanova S.N., Ponomarenko I.V. et al. Study of associations of polymorphism of matrix metalloproteinases genes with the development of arterial hypertension in men // Kardiologiya. 2019. V. 59. № 7S. P. 31–39. doi:10.18087/cardio.2598
39. Bushueva O., Solodilova M., Churnosov M. et al. The flavin-containing monooxygenase 3 gene and essential hypertension: The joint effect of polymorphism E158K and cigarette smoking on disease susceptibility // Int. J. Hypertens. <https://doi.org/10.1155/2014/712169>
40. Polonikov A., Rymarova L., Klyosova E. et al. Matrix metalloproteinases as target genes for gene regulatory networks driving molecular and cellular pathways related to a multistep pathogenesis of cerebrovascular disease // J. Cell. Biochem. 2019. V. 10. P. 16467–16482. <https://doi.org/10.1002/jcb.28815>
41. Свежинский Е.А., Курбатова О.Л. Опыт исторической реконструкции генетико-демографической структуры московской популяции на рубеже XIX–XX веков // Генетика. 1999. Т. 35. № 8. С. 1149–1159.
42. Ульянова М. В., Кучер А. Н., Лавряшина М. Б. Генетико-демографическое изучение шорцев Таштагольского района Кемеровской области: динамика брачно-миграционной структуры // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. С. 133–139.

Dynamics of the Population Structure of the South of Central Russia Over a 130-Year Period. Migration Processes

K. N. Sergeeva¹, S. N. Sokorev¹, I. V. Batlutskaya¹, I. N. Sorokina^{1, *}

¹*Belgorod National Research University, Belgorod, 308015 Russia*

^{*}*e-mail: Sorokina_5@mail.ru*

This article assesses the dynamics of indicators characterizing marriage and migration parameters among the population of the south of Central Russia from 1890 to 2018. In the structure of marriages over the 130-year period, there was a significant decrease (1.6–2.2 times) in the share of isolocal marriages and a significant increase the share of heterolocal marriages (almost 11 times), while the size of the elementary population increased from the village level to the district/region level. From 1890 to 2018 the dynamics of isolocal marriages are more pronounced among the urban populationn and the dynamics of heterolocal marriages are more pronounced among rural residents. Over the 130-year period positive marital assortativity by place of birth of spouses decreased by 1.5 times without significant differences in the level and dynamics of marriage selectivity by place of birth of spouses between the urban and rural populations (except for the period 1951–1953). A strong direct correlation was established between the level of marital assortativeness and the share of marriages concluded within one region and one district ($r = 0.90$, $p < 0.05$) and a negative one – on the share of heterolocal marriages (concluded between immigrants from different regions) ($r = -0.90$, $p < 0.05$).

Keywords: marriage structure, migration, assortativity of marriages.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ И АННОТАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМА *Triticum militinae* – “ЕСТЕСТВЕННОГО МУТАНТА” ТЕТРАПЛОИДНОЙ ПШЕНИЦЫ *Triticum timopheevii* Zhuk.

© 2024 г. А. Р. Кулуев¹*, Р. Т. Матниязов¹, Б. Р. Кулуев¹, Л. Ю. Привалов¹, А. В. Чемерис¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: kuluev.azat91@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принята к публикации 30.01.2024 г.

Triticum militinae Zhuk. et Migusch. – тетраплоидная пшеница с геномом GAA, считается естественным голозерным мутантом *Triticum timopheevii* Zhuk. Ранее для этой пшеницы проводились эксперименты по изучению кариотипа и особенностей скрещивания. Для выяснения происхождения и родства *T. militinae* с другими представителями пшеницевых большой интерес представляет анализ ее хлоропластного генома, который оставался неизученным. Нами впервые было проведено секвенирование и аннотация полного хлоропластного генома *T. militinae*, размер которого оказался равным 135898 пн. В структуре пластома этой пшеницы имеются пара инвертированных повторов размером 21552 пн каждый, область маленькой единичной копии (SSC) – 12791 пн, и область большой единичной копии (LSC) – 80003 пн. В составе хлоропластного генома *T. militinae* аннотировано 132 структурных гена, из которых 85 белок-кодирующих, 31 ген тРНК и четыре гена рРНК.

Ключевые слова: пшеница, *Triticum militinae*, *Triticum timopheevii*, хлоропластный геном, секвенирование.

DOI: 10.31857/S0016675824080114 **EDN:** BFGXHU

Тетраплоидная пшеница *Triticum militinae* Zhuk. et Migusch. (пшеница Милитины) считается естественным мутантом тетраплоидной пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. Процесс обнаружения пшеницы Милитины от момента «выщепления» в посевах *T. timopheevii* в 1950 г. некоего мутанта до опубликования в 1969 г. информации о новом виде, названном *T. militinae* Zhuk. et Migusch., занял почти два десятилетия [1]. Но происхождение этого вида оставалось загадочным, и проведя ранее научное исследование, мы пришли к заключению, что это вполне может быть некий гибрид пшениц персидской и Тимофеева [2]. Схожее предположение высказал ранее и Н.А. Наврузбеков, отметивший, что *T. militinae* обнаруживает сходство с *T. persicum* ssp. *fuliginosum* и при скрещивании последней с *T. timopheevii* в F₁ образовывались черные плотные колосья, похожие на таковые у пшеницы Милитины [3]. Н.А. Наврузбеков заключил, что *T. militinae* представляет собой продукт интрогрессии части генома *T. persicum* в геном и цитоплазму *T. timopheevii*, при этом посчитал ее продуктом гибридизации этих видов. Но какой из этих видов

выступил материнской формой *T. militinae* можно выяснить путем анализа последовательностей хлоропластного генома этих пшениц. Поскольку о пластоме *T. militinae* до сих пор не было никакой информации, цель настоящей работы – секвенирование и аннотация хлоропластного генома пшеницы Милитины.

Семена *T. militinae* var. *albimilitinae* k-59942 (Белоруссия) были предоставлены Федеральным исследовательским центром Всероссийский институт генетических ресурсов растений (ВИР, Санкт-Петербург). Растения проращивались в теплице при 21 °С в течение трех недель, затем было собрано около 20 г зеленых листьев. Далее эти листья были помещены на 48 ч в холод (+4 °С) и темноту для уменьшения содержания крахмала.

Для выделения хлоропластной ДНК из листьев использовали метод сахарозного градиента [4] с некоторыми модификациями, к примеру, на этапе выделения хлоропластной ДНК из интактных хлоропластов использовали 0.15%-ный Triton X-100 к конечному объему образцов и далее применяли метод фенольно-хлороформной экстракции [5].

Гомогенизацию листьев проводили при помощи ступки и пестика в жидком азоте.

На начальном этапе секвенирования был проведен контроль качества выделенной хлоропластной ДНК. Для этого концентрация ДНК была измерена на спектрофотометре NanoDrop OneC (Thermo

Fisher Scientific, США) и проведена оценка соотношений A260/280 и A260/230. Количество ДНК определяли флуориметрическим методом с использованием набора SpectraQ BR (Raissol, Россия) и флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific). Подготовка ДНК-библиотек проводилась методом

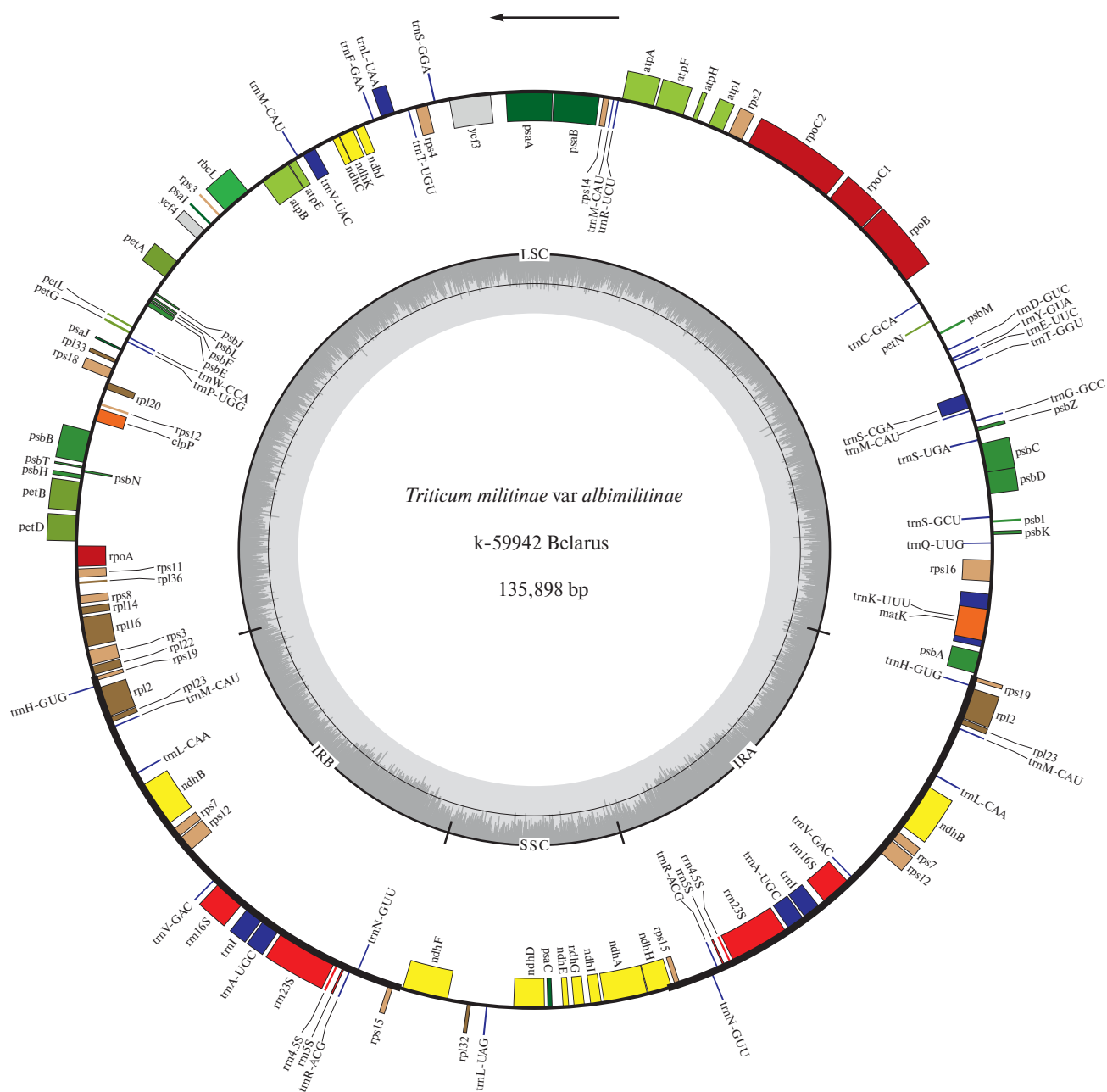


Рис. 1. Представление в виде кольца хлоропластного генома *T. militinae* var. *albimilitinae* k-59942. Визуализация пластома проведена при помощи ресурса OGDRAW. Разными цветами отображены гены, участок серого круга посередине отображает уровень GC-участков. IRA – инвертированная область повтора A, IRB – инвертированная область повтора B. Гены, расположенные за пределами внешнего круга, транскрибируются по часовой стрелке, а расположенные внутри гены – против часовой стрелки.

shotgun при помощи набора SG GM Plus (Raissol). В работу по секвенированию брали 200 нг хлоропластной ДНК. На первом этапе подготовки проводилась ферментативная фрагментация хлоропластной ДНК до размера фрагментов 350 пн с одновременным восстановлением концов. На втором этапе проводились лигирование адаптеров и очистка продукта реакции на магнитных частицах Smart beads (Raissol, Россия). На третьем этапе проводились индексная ПЦР и очистка продукта реакции на магнитных частицах Smart beads (Raissol). Контроль качества полученной ДНК-библиотеки проводили при помощи биоанализера Qsep400 (Biopric, Тайвань). Флуориметрическое измерение концентрации ДНК-библиотеки проводили с использованием набора SpectraQ BR (Raissol) и флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific). ДНК-библиотеки пулировали и проводили секвенирование при помощи набора FASTASeq 300 Sequencing Kit V1.0 100 M reads/flow cell на секвенаторе Genolab M (GeneMind, Китай). Режим секвенирования 2'-х 150 пн. Файлы формата base были демультиплексированы на приборе Genolab M с получением файлов с расширением fastq. В общей сложности было получено 13 млн чтений. Чистку чтений проводили при помощи программы Trimmomatic v0.22 [6]. Чтения, содержащие неопределенные нуклеотиды "N", были удалены. Сборку пластома проводили при помощи программы NOVOmap [7] с использованием последовательности хлоропластного генома *T. timopheevii* (KJ614408) в качестве референсного. Полный хлоропластный геном *T. militinae* был аннотирован при помощи ресурса Chloroplast Genome Annotation, Visualization, Analysis, and GenBank Submission 2 (CPGAVAS2) (<http://47.96.249.172:16019/analyzer/home>) [8]. Круговую карту хлоропластного генома визуализировали при помощи программы OGDRAW (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>) [9].

Размер хлоропластного генома *T. militinae* var. *albimilitinae* составил 135898 пн. Длина области инвертированных повторов — 21552 пн, области SSC — 12791 пн, области LSC — 80003 пн. Содержание GC-пар во всем пластидном геноме *T. militinae* — 38.3%, в области SSC оно составляет 32.19%, в области LSC — 36.28%. В области IR *T. militinae* GC-содержание достигает 43.91%.

У пшеницы Милитины было аннотировано 132 структурных гена, из которых 85 белок-кодирующих, 31 ген тРНК и четыре гена рРНК. Семь генов, кодирующих белки (*rps19*, *rpl2*, *rpl23*, *ndhB*, *rps7*, *rps12*, *rps15*), восемь генов тРНК (*trnH-GUG*, *trnM-CAU*, *trnL-CAA*, *trnV-GAC*, *trnT-CGU*, *trnA-UGC*, *trnR-ACG*, *trnN-GUU*), четыре гена рРНК (*rRNA4.5*, *rRNA23*, *rRNA16* и *rRNA5*) были дублированы из-за того, что находятся в области повтора IR. При этом в SSC-области обнаружено девять белок-кодирующих генов и один ген тРНК, в LSC-области — 69

белок-кодирующих генов и 22 гена тРНК. Кроме того, из 132 генов 14 имеют по одному интрону (*trnK-UUU*, *rps16*, *trnS-CGA*, *atpF*, *trnV-UAC*, *petB*, *petD*, *rpl16*, *rpl2*, *ndhB*, *trnI-GAU*, *trnA-UGC*, *ndhA*, *trnL-UAA*) и один ген (*ycf3*) — два интрона. Самый крупный интрон (2558 пн) находится в гене *trnK-UUU*, внутри которого располагается другой ген — *matK*. Также в хлоропластном геноме *T. militinae* присутствует транс-сплайсируемый ген *rps12*. Все полученные результаты представлены на рис. 1 в виде кольцевой структуры, полученной при помощи программы OGDRAW. Различные цветовые блоки отображают принадлежность генов к тем или иным функциональным группам.

Представляет большой интерес происхождение пшеницы Милитины, чаще всего она считается мутантом пшеницы Тимофеева. Но секвенирование хлоропластного генома этого вида и его сравнение с другими подобными геномами пшениц показывает, что *T. militinae*, скорее всего, не мутант, а гибрид, чему мы уделили отдельное внимание в нашей предыдущей публикации [2]. Однако для окончательных выводов требуются еще дополнительные исследования хлоропластных геномов других пшениц, в особенности *T. persicum*. Нуклеотидная последовательность хлоропластного генома *T. militinae* была депонирована в GenBank и доступна по номеру OR936057.

Авторы выражают искреннюю признательность коллективу Отдела пшениц Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР, Санкт-Петербург) за предоставление семенного материала для исследований.

Работа выполнена в рамках государственного контракта по проекту РНФ № 23-24-00275 “Фило-генетические взаимоотношения отдельных видов пшенично-эгилопсного комплекса разных уровней плоидности через призму их полных хлоропластных геномов с прицелом на происхождение В- и Г-субгеномов полиплоидных форм пшениц линий *turgidum*—*aestivum* и *timopheevii*—*zhukovskiy*”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объектов животных и людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жуковский П.М., Мигушова Э.Ф. Наиболее высокоиммунный эндемичный генофонд для выведения устойчивых сортов пшеницы путем отдаленной гибридизации // Вестник с.-х. наук. 1969. № 2. С. 9–20.
2. Кулуев А.Р., Матниязов Р.Т., Кулуев Б.Р., Чермерис А.В. *Triticum militinae* Zhuk. et Migusch. — точно не мутант *T. timopheevii* Zhuk., как считалось

- долгие годы // *Biomics*. 2023. V. 15. № 3. P. 213–217. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2023-19>
3. Наврузбеков Н.А. К происхождению *Triticum militinae* Zhuk. et Migusch. // Ботанические и генетические ресурсы флоры Дагестана. Махачкала: Даг. фил. АН СССР, 1981. С. 121–122.
 4. Shi C., Hu N., Huang H. et al. An improved chloroplast DNA extraction procedure for whole plastid genome sequencing // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031468>
 5. Graham D.E. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms of large tissue masses // *Anal. Biochem.* 1978. V. 78. P. 673–678.
 6. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
 7. Wu P., Xu C., Chen H. et al. NOVOWrap: An automated solution for plastid genome assembly and structure standardization // *Mol. Ecol. Res.* 2021. V. 21(6). P. 2177–2186. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13410>
 8. Shi L., Chen H., Jiang M. et al. CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. P. W65–W73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz345>
 9. Greiner S., Lehwark P., Bock R. Organellar Genome DRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. P. W59–W64.

Sequencing and Annotation of the Chloroplast Genome of *Triticum militinae* – a “Natural Mutant” of Tetraploid Wheat *Triticum timopheevii* Zhuk.

A. R. Kuluev¹, *, R. T. Matniyazov¹, B. R. Kuluev¹, L. Yu. Privalov¹, A. V. Chemeris¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Federal State Budgetary Scientific Institution of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

*e-mail: kuluev.azat91@yandex.ru

Triticum militinae Zhuk. et Migusch. – tetraploid wheat with the GAA genome, considered a natural naked mutant of *T. timopheevii* Zhuk. Previously, experiments were conducted for this wheat to study the karyotype and crossing characteristics. To clarify its origin and relationship with other representatives of the wheat family, analysis of the chloroplast genome of *T. militinae*, which has previously remained unstudied, is of great interest. The sucrose gradient method was used to isolate chloroplast DNA from leaves. Sequencing was performed using the FASTASeq 300 Sequencing Kit V1.0 100 M reads/flow cell on a Genolab M sequencer (GeneMind, China). For the first time, we sequenced and annotated the complete chloroplast genome of *T. militinae* with a size of 135898 bp. In the structure of the plastid genome there are a pair of inverted repeats with a size of 21552 bp each, the region of a small single copy (SSC) – 12791 bp and the region of a large single copy (LSC) – 80003 bp. As part of the chloroplast genome of *T. militinae* 132 structural genes were found, of which 85 protein-coding genes, 31 tRNAs and 4 rRNA genes.

Keywords: wheat, *Triticum militinae*, *Triticum timopheevii*, chloroplast genome, sequencing.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОЙ ГОРНОЙ КАВКАЗСКОЙ ПЧЕЛЫ *Apis mellifera caucasica*

© 2024 г. М. Д. Каскинова^{1, *}, Л. Р. Гайфуллина¹, Е. С. Салтыкова¹

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

*e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

Поступила в редакцию 01.02.2024 г.

После доработки 16.02.2024 г.

Принята к публикации 20.02.2024 г.

В данном исследовании приводятся результаты сравнительного генетического анализа пчел подвита *Apis mellifera caucasica* с подвидами *A. m. carnica* и *A. m. mellifera*. Мы выполнили анализ полиморфизма девяти микросателлитных локусов (*Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28* и *A43*) и установили гаплотипы на основе анализа нуклеотидной изменчивости митохондриального маркера *tRNA^{Leu}-COII*. Анализ генетической структуры трех подвидов медоносной пчелы, широко распространенных на территории России, показал значимый уровень их дифференциации даже при использовании небольшого набора микросателлитных локусов. Оценка распространенности гаплотипов *tRNA^{Leu}-COII* в трех исследуемых выборках показала, что для *A. m. caucasica* преобладающим гаплотипом является C2j.

Ключевые слова: локус *tRNA^{Leu}-COII*, микросателлиты, *Apis mellifera caucasica*, дифференциация подвидов.

DOI: 10.31857/S0016675824080125 **EDN:** BFGGHW

Apis mellifera caucasica Gorb. или серая горная кавказская пчела впервые была описана в 1916 г. [1]. Эта пчела привлекла внимание пчеловодов и ученых своей продуктивностью, незлобивостью и способностью опылять красный клевер [2]. Ареалом *Apis mellifera caucasica* является Кавказ [1–3]. На территории России она обитает в регионах Южного и Северо-Кавказского федеральных округов. Созданная в 1963 г. Краснополянская опытная станция осуществляет свою научную и хозяйственную деятельность по разведению этого подвида медоносной пчелы [4]. В начале XX в. начался массовый экспорт *A. m. caucasica* в другие регионы России и за рубеж [2]. Геном *A. m. caucasica* был расшифрован в 2020 г. китайскими учеными с помощью технологии секвенирования Pacbio (Genome assembly ASM1384120v1, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_013841205.1/). Помимо того в Генбанке зарегистрирован полный митохондриальный геном *A. m. caucasica* (GenBank ID: MN714160).

На основании морфометрических и генетических различий все известные подвиды были разделены на четыре эволюционные ветви: африканскую (А), западно- и североευропейскую (М), восточноевропейскую (С) и западно-центральноазиатскую (О) [3, 5, 6]. На основании этой

классификации *A. m. caucasica* принадлежит к эволюционной ветви О наряду с *A. m. anatoliaca*, *A. m. remipes*, *A. m. macedonica*, *A. m. cecropia* и *A. m. cypria* [3, 6]. В 1993 г. Л. Гарнери с соавт. установил, что с помощью полиморфизма межгенного локуса *tRNA^{Leu}-COII* (или *COI-COII*) мтДНК можно дифференцировать пчел из эволюционных ветвей А, М и С [7]. Этот метод, получивший название DnaI-тест, основан на анализе длин рестрикционных фрагментов межгенного локуса *tRNA^{Leu}-COII*. Подвид *A. m. caucasica* по морфометрическим и полногеномным данным относится к ветви О, но при этом имеет общие гаплотипы *tRNA^{Leu}-COII* с подвидами из эволюционной ветви С (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*) [8]. Следовательно, с помощью анализа данного локуса невозможно дифференцировать *A. m. caucasica* от подвидов из ветви С. Однако есть исследования, свидетельствующие о том, что подвиды из ветви С отличаются по частотам гаплотипов *tRNA^{Leu}-COII* [9, 10].

Цель настоящей работы – выявить генетические особенности популяции серой горной кавказской пчелы с помощью анализа микросателлитных локусов и межгенного локуса мтДНК *tRNA^{Leu}-COII*.

Для анализа полиморфизма микросателлитных локусов (*Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A113*, *A88*, *Ap049*,

A28 и A43) и межгенного локуса мтДНК *tRNAleu-COII* нами были сформированы три выборки. Выборка *A. m. caucasica* ($N = 90$) представлена пчелиными семьями, отобранными на Краснополянской опытной станции пчеловодства (Краснодарский край, Сочинский р-н, п. Красная Поляна) в период 2008–2020 гг. Выборка *A. m. mellifera* ($N = 93$) была отобрана в Бурзянском р-не Башкортостана, а также в Пермском крае. Выборка *A. m. carnica* ($N = 118$) была отобрана из пасек Республики Адыгея, Оренбургской обл., Узбекистана и Казахстана. Из исследуемых выборок нами были отобраны по 20 особей каждого подвида для оценки гаплотипов локуса *tRNAleu-COII* с помощью секвенирования.

ДНК выделяли из мышц торакса рабочих пчел с использованием набора ДНК-ЭКСТРАН-2 (ООО “СИНТОЛ”, Москва). Качество и количество тотальной ДНК анализировали на спектрофотометре Implen N60. Смесь ПЦР на десять образцов общим объемом 150 мкл включала 120 мкл дистиллированной воды, 15 мкл магниевого буфера, 3 мкл смеси DNTP (концентрация — 10 мкм каждого), по 5 мкл F-праймера и R-праймера (концентрация — 10 пикомоль/мкл) и 3 мкл Taq-полимеразы. Режим ПЦР: 3 мин 94 °C, затем 30 циклов с денатурацией 30 с при 94 °C, отжигом 30 с при 49 °C (для локуса *tRNAleu-COII*) и 55 °C (для микросателлитных локусов), элонгацией 60 с при 72 °C и конечной элонгацией 3 мин при 72 °C. Для визуализации продуктов амплификации использовали электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей детекцией в фотосистеме Gel Doc™ XR+ (BioRad, США).

Данные по микросателлитным локусам были использованы для определения генетической структуры выборок с помощью программы Structure 2.3.4 с заданным числом кластеров от 1 до 10. Количество предполагаемых групп (K) рассчитывали в Structure Harvester [11, 12]. Анализ был выполнен при помощи модели Admixture с указанием информации о географической локализации выборок (LocPrior) и с Burnin Period и MCMC, равных 10 000 и 100 000 повторов соответственно. Результаты анализа обрабатывали в CLUMPP 1.1.2 с помощью алгоритма FullSearch. Стандартное генетическое расстояние Nei [13] было рассчитано в POPULATION ver.1.2.32.

Секвенирование 60 амплификатов *tRNAleu-COII* выполнили в ООО “Синтол” (Москва). Последовательности ДНК редактировали и обрезали вручную с помощью программного обеспечения MEGA для получения согласованных последовательностей, которые затем выравнивали с ранее опубликованными последовательностями *tRNAleu-COII* с использованием алгоритма Clustal W. *In silico* DraI тест последовательностей *tRNAleu-COII* был выполнен с помощью Unipro UGENE ver. 36.

На первом этапе работы мы выполнили анализ полиморфизма девяти микросателлитных локусов (Ap243, 4a110, A24, A8, A113, A88, Ap049, A28 и A43) в выборках *A. m. caucasica*, *A. m. carnica* и *A. m. mellifera*. На рис. 1 представлены результаты кластерного анализа исследуемых выборок. DeltaK, используемая для расчета оптимального числа кластеров, достигла пиков при $K = 2$ ($\Delta K = 1479.4$) и при $K = 3$ ($\Delta K = 276.6$). При $K = 2$ выборки *A. m. caucasica* и *A. m. carnica* вошли в один кластер. Дифференциация трех подвидов наблюдалась при $K = 3$. Стандартное генетическое расстояние Nei между *A. m. caucasica* и *A. m. carnica* составило 0.269. В работе S. Nikolova с соавт. генетическое расстояние Nei между этими двумя подвидами составило 0.384 на основе анализа полиморфизма девяти микросателлитных локусов [14].

Следующим нашим шагом было установление гаплотипов локуса *tRNAleu-COII*. Последовательности гаплотипов с указанием географических данных доступны по ссылке <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22348063>. Уникальные последовательности *tRNAleu-COII* были депонированы в GenBank под номерами OR761847–OR76187.

На территории России обитают подвиды трех эволюционных ветвей: М (*A. m. mellifera*), С (*A. m. carnica*, *A. m. ligustica*) и О (*A. m. caucasica*). С помощью разделения продуктов амплификации локуса *tRNAleu-COII* в 8%-ном ПААГ было установлено, что все образцы *A. m. caucasica* и *A. m. carnica* имеют аллельный вариант Q, характерный для представителей эволюционной ветви С (фрагмент размером 571 пн), тогда как все образцы *A. m. mellifera* имели вариант PQQ размером 825 пн, характерный для ветви М. Несмотря на то, что мы не можем различать эволюционные ветви С и О с помощью анализа локуса *tRNAleu-COII*, нам было интересно узнать, существуют ли различия в частотах гаплотипов между *A. m. caucasica* и *A. m. carnica*. Секвенирование амплификатов локуса *tRNAleu-COII* показало, что из 20 семей *A. m. caucasica* 16 имели гаплотип C2j и две семьи имели варианты гаплотипа C2j — C2jd и C2jf. Оставшиеся две семьи имели гаплотипы C2с и C2l. В выборке *A. m. carnica* преобладающим гаплотипом был C2с. У *A. m. mellifera* гаплотип M17j был доминирующим. В табл. 1 представлен список выявленных гаплотипов.

Последовательности *tRNAleu-COII* из Генбанка, принадлежащие *A. m. caucasica* (Ap018404.1 из России, OP404074.1 и OP404073.1 из Турции, MN714160.1 из США), также относятся к эволюционной ветви С. Последовательности Ap018404.1, OP404074.1 и OP404073.1 относятся к гаплотипу C2j. MN714160.1 отличается от C2j только на одну замену. Образцы *A. m. caucasica* из Турции из работы S. Tozkar с соавт. также относятся к гаплотипу C2j [15]. Таким образом, по этим немногочисленным данным можно предположить, что для

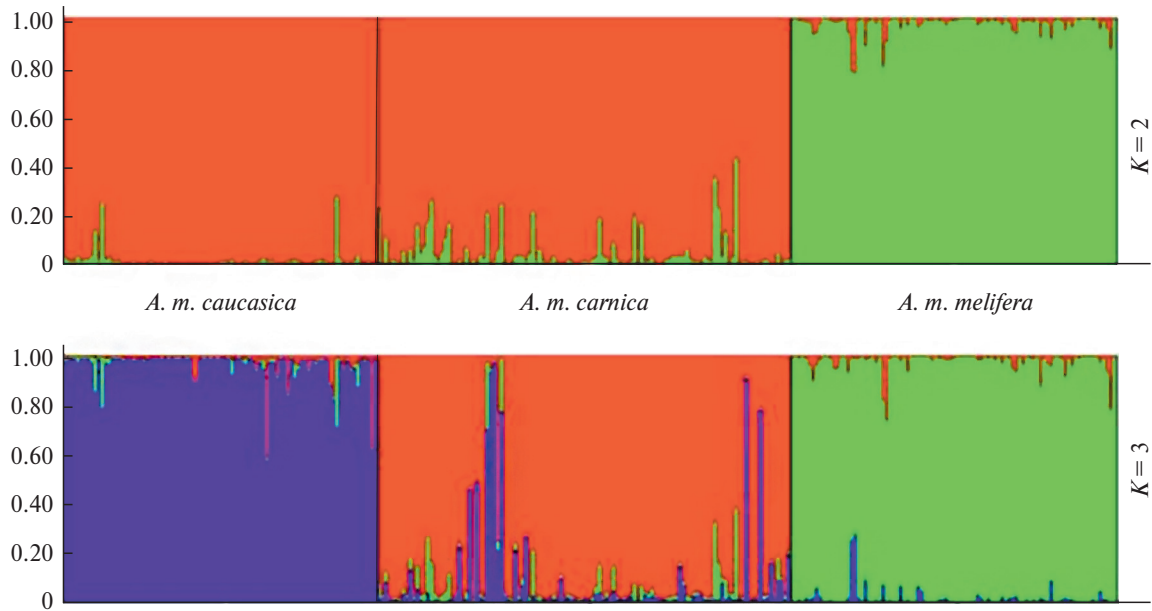


Рис. 1. Генетическая структура исследуемых выборок при $K = 2$ и $K = 3$.

популяции серой горной кавказской пчелы характерным гаплотипом является C2j.

Ранее предполагалось, что подвиды из ветви С отличаются по частотам гаплотипов *tRNAleu-COII* [9, 10]. Для итальянской пчелы *A. m. ligustica* доминирующим гаплотипом является C1 [10, 16–18]. Для *A. m. carnica*, по одним данным, доминирующим гаплотипом является C2с [9], по другим – C2j [10]. В первом случае идентификация гаплотипов была основана на *DraI* ПДРФ анализе амплификатов *tRNAleu-COII*. Пчелы были отобраны в Словении, в естественном ареале обитания данного подвида. Во втором случае пчелы были отобраны из разных штатов США, куда пчелы разных подвидов были завезены с XVII в. [2, 17, 19]. Авторы этой работы отмечают, что гаплотип C2j отличается от других гаплотипов гаплогруппы C2. Кроме того, указывается, что пчелы с гаплотипом C2j вошли в

общий кластер с образцами *A. m. caucasica* из Генбанка [10].

К эволюционной ветви О, помимо *A. m. caucasica*, относятся также подвиды *A. m. anatoliaca* (Турция), *A. m. remipes* (Армения), *A. m. macedonica* (Северная Македония, Греция, Болгария), *A. m. cecropia* (Греция) и *A. m. cyprica* (Кипр). Последовательности *tRNAleu-COII* *A. m. anatoliaca* и *A. m. macedonica*, доступные в Генбанке, также относятся к гаплотипам ветви С. Например, последовательности *A. m. anatoliaca* ON933877.1, MN701760.1–MN701763.1 относятся к гаплотипу C2, а FJ357798.1 – к C1. Гаплотипы *A. m. macedonica* отличаются на одну замену от гаплотипа C2. Для *A. m. remipes*, *A. m. cecropia* и *A. m. cyprica*, мы не обнаружили последовательностей *tRNAleu-COII*.

Митохондриальный локус *tRNAleu-COII* – информативный и простой в использовании генетический маркер [7]. С его помощью было

Таблица 1. Гаплотипы *tRNAleu-COII* в исследуемых выборках *A. m. caucasica*, *A. m. carnica* и *A. m. mellifera*

Выборка	Место сбора	<i>N</i>	Гаплотипы (число особей)
<i>A. m. caucasica</i>	Краснодарский край	20	C2j (16), C2jd (1), C2jf (1), C2c (1), C2l (1)
	Республика Адыгея	6	C2c (3), C2j (1), C2 (1), C1 (1)
<i>A. m. carnica</i>	Оренбургская область	5	C2c (4), C2j (1)
	Узбекистан	5	C2c (4), C2 (1)
	Казахстан	4	C2c (3), C3 (1)
<i>A. m. mellifera</i>	Республика Башкортостан	8	M17j (8)
	Пермский край	12	M17j (4), M17k (6), M17q (2)

проанализировано большое число популяций медоносных пчел во всем мире [10, 20–24]. Однако из-за отсутствия правил классификации гаплотипов *tRNA^{Leu}-COII* накопилось большое число неверно обозначенных гаплотипов. Лишь в 2017 г. появилась работа [25], в которой описываются правила номенклатуры гаплотипов и выполнена ревизия гаплотипов из ранее вышедших работ. В нашем исследовании мы использовали эти правила номенклатуры для классификации гаплотипов *tRNA^{Leu}-COII*.

Анализ генетической структуры представителей трех подвидов медоносной пчелы, широко распространенных на территории России, показал значимый уровень их дифференциации даже при использовании небольшого набора микросателлитных локусов. Оценка распространенности гаплотипов *tRNA^{Leu}-COII* в трех исследуемых выборках показала, что для *A. m. caucasica* преобладающим гаплотипом является C2j. Генетические исследования популяций медоносной пчелы имеют не только фундаментальное значение для сохранения уникальных генофондов, но и применяются племенными хозяйствами, специализирующимися на разведении определенных подвидов медоносной пчелы.

Дифференциация подвидов с помощью генетических и морфометрических маркеров осложняется тем, что популяции медоносных пчел почти не сохранились в границах своего естественного распространения из-за экспорта пчел. Данные по популяционным исследованиям медоносной пчелы разных подвидов очень разрозненные. Для решения этой проблемы, в первую очередь, необходимо найти аборигенные, или локальные, популяции пчел в границах их естественного распространения, а затем провести полногеномные исследования этих популяций, выполнить морфометрический анализ и анализ межгенного локуса *tRNA^{Leu}-COII*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00004, <https://rscf.ru/project/22-74-00004/> на оборудовании ЦКП УФИЦ РАН.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФБУН Ин-том биохимии и генетики – обособленным структурным подразделением Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, дата 30.01.2024, протокол № 2.

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. Горбачев К.А. Кавказская серая горная пчела (*Apis mellifera* var. *caucasica*) и место ее среди других пчел. Тифлис: тип. Труд, 1916. 39 с.
2. Аннатов В.В. Породы медоносной пчелы. Москва: Изд-во моск. об-ва испытателей природы, 1948. 183 с.
3. Ruttner F. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Berlin: Springer, 1988. 291 p.
4. Любимов Е.М., Сокольский С.С., Савушкина Л.Н., Бородачев А.В. Селекция пчел серой горной кавказской породы и производство продукции в пчелоразведенческом хозяйстве. Рязань: Изд-во Ряз. обл. тип., 2013. 192 с.
5. Cridland J.M., Tsutsui N.D., Ramirez S.R. The complex demographic history and evolutionary origin of the western honey bee *Apis mellifera* // Genome Biol. Evol. 2017. V. 9. P. 457–472. <https://doi.org/10.1093%2Fgbe%2Fevx009>
6. Momeni J., Parejo M., Nielsen R.O., Langa J., et al. Authoritative subspecies diagnosis tool for European honey bees based on ancestry informative SNPs // BMC Genomics. 2021. V. 22. № 101. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07379-7>
7. Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.-M. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. // Experientia. 1993. V. 49. P. 1016–1021. <https://doi.org/10.1007/BF02125651>
8. Cornuet J.M., Garnery L. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications // Apidologie. 1991. V. 22. P. 627–642.
9. Susnik S., Kozmus P., Poklukar J., Meglic V. Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia // Apidologie. 2004. V. 35. P. 623–636. <https://doi.org/10.1051/apido:2004061>
10. Alburaki M., Madella S., Lopez J., et al. Honey bee populations of the USA display restrictions in their mtDNA haplotype diversity // Frontiers in Genetics. 2023. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1092121>
11. Earl D.A., vonHoldt B.M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation Genetics Resources. 2012. V. 4(2). P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
12. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study // Mol. Ecol. 2005. V. 14(8). P. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
13. Nei M. Molecular evolutionary genetics // DNA Polymorphism Within and Between Populations. N. Y.: Columbia Univ. Press, 1987. P. 254–285.

14. Nikolova S.R., Bienkowska M., Gerula D., Ivanova E.N. Microsatellite DNA polymorphism in selectively controlled *Apis mellifera carnica* and *Apis mellifera caucasica* populations from Poland // Arch. Biol. Sci. 2015. V. 67(3). P. 889–894. <https://doi.org/10.2298/ABS141102048N>
15. Tozkar C.O. Genetic structure of honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) subspecies based on *tRNA^{Leu}-COX2* and *ND5* regions of mtDNA // Applied Ecol. and Environ. Res. 2020. V. 18(2). https://doi.org/10.15666/aeer/1802_22692284
16. Franck P., Garnery L., Celebrano G. et al. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*) // Mol. Ecol. 2000. V. 9. P. 907–921. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00945.x>
17. Carpenter M.H., Harpur B.A. Genetic past, present, and future of the honey bee (*Apis mellifera*) in the United States of America // Apidologie. 2021. V. 52. P. 63–79. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00836-4>
18. Kaskinova M.D., Gaifullina L.R., Saltykova E.S. Haplotypes of the *tRNA^{Leu}-COII* mtDNA region in Russian *Apis mellifera* populations // Animals. 2023. V. 13. <https://doi.org/10.3390/ani13142394>
19. Marcelino J., Braese C., Christmon K. et al. The movement of western honey bees (*Apis mellifera* L.) among U.S. States and territories: History, benefits, risks, and mitigation strategies // Front. Ecol. Evol. 2022. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.850600>
20. Collet T., Ferreira K., Arias M. et al. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA *COI*–*COII* patterns // Heredity. 2006. V. 97. P. 329–335. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800875>
21. Oleksa A., Kusza S., Tofilski A. Mitochondrial DNA suggests the introduction of honeybees of african ancestry to East-Central Europe // Insects. 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3390/insects12050410>
22. Chavez-Galarza J., Lopez-Montanez R., Jimenez A. et al. Mitochondrial DNA variation in Peruvian honey bee (*Apis mellifera* L.) populations using the *tRNA^{Leu}-cox2* intergenic region // Insects. 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3390/insects12070641>
23. Tanasković M., Erić P., Patenković A. et al. MtDNA analysis indicates human-induced temporal changes of Serbian honey bees diversity // Insects. 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3390/insects12090767>
24. Salehi S., Nazemi-Rafie J. Discrimination of Iranian honeybee populations (*Apis mellifera meda*) from commercial subspecies of *Apis mellifera* L. using morphometric and genetic methods // J. of Asia-Pacific Entomology. 2020. № 23. P. 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.04.009>
25. Chavez-Galarza J., Garnery L., Henriques D. et al. Mitochondrial DNA variation of *Apis mellifera iberiensis*: Further insights from a large scale study using sequence data of the *tRNA^{Leu}-cox2* intergenic region // Apidologie. 2017. V. 48. P. 533–544.

Genetic Characteristics of the Gray Mountain Caucasian Bee *Apis mellifera caucasica*

M. D. Kaskinova^{1, *}, L. R. Gaifullina¹, E. S. Saltykova¹

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

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

In this study we present the results of a comparative genetic analysis of bees of the *Apis mellifera caucasica* subspecies with the subspecies *A. m. carnica* and *A. m. mellifera*. We performed polymorphism analysis of nine microsatellite loci (*Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28*, and *A43*) and determined the haplotypes of the *tRNA^{Leu}-COII* locus. Analysis of the genetic structure of representatives of three subspecies of honey bees, widespread in Russia, showed a significant level of their differentiation even when using a small set of microsatellite loci. An assessment of the prevalence of *tRNA^{Leu}-COII* haplotypes in the three studied samples showed that for *A. m. caucasica* the predominant haplotype was C2j.

Keywords: *tRNA^{Leu}-COII*, microsatellites, *Apis mellifera caucasica*, subspecies differentiation.