ISSN 0016-6758

Том 59, Номер 1

Январь 2023

ЖУРНАЛ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ГЕНЕТИКА

www.sciencejournals.ru

300 лет Российская Академия Наук

СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 1, 2023

Обзорные и теоретические статьи

Факторы, влияющие на прорастание зерна на корню у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), и методы их оценки

А. В. Федяева, Е. А. Салина, В. К. Шумный 5

Общая генетика

nm-ТЕСТ – усовершенствованная версия альфа-теста для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающая более высокой чувствительностью по отношению к генотоксическим факторам

Е. И. Степченкова, Ю. В. Андрейчук, Д. В. Афанасова, С. П. Задорский, С. Г. Инге-Вечтомов 18

Влияние гена *aPKC*, кодирующего атипичную протеинкиназу С, на продолжительность жизни *D. melanogaster* зависит от уровня экспрессии протеинкиназы GSK3

М. В. Тростников, Е. Р. Веселкина, Ю. А. Андреев, А. Ю. Хрячкова, Н. В. Рощина, Е. Г. Пасюкова 26

Генетика растений

Изучение полиморфизма гена *Myb114* у культур вида капуста огородная (*Brassica oleracea* L.) В связи с регуляцией биосинтеза антоцианов на основе сравнения с MYB-факторами овощных пасленовых культур

Д. А. Фатеев, Ф. А. Беренсен, А. М. Артемьева, О. Г. Бабак, К. К. Яцевич, Е. В. Дрозд, А. В. Кильчевский 39

Маркеры хлоропластной ДНК в исследовании филогеографии робуроидных дубов (*Quercus* L. секции *Quercus*, Fagaceae) крымско-кавказского региона

С. А. Семерикова 50

Влияние внесения различных доз известкового мелиоранта в почву на картирование QTL у яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

Ю. В. Чесноков, М. А. Фесенко, А. И. Иванов, Д. В. Русаков, Н. В. Кочерина, У. Ловассер, А. Бёрнер 65

Генетика животных

Изучение популяционно-генетической структуры африканской скумбрии *Scomber colias* Gmelin, 1789 (Scombridae) в Центрально-Восточной Атлантике

А. Н. Строганов, А. И. Никитенко, Т. А. Ракицкая, В. А. Беляев 80

Исследование генетического разнообразия в популяции кыргызского горного мериноса с использованием микросателлитных локусов

Ж. Т. Исакова, А. Б. Бектуров, Т. Д. Чортонбаев, В. Н. Кипень, С. Б. Мукеева, У. А. Шергазиев, К. А. Айтбаев 89

Определение генетической системы спаривания у живородящего морского окуня *Sebastes taczanowskii* Steindachner, 1880

Н. М. Батищева, В. Д. Ягодина, В. А. Брыков 97

Генетика человека

Митохондриальный генофонд украинцев в контексте изменчивости целых митогеномов у славянских народов

Б. А. Малярчук, М. В. Деренко 106

Роль rs2238296 гена митохондриальной ДНК-полимеразы гамма в сочетании с полиморфными вариантами генов антиоксидантной защиты организма в развитии постинфарктной аневризмы левого желудочка

Е. А. Кужелева, А. А. Гарганеева, О. В. Тукиш, А. К. Несова, М. В. Голубенко, С. Л. Андреев, В. М. Шипулин 115

Contents

Vol. 59, No. 1, 2023

Reviews and Theoretical Articles

Pre-Harvest Sprouting in Soft Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Evaluation Methods

A. V. Fedyaeva, E. A. Salina, and V. K. Shumny 5

General Genetics

nm-Test – An Improved Version of the Alpha-Test in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* with a Higher Sensitivity to Genotoxic Factors

E. I. Stepchenkova, Yu. V. Andreychuk, D. V. Afanasova, S. P. Zadorsky, and S. G. Inge-Vechtomov 18

The Effect of the *aPKC* Gene Encoding Atypical Protein Kinase C on the Lifespan of *Drosophila melanogaster* Depends on the Expression Level of Protein Kinase GSK3

M. V. Trostnikov, E. R. Veselkina, Y. A. Andreev, A. Y. Khryachkova, N. V. Roshina, and E. G. Pasyukova 26

Plant Genetics

Study of *Myb114* Gene Polymorphism in the Cole Crops (*Brassica oleracea* L.) in Connection with Anthocyanin Biosynthesis Regulation Based on Comparison with the MYB Factors of Vegetable Nightshades (Solanaceae)

D. A. Fateev, F. A. Berensen, A. M. Artemyeva, O. G. Babak, K. K. Yatsevich, E. V. Drozd, and A. V. Kilchevsky 39

Chloroplast DNA Markers on the Phylogeography Study of Roburoid Oaks (*Quercus* L. sect. *Quercus*, Fagaceae) in the Crimean-Caucasian Region

S. A. Semerikova 50

Influence of Application of Various Doses of Lime Immeliorant into the Soil on QTL Mapping in Spring Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.)

Yu. V. Chesnokov, M. A. Fesenko, A. I. Ivanov, D. V. Rusakov, N. V. Kocherina, U. Lohwasser, and A. Börner 65

Animal Genetics

Study of Population Genetic Structure of Atlantic Chub Mackerel *Scomber colias* Gmelin, 1789 (Scombridae) in the Central-East Atlantic

A. N. Stroganov, A. I. Nikitenko, T. A. Rakitskaya, and V. A. Belyaev 80

Genetic Diversity Research in the Population of the Kyrgyz Mountain Merino Using Microsatellite Loci

Zh. T. Isakova, A. B. Bekturov, T. D. Chortonbaeb, V. N. Kipen, S. B. Mukeeva, U. A. Shergaziev, and K. A. Aitbaev 89

Evidence of the Genetic Mating System in Viviparity White-Edged Rockfish, *Sebastes taczanowskii* Steindachner, 1880

N. M. Batishcheva, V. D. Yagodina, and V. A. Brykov 97

Human Genetics

Mitochondrial Gene Pool of Ukrainians in the Context of Variability of Whole Mitogenomes in Slavic Peoples
B. A. Malyarchuk and M. V. Derenko 106

The Role of rs2238296 of the Mitochondrial DNA Polymerase Gamma Gene in Combination with Polymorphic Variants of Antioxidant Defense Genes in the Development of Postinfarction Left Ventricular Aneurysm
E. A. Kuzheleva, A. A. Garganeeva, O. V. Tukish, A. K. Nesova, M. V. Golubenko, S. L. Andreev, and V. M. Shipulin 115

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 5–17

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.162:633.111.1

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРОРАСТАНИЕ ЗЕРНА НА КОРНЮ У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.), И МЕТОДЫ ИХ ОЦЕНКИ

© 2023 г. А. В. Федяева[1, 2, *], Е. А. Салина[1, 3], В. К. Шумный[1]

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

[2]Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

[3]Курчатовский геномный центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

**e-mail: fedyaeva.anna@mail.ru*

Поступила в редакцию 04.02.2022 г.
После доработки 24.05.2022 г.
Принята к публикации 07.07.2022 г.

Обзор посвящен предуборочному прорастанию зерна (прорастание зерна на корню) у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) – одной из основных проблем, с которой сталкиваются специалисты в области генетики и селекции зерновых культур. Прорастание зерна на корню приводит к снижению урожая и экономическим потерям. В настоящей работе описаны приводящие к запуску этого процесса у зерновых культур внутриклеточные факторы, а также факторы окружающей среды, и их взаимосвязь. Дана характеристика эффективности и особенностей использования физиолого-биохимических и молекулярно-генетических методов для оценки устойчивости к предуборочному прорастанию зерна мягкой пшеницы.

Ключевые слова: предуборочное прорастание зерна, озимая пшеница, методы, устойчивость.

DOI: 10.31857/S0016675823010058, **EDN:** CMAFYB

При предуборочном прорастании зерна, или так называемом прорастании зерна на корню, происходит произрастание зерна в колосе родительского растения на поле перед сбором урожая, которое часто случается за счет воздействия повышенной влажности воздуха и температуры ниже нормы на финальных стадиях созревания злаковых, а также неустойчивости сортов к данным факторам внешней среды. Исследователи полагают, что это может быть связано с экстремальными и непредсказуемыми изменениями погоды, вызванными переменой климатических условий по всему Земному шару [1]. Прорастание зерна на корню является очень большой проблемой при выращивании зерновых, которое непосредственно влияет на качество муки, приводя к ухудшению ее хлебопекарных качеств, и соответственно к большим экономическим потерям [2–7].

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРОРАСТАНИЕ ЗЕРНА НА КОРНЮ

Прорастание зерна контролируется как факторами окружающей среды, так и молекулярно-генетическими и биохимическими внутриклеточными факторами, а также их совместным влиянием [1, 8]. Само по себе прорастание зерна является важным этапом жизненного цикла растения, напротив сохранение состояния покоя зерна предотвращает всхожесть и тем самым позволяет избежать потерь из-за несвоевременного прорастания зерна [1, 9]. С одной стороны, состояние покоя зерна регулируется рядом генов, а с другой, – находится под влиянием определенных факторов окружающей среды [1]. К числу таких факторов относятся обильные и продолжительные дожди, повышенная влажность воздуха, а также температура ниже нормы, воздействующие на растения после периода физиологической зрелости зерна [6, 10–12] (рис. 1). Засуха и высокая температура при наливе зерна влияют на проявление устойчивости к прорастанию зерна на корню [13]. Среди внутриклеточных факторов, влияющих на процесс предуборочного прорастания зерна, выделяют следующие: состояние покоя зерна; цвет и проницаемость оболочки зерна; α-амилазная активность; уровень эндогенных гормонов (гиббереллинов, абсцизовой кислоты, индолуксусной кислоты, этилена, жасмоновой кислоты, брассиностероидов) [2, 8, 14–21] (рис. 2). Было показано, что абсцизовая кислота (АБК) поддерживает состоя-

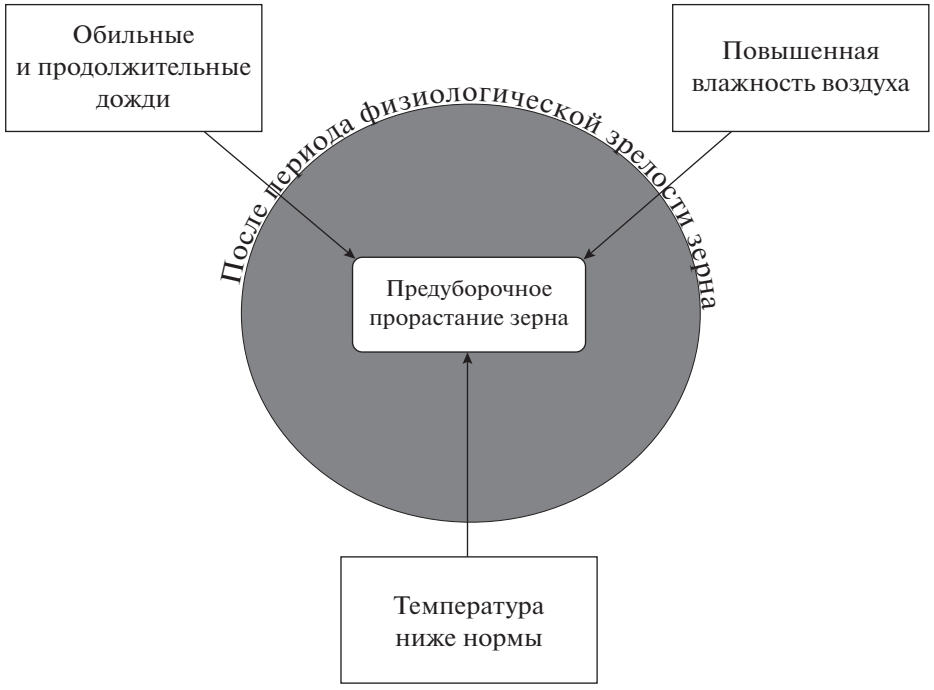


Рис. 1. Факторы окружающей среды, влияющие на предуборочное прорастание зерна озимой пшеницы в поле после периода физиологической зрелости зерна.

ние покоя в семенах, а гиббереллловая кислота (ГК), наоборот, стимулирует выход из покоя и прорастание семян [22, 23]. Уровень АБК в зерне регулируется за счет ее синтеза и катаболизма [1, 8, 24]. Синтез АБК происходит за счет зеаксантинэпоксидазы и 9-цис-эпоксикаратиноиддиоксигеназы [8, 19]. Катаболизм АБК в основном является результатом гидроксилирования посредством АБК 8'-гидроксилазы [25]. Намбара с соавт. сообщили о трех компонентах передачи сигналов АБК в семенах – это протеинфосфатаза 2Cs, SNF-1-подобная протеинкиназа и пирабактин-устойчивые/регуляторные компоненты АБК рецепторов [26]. Катаболизм АБК снижает ее содержание в зерне во время набухания и способствует его прорастанию [24]. В развивающемся зерне фиксируется большое содержание АБК, которое снижается при сушке зрелого зерна [27, 28]. Позже Сузуки с соавт. установили, что у пшеницы наблюдаются два пика уровня АБК, один через 25 дней после опыления, а второй через 35–45 дней [29]. К числу ферментов, участвующих в метаболизме ГК, относятся такие как энт-кауренсинтаза, энт-кауреноксидаза, оксидаза энт-кауреновой кислоты, ГК 20-оксидаза, ГК 2-оксидаза [19]. DELLA-белки в растениях являются еще одним важным элементом сигнального пути ГК, которые функционируют как репрессоры ГК [8]. Создание низкорослых и устойчивых к полеганию сортов пшеницы приводит к появлению мутации в генах, которые кодируют DELLA-белки, формируется нечувствительность к ГК и, как следствие, увеличение периода покоя и повышение устойчивости к предуборочному прорастанию зерна [30]. Другие фитогормоны также участвуют в регуляции покоя/прорастания зерна пшеницы [8]. В статье Рамаих с соавт. [31] сообщается о взаимосвязи между индолилуксусной кислотой, состоянием покоя зерна и предуборочным прорастанием. На настоящий момент влиянию таких гормонов как брассиностероиды, этилен, цитокинин, салициловая кислота, ауксины на регуляцию покоя зерна у зерновых культур посвящено много исследований, однако до сих пор до конца не изучены все их механизмы регуляции у пшеницы [8, 20]. Кроме того, необходимо отметить, что при прорастании зерна пшеницы происходит повышение содержания активных форм кислорода в растительных клетках [32–34].

Показано влияние различных генетических факторов на проявление признака “предуборочное прорастание зерна” [1, 7, 35].

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНА К ПРОРАСТАНИЮ

На настоящий момент существует достаточно большое количество морфологических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических методов оценки устойчивости к предуборочному прорастанию зерна у озимой и яровой пшеницы [1, 7, 8, 36, 37].

Морфологические методы

Один из методов – оценка комплекса морфофизиологических признаков [1, 3, 28], что предполагает изучение архитектоники колоса на предмет остистости, плотности колоса, степени раскрытия чешуй колоса, цвета колосковых чешуй, степени закрытия зерна цветковыми чешуями, толщины цветковой чешуи, трудности обмолота; а также оцениваются цвет и проницаемость семенной оболочки зерна [2, 38–42].

Известно, что цвет семенной оболочки зерна является еще одним фактором, коррелирующим с состоянием покоя зерна и устойчивостью к предуборочному прорастанию у пшеницы [2, 43–46]. Краснозерные сорта пшеницы более устойчивы к предуборочному прорастанию зерна, чем сорта с белым цветом зерна [47–49]. По большей части белозерные сорта пшеницы имеют более высокую скорость набухания и более высокую скорость прорастания, чем сорта пшеницы с зерном красного цвета [14]. Это может быть вызвано дефицитом олигомерных проантоцианидинов у белозерных сортов, что вызывает быстрое поглощение воды и их прорастание [2].

Структура воска, как и его количество, является важным фактором отталкивания воды в колосе [50]. В работе Йи с соавт. проведены исследования по выявлению влияния остистости на устойчивость к прорастанию; как предполагают авторы, безостые сорта обладают большей устойчивостью к прорастанию, чем остистые, однако этот признак менее очевиден, чем признак “цвет зерна” [51].

Физиолого-биохимические методы

Оценка устойчивости к данному признаку у пшеницы может проводиться в два временных периода: в предуборочный период [52] и в послеуборочный период [3, 53]. Поскольку сохранение состояния покоя зерна считается основным фактором, определяющим устойчивость пшеницы к предуборочному прорастанию [54, 55], наиболее распространенным методом оценки устойчивости зерновых является прямой провокационный способ оценки зерна [1, 52]. В научных работах провокационный прямой способ оценки в основном используется наряду с другими способами оценки устойчивости к предуборочному прорастанию зерна [1, 3].

На настоящий момент существуют две вариации проведения данного метода:

1) провокация прорастания зерна в колосьях во влажной камере [3, 56];

2) провокация прорастания зерна в чашках Петри [38, 52, 53, 56, 57].

Результатом двух вариаций прямого провокационного метода является определение индекса прорастания (ИП), с использованием формулы, описанной в работе Валкера–Симмонса [58].

Рис. 2. Внутриклеточные и генетические факторы, влияющие на предуборочное прорастание зерна озимой пшеницы в поле после периода физиологической зрелости зерна.

$$\text{ИП} = \frac{7n_1 + 6n_2 + 5n_3 + 4n_4 + \ldots + 1n_7}{DN},$$ где $n_1, n_2, \ldots, n_7$ – число проросших зерен за первые, вторые и последующие сутки; N – общее число зерен, проросших за семь дней эксперимента; D – общее число дней испытания; 7, 6, ..., 1 – заданные цифры к зернам, которые проросли в первый, второй и последующие дни проведения эксперимента. Максимальный ИП = 1.0 [56, 58].

Ряд исследователей [59, 60] считают, что оценка прорастания зерна в целых колосьях является более точной в определении общей устойчивости к предуборочному прорастанию по сравнению с провокацией зерна в чашках Петри, поскольку оценка проводится в условиях близких к естественным. Из особенностей применения прямого провокационного способа с использованием колоса необходимо учитывать климатические условия. Во влажные годы, в том числе и при интенсивно выпадающих осадках в послеуборочный период, желательно проводить оценку после перестоя на корню в течение 3–4 недель. Если осадки во второй половине вегетации выпадают неравномерно, а также в засушливые годы использование метода перестоя на корню можно заменить методом проращивания колосьев во влажной камере. Этот метод используется для определения устойчивости к послеуборочному прорастанию зерна и в сухие годы [38].

Физиологическим способом определения устойчивости к предуборочному прорастанию зерна у зерновых можно считать определение проницаемости оболочки зерна. Определить проницаемость оболочки зерна можно несколькими спо-

собами, при использовании трифенилтетразолия хлорида [42] и раствора NaOH [40].

Наиболее распространенным технологическим методом определения устойчивости к предуборочному прорастанию у злаков является определение числа падения (ЧП), данный способ признан Американской ассоциацией химиков-зерновиков (American Association of Cereal Chemists, AACC, Method 56 – 81.03) [6, 38, 61]. Для детекции используется специальное оборудование – прибор для определения числа падения (ПЧП) с применением методики Хагберга [62] или Пертена [57, 63]. Измерение ЧП позволяет оценить уровень амилазной активности в зерне, при этом величина ЧП имеет обратно пропорциональную криволинейную связь с активностью α-амилазы [64]. Следует отметить, что метод определения числа падения требует наличия дорогостоящего оборудования; исследователи полагают [63], что его можно заменить как провокационным прямым методом оценки, описанным ранее, так и методом определения уровня α-амилазной активности. В работе [65] была выявлена достоверная корреляция ($r = -0.56$) между методом проращивания зерен и методом определения ЧП.

Изучение содержания и активности α-амилазы "позднего созревания" (late maturity α-amylase, LMA) является относительно новой областью исследований и связано с несвоевременным синтезом α-амилазы на средних стадиях развития зерна, генетическими дефектами, которые приводят к уменьшению ЧП и ухудшению качества зерна [41, 61, 66]; мука, полученная из такого зерна, имеет невысокую загущающую способность и считается непригодной для выпечки хлебобулочных изделий [67]. Кроме того, такая мука имеет не только плохую текстуру, но и происходит ее чрезмерное окрашивание во время выпечки [66]. Для α-амилазы были выявлены три изофермента (α-амилаза-1; α-амилаза-2; α-амилаза-3), которые влияют на предуборочное прорастание зерна [2, 68]. В работе Жанга и Ли указывается, что α-амилаза пшеницы состоит из четырех подсемейств, обозначаемых amy1, amy2, amy3 и amy4 [69]. Изоферменты α-амилазы контролируются семействами генов *a-Amy1* и α-*Amy2*, расположенными в хромосомах 6-й и 7-й гомеологических групп соответственно [70–72]. При оценке относительных профилей экспрессии генов было показано, что пик α-*Amy2* приходится на начальные стадии развития зерна, а уровень *a-Amy1* повышается при созревании зерна. Кроме того, авторы отмечают, что относительная экспрессия гена *a-Amy1* была выше у сортов неустойчивых к предуборочному прорастанию зерна по сравнению с устойчивыми по данному признаку сортами [72]. Механизм действия α-амилазы заключается в расщеплении альфа 1–4 гликозидных связей повторяющихся глюкозных единиц крахмала, тем самым данный фермент разбивает молекулу крахмала на более мелкие единицы [35, 73]. Экспрессия α-амилазы строго контролируется фитогормонами – АБК и ГК [1, 69].

Для измерения α-амилазной активности в зерне на настоящий момент применяются различные методики [74, 75]. В последние годы очень часто исследователями используется метод Цералпха (Ceralpha method, AACC Method 22-02.01), который применяется для измерения активности α-амилазы из неочищенных экстрактов цельномолотых семян [76, 77]. В ходе этой процедуры в качестве субстрата используются определенный олигосахарид – блокированный п-нитрофенилмальтогептаозид (BPNPG7) и избыточный уровень термостабильной α-глюкозидазы. П-нитрофенилмальтогептаозид за счет эндоактивации α-амилазы, а затем α-глюкозидазы расщепляется до глюкозы и свободного п-нитрофенола. Далее реакция останавливается добавлением слабощелочного раствора и измеряется оптическая плотность при 400 нм, активность α-амилазы при этом измеряется в единицах цералпха. Одна единица цералпха определяется как количество фермента, необходимого для образования одного микромоля п-нитрофенола из BPNPG7 за одну минуту при условии наличия избытка термостабильной α-глюкозидазы [78]. Необходимо отметить, что метод Цералпха имеет ряд ограничений. Процедура требует определенного, одинакового для всех образцов, времени инкубации с BPNPG7 – 20 мин, и поскольку п-нитрофенол нестабилен, измерение показателя на спектрофотометре должно быть проведено в течение последующих двух часов. При большом количестве α-амилаз п-нитрофенол становится сильно концентрированным, тогда его необходимо перед измерением разбавлять, при его малой концентрации также существует вероятность большой погрешности измерения [35].

Помимо метода Цералпха существует колориметрическая методика определения α-амилазной активности с использованием таблеток Пхадедас (Phadedas tablets), субстрат которых представляет собой нерастворимый в воде сшитый полимер крахмала, несущий в себе синий краситель. Данный субстрат гидролизуется α-амилазой с образованием водорастворимых синих фрагментов и измеряется оптическая плотность раствора [75, 79–81]. Другими способами оценки α-амилазной активности в образцах зерновых является использование приборов амилографа и миксолаба [74, 82–84], а также применение крахмально-йодометрического метода [75, 77].

Молекулярно-генетические методы

К числу современных методов исследования устойчивости к предуборочному прорастанию зерна относятся молекулярно-генетические методы

исследования [1, 7, 35, 85–89], которые базируются, во-первых, на идентификации генов и генетических локусов, контролирующих данный признак, и, во-вторых, на подбор маркеров к этим генам и локусам для дальнейшего их использования в маркер-ориентированной селекции.

Идентификация генетических локусов, определяющих устойчивость к предуборочному прорастанию зерна. Известно, что отдельные локусы, которые контролируют количественный признак, называются полигенами или локусами количественных признаков QTL (quantitative trait loci) [90]. В последние годы для обнаружения и подтверждения QTL и генов к различным признакам, характеризующим предуборочное прорастание зерна, проводятся полногеномные ассоциативные исследования (Genome-wide association studies, GWAS) [43]. QTL, отвечающие за период покоя и предуборочное прорастание зерна, были обнаружены почти на всех хромосомах (1A, 1B, 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 3D, 4A, 4B, 5B, 5D, 6A, 6B, 6D, 7A, 7B и 7D) [2]. В одной из работ сообщается, что насчитывается порядка 250 QTL, которые связаны с предуборочным прорастанием у пшеницы (*Triticum aestivum* L.) [88]. В настоящий момент требуются уточнение количества и участков локализации QTL на хромосомах, а также более детальный анализ структуры, функции и механизмов регуляции генов, входящих в состав генетических локусов, определяющих устойчивость к предуборочному прорастанию зерна [2, 5, 35]. В то же время следует отметить, что главный QTL, обозначенный как *Qphs.ocs.1*, *Phs*, *Phs1* или *Phs-A1*, локализован на хромосоме 4A и контролирует порядка 40% фенотипических вариаций устойчивости к предуборочному прорастанию зерна (pre-harvest sprouting – PHS) у пшеницы [91–93]. Впоследствии методом позиционного клонирования в данном локусе был выделен ген-кандидат –*TaMKK3-A* (митоген-активированная протеинкиназа 3), влияние которого на продолжительность покоя зерна было подтверждено на популяции от скрещивания линий, различающихся по наличию указанного гена и устойчивости к прорастанию зерна на корню [5, 94].

Несколько локусов, контролирующих состояние покоя зерна, было выявлено на длинном плече третьей гомеологичной группы хромосом. Так, на хромосоме 3DL с использованием *Aegilops tauschii*–*Triticum aestivum* замещенных линий выявлено три локуса, контролирующих состояние покоя зерна (dormancy), *QDor.3D.1*, *QDor.3D.2* и *QDor.3D.3* [53]. Ранее Кулвал с соавт. установили, что два стабильных и важных QTL находятся в непосредственной близости от генов, участвующих в контроле состояния покоя, на хромосомах 3BL и 3DL, а третий QTL – на хромосоме 3B, в непосредственной близости от генов красной окраски зерна, которая, как известно, способствует устойчивости к прорастанию зерна на корню [60].

Влияние генов, локализованных на длинном плече третьей гомеологичной группы хромосом, на состояние покоя зерна и его прорастание также подтверждено и другими исследованиями. Так, например, ген *Viviparous-1* (*Vp-1*) является одним из важных регуляторов позднего эмбриогенеза у мягкой пшеницы. Транскрипционный фактор *Vp-1* функционирует как активатор для генов, участвующих в созревании зерна, а также подавляет транскрипцию генов, необходимых для прорастания зерна и выхода из состояния покоя, в частности α-амилазы [95–97]. Три гомеологичных гена *Vp-1* пшеницы (*Vp-1A*, *Vp-1B*, *Vp-1D*) расположены на длинном плече хромосом 3A, 3B и 3D соответственно. Для каждого гена идентифицировано несколько аллельных вариантов [2, 16, 98, 99]. Показано, что аллели *Vp-1Ab* и *Vp-1Ad* распределены в генотипах пшеницы, имеющих более “глубокий” период покоя семян, индекс прорастания которых был равен 0.19–0.26, и имевших повышенную устойчивость к предуборочному прорастанию зерна [99]. Напротив, у аллельного варианта *Vp-1Ba* наблюдались слабый период покоя семян и восприимчивость к предуборочному прорастанию зерна [98]. Также было обнаружено, что гены *Vp-1* регулируются через некоторые другие гены, которые принимают участие в созревании зародышей зерна, покое зерна и его прорастании [2]. Регуляторный элемент – ABRE (abscisic acid responsive element), чувствительный к дегидратации элемент-связывающий фактор – DREB (dehydration responsive element binding protein), гомолог вирусного онкогена миелобластоза птиц v-myb – MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog), гиббереллин-отвечающий элемент – GARE (gibberellin responding element) и четыре элемента в промоторных последовательностях *Vp-1B* вовлечены в регуляцию как состояния покоя зерна, так и его прорастания [2, 100].

Показано, что для более устойчивых на корню краснозерных сортов мягкой пшеницы, по сравнению с белозерными сортами, характерно присутствие доминантных аллелей генов *R* [101, 102], которые локализованы на длинном плече третьей группы гомеологичных хромосом, на расстоянии 30 сМ от *Vp-1* локуса [1, 102, 103]. В недавнем исследовании Мареса и Хими было установлено, что ген *R*, контролирующий цвет в гене *Tamyb10-A1b* у красной пшеницы, является транскрипционным фактором Tamyb10 [104]. Мутация *Tamyb10-A1* приводит к появлению белой оболочки зерна и снижению периода покоя, выходом из состояния покоя во время созревания зерна. Транскрипционные факторы Myb-типа – Tamyb10-1 – контролируют биосинтез антоцианов и красный пигмент зерна пшеницы посредством активации структурных генов, которые кодируют халконсинтазу,

Таблица 1. Характеристика маркеров к генам, определяющим предуборочное прорастание зерна у пшеницы

Признак	Ген/QTL/(хромосома)	Тип маркера	Маркер	Ссылка
Состояние покоя; устойчивость к предуборочному прорастанию зерна	*Vp-1Bb, Vp-1Bc* (3BL)	STS	Vp1B3 (Vp-1B_3F/R)*	[110]
	TaVp-1A (3A), *TaVp-1D* (3D)	STS	Vp1A3	[111]
	/QTL/(4A)	SSR	Wmc513, wmc048, gwm397, gwm269, barc170, wmc468, gwm258, wmc161, wmc262 Gwm610, wmc048, gwm397, gwm269, barc170, wmc468, wmc258, wmc161, barc347, wmc262	[91] [92]
	/*QPhs.dpivic.4A.1*, *QPhs.dpivic.4A.2*/(4A)	SSR	Xgwm937, Xgwm894	[93]
	/QTL/(4A)	SSR	Xbarc170, Xgwm397	[112]
	/QTL/(4A)	SSR	Xhbe03, Xgwm637, Xgwm397	[92] [113]
	/QTL/(4A)	STMS	Xwmc468 Wmc104	[113] [114]
	/QTL/(3A)	SSR	Xgwm155	[114]
Устойчивость к предуборочному прорастанию зерна	*TaPHS1*(3A)	SNP	TaPHS1-SNP1**	[115]
	TaSdr-A1(2A)	CAPS	Sdr2A	[116]
	/QDor.3D.1, QDor.3D.2, QDor.3D.3/(3DL)	SSR	Xgpw5094, xcfd152, xcfd223, xgwm383b	[53]
		KASP	A007500, A009175, A009353, A009352, A009177, A009711, A009180, A009715, A009725, A009716	
	/QTL/(3B, 4A, 7B, 7D)	KASP	Kasp3B_wsnp_Ku_rep_c72700_72370664, Kasp3B_RAC875_rep_c116515_181, Kasp3B_BobWhite_rep_c64944_264, Kasp3B_wsnp_Ex_c16378_24870688, Kasp3B_RAC875_c530_354, Kasp4A_BS00072025_51, Kasp4A_Kukri_c12563_52, Kasp4A_RAC875_c21369_425, Kasp4A_wsnp_Ex_c16175_24619793, Kasp7B_wsnp_Ex_c908_1754208, Kasp7B_RFL_Contig124_558, Kasp7B_RAC875_c1638_165, Kasp7B_wsnp_Ex_rep_c69639_68590556, Kasp7B_Ku_c32389_1009, Kasp7D_Excalibur_c22419_460, Kasp7D_RAC875_c1829_321, Kasp7D_Kukri_c32845_116, Kasp7D_wsnp_CAP8_rep_c9647_4198594	[86]
	Vp-1B(3BL)	SSR	Vp1-b2	[117]
Состояние покоя	*Tamyb10-D1*(3D)	STS	Tamyb10D	[118]

* Верификация маркера [119–121].
** Верификация маркера [122].

халконизомеразу, флаванон-3-гидроксилазу, дигидрофлаванол-4-редуктазу, участвующие в биосинтезе флавоноидов [8].

Отмечено, что температура во время развития и созревания семян сильно влияет на период покоя семян у пшеницы (*Triticum aestivum* L.), при этом более низкие температуры приводят к более высокому уровню покоя семян. Клонированы и охарактеризованы гены пшеницы, участвующие в этом процессе, гомологи MFT (MOTHER OF FT AND TFL1), входящие в состав локуса количественного признака пшеницы (*Qphs.pseru-3AS*) на коротком плече хромосомы 3A [34, 105, 106].

Клонированы гены *TaSdr-A1*, *TaSdr-B1*, являющиеся ортологами гену риса *OsSdr*, контролирующему состояние покоя семян. Гены *TaSdr-A1* и *TaSdr-B1* локализуются на хромосомах 2A и 2B соответственно, в районе QTL, вклад которого в проявление устойчивости к предуборочному прорастанию зерна оценивается как 6–8% [107, 108].

ДНК-маркеры к генам, влияющим на устойчивость к прорастанию зерна на корню, или к районам их локализации. Использование молекулярно-генетических методов для изучения хозяйственно ценных признаков сопровождается разработкой ДНК-маркеров, которые могут быть использованы для генотипирования сортов мягкой пшеницы по генам, определяющим устойчивость к предуборочному прорастанию зерна, и создания устойчивых к прорастанию сортов методом маркер-ориентированной селекции. Для маркирования генов и локусов количественных признаков, влияющих на предуборочное прорастание зерна, используются следующие маркеры: SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидные полиморфные маркеры и разработанные на их основе KASP (Kompetitive allele-specific PCR) маркеры; SSR (simple sequence repeats) – маркеры на основе простых повторяющихся последовательностей ДНК (микросателлитов); STS (sequence tagged site) – сайт/локус, маркированный нуклеотидной последовательностью; CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – амплифицированные последовательности ДНК после обработки рестриктазой [53, 86, 91–94, 106, 108–122] (табл. 1).

Так, для маркирования QTL (*QDor.3D.1*, *QDor.3D.2* и *QDor.3D.3*) у растений популяции F2 от скрещивания мягкой пшеницы с *Aegilops tauschii–Triticum aestivum* замещенной линией были использованы 4 SSR-маркера и 10 маркеров KASP [53]. QTL на хромосоме 4AL, влияющий как на длительный период покоя семян, так и на повышенную устойчивость к предуборочному прорастанию, эффективно маркируется фланкирующими SSR-маркерами (Xbarc170 и Xgwm397) [112]. Для определения устойчивости к предуборочному прорастанию зерна у различных сортов и анализа аллельных вариаций по гену *Vp-1* были использованы STS-маркеры *Vp1B3* и *MST101*, SSR-маркеры *Vp1-b2*, *Xgwm937*, *Xgwm894* и *Xgwm155*, *Xgwm397*, STMS-маркеры *Xwmc468* и *wmc104* [2, 94, 110, 113, 114, 117, 119, 123–125]. Ванг с соавт. разработали маркер STS Tamyb10D для гена *Tamyb10-D1*, который может быть использован для оценки состояния покоя у генотипов мягкой пшеницы [118].

Десять лет назад практическое применение молекулярных маркеров для создания коммерческих сортов пшеницы имело ограниченный характер [126]. Необходимо учитывать, что из-за большого количества QTL и генетической изменчивости структуры сортов, используемых в селекционных центрах из различных агроэкологических районов, разработанные маркеры к генам, определяющим устойчивость к прорастанию на корню, часто полезны только для тех сортов, которые использовались для подбора и разработки маркеров. Помимо этого при выявлении различий по устойчивости к предуборочному прорастанию зерна у сортов пшеницы в полевых условиях необходимо учитывать климатический прогноз. Так, засуха при наливе зерновых увеличивает период покоя, поэтому для выявления корректных генетических различий на предмет устойчивости к предуборочному прорастанию необходимо избегать засухи в этот период [13].

Следует отметить, что без применения комплекса современных методов оценки фенотипа и генотипа у сельскохозяйственных культур невозможно проводить высокопроизводительный отбор сортов по заданным хозяйственно ценным признакам. Как отмечено выше, прорастание зерна на корню может приводить к снижению урожая и экономическим потерям. Обзор литературных данных указывает на то, что в настоящий момент есть физиолого-биохимические и генетические подходы, которые требуют дальнейшего совершенствования с целью создания эффективных инструментов отбора сортов зерновых культур, устойчивых к предуборочному прорастанию зерна.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-76-30003).

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. *Singh C., Kamble U.R., Gupta V. et al.* Pre-harvest sprouting in wheat: current status and future prospects //

J. Cereal Research. 2021. V. 13. P. 1–22. https://doi.org/10.25174/2582-2675/2021/114484

2. *Gao X., Hu C.H., Li H.Z. et al.* Factors affecting pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review // J. Anim. Plant Sci. 2013. V. 23. № 2. P. 556–565.
3. *Kocheshkova A.A., Kroupin P.Y., Bazhenov M.S. et al.* Pre-harvest sprouting resistance and haplotype variation of *ThVp-1* gene in the collection of wheat-wheatgrass hybrids // PLoS One. 2017. V. 12. № 11. P. e0188049. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188049
4. *Домаш В.И., Иванов О.А., Гордей И.А. и др.* Роль гидролитических ферментов в устойчивости злаковых культур к прорастанию зерна в колосе // Изв. Национ. академии наук Беларуси. Серия биол. наук. 2017. № 1. С. 77–83.
5. *Nakamura S.* Grain dormancy genes responsible for preventing pre-harvest sprouting in barley and wheat // Breed. Sci. 2018. V. 68. P. 295–304. https://doi.org/10.1270/jsbbs.17138
6. *Olaerts H., Courtin C.M.* Impact of preharvest sprouting on endogenous hydrolases and technological quality of wheat and bread: A review // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2018. V. 17. № 3. P. 698–713.
7. *Vetch J.M., Stougaard R.N., Martin J.M., Giroux M.J.* Review: Revealing the genetic mechanisms of pre-harvest sprouting in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Sci. 2019. V. 281. P. 180–185. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.004
8. *Ali A., Cao J., Jiang H. et al.* Unraveling molecular and genetic studies of wheat (*Triticum aestivum* L.) resistance against factors causing pre-harvest sprouting // Agronomy. 2019. V. 9. № 3. P. 117. https://doi.org/10.3390/agronomy9030117
9. *Nonogaki H., Barrero J.M., Li C.* Editorial: Seed dormancy, germination, and pre-harvest sprouting // Frontiers in Plant Science. 2018. V. 9. № 1783. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01783
10. *Reddy L.V., Metzger R.J., Ching T.M.* Effect of temperature on seed dormancy of wheat // Crop Sci. 1985. V. 25. № 3. P. 455–458. https://doi.org/10.2135/cropsci1985.0011183X00250-0030007x
11. *Smith G., Gooding M.* Models of wheat grain quality considering climate, cultivar and nitrogen effects // Agricultural and Forest Meteorology. 1999. V. 94. № 3–4. P. 159–170. https://doi.org/10.1016/s0168-1923(99)00020-9
12. *Крупнова О.В.* О сопоставлении качества зерна яровой и озимой пшеницы в связи с делением на рыночные классы (обзор) // С.-х. биология. 2013. Т. 48. № 1. С. 15–25.
13. *Biddulph T.B., Mares D.J., Plummer J.A., Setter T.L.* Drought and high temperature increases pre-harvest sprouting tolerance in a genotype without grain dormancy // Euphytica. 2005. V. 143. P. 277–283. https://doi.org/10.1007/s10681-005-7882-0
14. *Himi E., Mares D.J., Yanagisawa A., Noda K.* Effect of grain colour gene (R) on grain dormancy and sensitivity of the embryo to abscisic acid (ABA) in wheat // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. № 374. P. 1569–1574. https://doi.org/10.1093/jxb/erf005
15. *Jacobsen J.V., Pearce D.W., Poole A.T. et al.* Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley // Physiol. Plant. 2002. V. 115. № 3. P. 428–441. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150313.x
16. *Yang Y., Zhang C.L., Chen X.M. et al.* Identification of wheat genotypes with preharvest sprouting tolerance by combinated analysis of spike germination rate, germination index and molecular marker Vp1B3 // J. Triticeae Crops. 2007. V. 27. P. 577–582.
17. *Linkies A., Leubner-Metzger G.* Beyond gibberellins and abscisic acid: How ethylene and jasmonates control seed germination // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. P. 253–270. https://doi.org/10.1007/s00299-011-1180-1
18. *Barrero J.M., Mrva K., Talbot M.J. et al.* Genetic, hormonal and physiological analysis of late maturity alpha-amylase (LMA) in wheat // Plant Physiol. 2013. V. 161. P. 1265–1277. https://dx.doi.org/10.1104%2Fpp.112.209502
19. *Liu A., Gao F., Kanno Y. et al.* Regulation of wheat seed dormancy by after-ripening is mediated by specific transcriptional switches that induce changes in seed hormone metabolism and signaling // PLoS One. 2013. V. 8. № 2. P. e56570. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056570
20. *Chitnis V.R., Gao F., Yao Z. et al.* After-ripening induced transcriptional changes of hormonal genes in wheat seeds: The cases of brassinosteroids, ethylene, cytokinin and salicylic acid // PLoS One. 2014. V. 9. № 1. P. e87543. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087543
21. *Shu K., Liu X.D., Xie Q., He Z.H.* Two faces of one seed: Hormonal regulation of dormancy and germination // Mol. Plant. 2016. V. 9. №. 1. P. 34–45. https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010
22. *Kucera B., Cohn M.A., Leubner-Metzger G.* Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination // Seed Sci. Res. 2005. V. 15. P. 281–307. https://doi.org/10.1079/SSR2005218
23. *Kermode A.R.* Role of abscisic acid in seed dormancy // J. Plant Growth Regul. 2005. V. 24. P. 319–344. https://doi.org/10.1007/s00344-005-0110-2
24. *Chono M., Matsunaka H., Seki M. et al.* Isolation of a wheat (*Triticum aestivum* L.) mutant in ABA8'-hydroxylase gene: Effect of reduced ABA catabolism on germination inhibition under field condition // Breeding Science. 2013. V. 63. № 1. P. 104–115. https://dx.doi.org/10.1270%2Fjsbbs.63.104
25. *Okamoto M., Kuwahara A., Seo M. et al. CYP707A1* and *CYP707A2*, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2006. V. 141. № 1. P. 97–107. https://doi.org/10.1104/pp.106.079475

26. *Nambara E., Okamoto M., Tatematsu K. et al.* Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination // Seed Sci. Res. 2010. V. 20. P. 55–67. https://doi.org/10.1017/S0960258510000012

27. *King R.W.* Abscisic acid in seed development // The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination / Ed. Khan A.A. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982. P. 157–181.

28. *Walker-Simmons M.* ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars // Plant Physiol. 1987. V. 84. № 1. P. 61–66. https://dx.doi.org/10.1104%2Fpp.84.1.61

29. *Suzuki T., Matsuura T., Kawakami N., Noda K.* Accumulation and leakage of abscisic acid during embryo development and seed dormancy in wheat // Plant Growth Regul. 2000. V. 30. P. 253–260. https://doi.org/10.1023/A:1006320614530

30. *van de Velde K., Chandler P.M., van der Straeten D., Rohde A.* Differential coupling of gibberellin responses by *Rht-B1c* suppressor alleles and *Rht-B1b* in wheat highlights a unique role for the DELLA N-terminus in dormancy // J. Experim. Botany. 2017. V. 68. № 3. P. 443–455. https://doi.org/10.1093/jxb/erw471

31. *Ramaih S., Guedira M., Paulsen G.M.* Relationship of indoleacetic acid and tryptophan to dormancy and preharvest sprouting of wheat // Funct. Plant Biol. 2003. V. 30. № 9. P. 939–945. https://doi.org/10.1071/FP03113

32. *Caliskan M., Cuming A.C.* Spatial specificity of H_2O_2-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination // Plant J. 1998. V. 15. № 2. P. 165–171. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00191.x

33. *Bykova N.V., Hoehn B., Rampitsch C. et al.* Thiol redox-sensitive seed proteome in dormant and non dormant genotypes of wheat // Phytochemistry. 2011. V. 72. № 10. P. 1162–1172. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.12.021

34. *Graeber K.A.I., Nakabayashi K., Miatton E. et al.* Molecular mechanisms of seed dormancy // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. № 10. P. 1769–1786. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02542.x

35. *Patwa N., Penning B.W.* Environmental impact on cereal crop grain damage from pre-harvest sprouting and late maturity alpha-amylase // Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change. 2020. P. 23–41. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45669-6_2

36. *Skerritt J.H., Heywood R.H.* A five-minute field test for on-farm detection of pre-harvest sprouting in wheat // Crop Science. 2000. V. 40. № 3. P. 742–756. https://doi.org/10.2135/cropsci2000.403742x

37. *Gavazza M.I.A., Bassoi M.C., de Carvalho T.C. et al.* Methods for assessment of pre-harvest sprouting in wheat cultivars // Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2012. V. 47. № 7. P. 928–933. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000700008

38. *Рубец В.С., Нгуен Т.Т.Л., Пыльнев В.В.* Система селекционной оценки устойчивости озимой тритикале к прорастанию на корню // Изв. ТСХА. 2012. № 1. С. 132–141.

39. *King R.W., von Wettstein-Knowles P.* Epicuticular waxes and regulation of ear wetting and pre-harvest sprouting in barley and wheat // Euphytica. 2000. V. 112. P. 157–166. https://doi.org/10.1023/A:1003832031695

40. *Ram M.S., Dowell F.E., Seitz L., Lookhart G.* Development of standard procedures for a simple, rapid test to determine wheat color class // Cereal Chem. 2002. V. 79. № 2. P. 230–237. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.2.230

41. *Mares D.J., Mrva K.* Wheat grain preharvest sprouting and late maturity alpha-amylase // Planta. 2014. V. 240. P. 1167–1178. https://doi.org/10.1007/s00425-014-2172-5

42. *Lang J., Fu Y., Zhou Y. et al. Myb10-D* confers *PHS-3D* resistance to pre-harvest sprouting by regulating *NCED* in ABA biosynthesis pathway of wheat // New Phytologist. 2021. V. 230. P. 1940–1952. https://doi.org/10.1111/nph.17312

43. *Lin M., Zhang D., Liu S. et al.* Genome-wide association analysis on pre-harvest sprouting resistance and grain color in U.S. winter wheat // BMC Genomics. 2016. V. 17. P. 794. https://doi.org/10.1186/s12864-016-3148-6

44. *Gfeller F., Svejda F.* Inheritance of post-harvest seed dormancy and kernel colour in spring wheat lines // Can. J. Plant Sci. 1960. V. 40. № 1. P. 1–6. https://doi.org/10.4141/cjps60-001

45. *De Pauw R.M., McCaig T.N.* Recombining dormancy and white seed color in a spring wheat cross // Can. J. Plant Sci. 1983. V. 63. № 3. P. 581–589. https://doi.org/10.4141/cjps83-074

46. *He Z.T., Chen X.L., Han Y.P.* Progress on preharvest sprouting resistance in white // J. Triticeae Crops. 2000. V. 20. № 2. P. 84–87.

47. *McEwan J.M.* The sprouting reaction of stocks with single genes for red grain colour derived from hilgendorf 61 wheat // Cereal Res. Communications. 1980. V. 8. № 1. P. 261–264.

48. *Warner R.L., Kudrna D.A., Spaeth S.C., Jones S.S.* Dormancy in white-grain mutations of Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.) // Seed Sci. Res. 2000. V. 10. № 1. P. 51–60. https://doi.org/10.1017/S0960258500000064

49. *Groos C., Gay G., Perretant M.R. et al.* Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a whitexred grain bread-wheat cross // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 104. № 1. P. 39–47. https://doi.org/10.1007/s001220200004

50. *King R.W.* Physiology of sprouting resistance // Pre-Harvest Field Sprouting in Cereals / Ed. Derera N.F. CRC Press Inc, Boca Raton, 1989. P. 27–60.

51. *Ji T., Penning B., Baik B.K.* Pre-harvest sprouting resistance of soft winter wheat varieties and associated grain characteristics // J. Cereal Science. 2018. V. 83.

P. 110–115.
https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.006

52. *Gerjets T., Scholefield D., Foulkes M.J. et al.* An analysis of dormancy, ABA responsiveness, after-ripening and pre-harvest sprouting in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) caryopses // J. Experim. Botany. 2010. V. 61. № 2. P. 597–607.
53. *He J., Zhang D., Chen X. et al.* Identification of QTLs and a candidate gene for reducing pre-harvest sprouting in *Aegilops tauschii–Triticum aestivum* chromosome segment substitution lines // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 3729.
https://doi.org/10.3390/ijms22073729
54. *Lan X.J., Wei Y.M., Liu D.C. et al.* Inheritance of seed dormancy in Tibetan semiwild wheat accession Q1028 // J. Applied Genet. 2005. V. 46. № 2. P. 133–138.
55. *Sun Y.W., Jones H.D., Yang Y. et al.* Haplotype analysis of *viviparous-1* gene in CIMMYT elite bread wheat germplasm // Euphytica. 2012. V. 186. P. 25–43.
https://doi.org/10.1007/s10681-011-0482-2
56. *Баженов М.С., Дивашук М.Г., Пыльнев В.В. и др.* Изучение образцов озимой тритикале на наличие хромосомных замещений и их связь с устойчивостью к прорастанию на корню // Изв. ТСХА. 2011. № 2. С. 20–26.
57. *Biddulph T.B., Plummer J.A., Setter T.L., Mares D.J.* Seasonal conditions influence dormancy and preharvest sprouting tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field // Field Crops Res. 2008. V. 107. № 2. P. 116–128.
https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.01.003
58. *Walker-Simmons M.* Enhancement of ABA responsiveness in wheat embryos by high temperature // Plant Cell Environ. 1988. V. 11. № 8. P. 769–775.
https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1988.tb01161.x
59. *Hagemann M.G., Ciha A.J.* Evaluation of methods used in testing winter wheat susceptibility to preharvest sprouting // Crop Sci. 1984. V. 24. № 2. P. 249–254.
https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X00240-0020010x
60. *Kulwal P.L., Mir R.R., Kumar S., Gupta P.K.* QTL analysis and molecular breeding for seed dormancy and pre-harvest sprouting tolerance in bread wheat // J. Plant Biol. 2010. V. 37. № 1. P. 59–74.
61. *Perten H.* Application of the falling number method for evaluating α-amylase activity // Cereal Chemistry. 1964. V. 41. № 3. P. 127–140.
62. *Hagberg S.* A rapid method for determining alpha-amylase activity // Cereal Chem. 1960. V. 37. P. 218.
63. *Martinez S.A., Godoy J., Huang M. et al.* Genome-wide association mapping for tolerance to pre-harvest sprouting and low falling numbers in wheat // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. 141.
https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00141
64. *Lunn G.D., Major B.J., Kettlewell P.S., Scott R.K.* Mechanisms leading to excess alpha-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain in the U.K // J. Cereal Sci. 2001. V. 33. P. 313–329.
https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0369
65. *Trethowan R.M.* Evaluation and selection of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) for preharvest sprouting tolerance // Aust. J. Agric. Res. 1995. V. 46. № 3. P. 463–474.
https://doi.org/10.1071/AR9950463
66. *Olaerts H., Vandekerckhove L., Courtin C.M.* A closer look at the bread making process and the quality of bread as a function of the degree of preharvest sprouting of wheat (*Triticum aestivum*) // J. Cereal Science. 2018. V. 80. P. 188–197.
https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.03.004
67. *Kottearachchi N.S., Uchino N., Kato K., Miura H.* Increased grain dormancy in white-grained wheat by introgression of preharvest sprouting tolerance QTLs // Euphytica. 2006. V. 152. P. 421–428.
https://doi.org/10.1007/s10681-006-9231-3
68. *Gale M.D., Ainsworth C.C.* The relationship between α-amylase species found in developing and germinating wheat grain // Biochem. Genet. 1984. V. 22. P. 1031–1036.
https://doi.org/10.1007/bf00499629
69. *Zhang Q., Li C.* Comparisons of copy number, genomic structure, and conserved motifs for α-amylase genes from barley, rice and wheat // Frontiers in Plant Sci. 2017. V. 8. 1727.
https://doi.org/10.3389%2Ffpls.2017.01727
70. *Gale M.D., Law C.N., Chojecki A.J., Kempton R.A.* Genetic control of a-amylase production in wheat // Theor. Appl. Genet. 1983. V. 64. P. 309–316.
https://doi.org/10.1007/bf00274170
71. *Mrva K., Wallwork M., Mares D.J.* α-Amylase and programmed cell death in aleurone of ripening wheat grains // J. Experim. Botany. 2006. V. 57. № 4. P. 877–885.
https://doi.org/10.1093/jxb/erj072
72. *Laethauwer S.D., Riek J.D., Stals I. et al.* α-Amylase gene expression during kernel development in relation to pre-harvest sprouting in wheat and triticale // Acta Physiol. Plant. 2013. V. 35. P. 2927–2938.
https://doi.org/10.1007/s11738-013-1323-9
73. *van der Maarel M.J.E.C., van der Veen B., Uitdehaag J.C.M. et al.* Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family // J. Biotechnology. 2002. V. 94. № 2. P. 137–155.
https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00407-2
74. *Szafrańska A.* Comparison of alpha-amylase activity of wheat flour estimated by traditional and modern techniques // Acta Agrophysica. 2014. V. 21. № 4. P. 493–505.
75. *Antoņenko K., Duma M., Kreicbergs V., Kunkulberga D.* The influence of microelements selenium and copper on the rye malt amylase activity and flour technological properties // Agronomy Research. 2016. V. 14. № S2. P. 1261–1270.
76. *Newberry M., Zwart A.B., Whan A. et al.* Does late maturity alpha-amylase impact wheat baking quality // Front Plant Sci. 2018. V. 9. № 1356.
https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01356

77. *Visvanathan R., Qader M., Jayathilake C. et al.* Critical review on conventional spectroscopic α-amylase activity detection methods: Merits, demerits, and future prospects // J. Science of Food and Agriculture. 2020. V. 100. № 7. P. 2836–2847. https://doi.org/10.1002/jsfa.10315
78. AACC I. The approved methods of analysis // Method 22–0201 measurement of alpha-amylase in plant and microbial materials using the Ceralpha method, 11th ed. St. Paul, MN: AACC International. https://doi.org/10.1094/AACCIntMethod-22-02.01
79. Amylase Test. Instructions for Use. Sweden, 2021. www.phadebas.com.
80. *Mathewson P.R., Pomeranz Y.* Detection of sprouted wheat by a rapid colormetric determination of alpha-amylase // J. Association of Oficial Analytical Chemists. 1977. V. 60. № 1. P. 16–20. https://doi.org/10.1093/jaoac/60.1.16
81. *Trethowan R.M., Pena R.J., Pfeiffer W.H.* Evaluation of pre-harvest sprouting in triticale compared with wheat and rye using a line source rain gradient // Aust. J. Agric. Res. 1994. V. 45. № 1. P. 65–74. https://doi.org/10.1071/AR9940065
82. *Ichinose Y., Kuwabara T., Hakoyama S.* Germination of wheat grains at various temperatures in relation to the activities of a-amylase and endoprotease // Plant Prod. Sci. 2002. V. 5. № 2. P. 110–116. https://doi.org/10.1626/pps.5.110
83. *Stanojeska M., Sokoloski B.* Creating the correlation model at flour T-400 among Amylograph units and γ slope of Mixolab curve // J. Hygienic Engineering and Design. 2012. V. 1. P. 247–250.
84. *Wiwart M., Szafranska A., Wachowska U., Suchowilska E.* Quality parameters and rheological dough properties of fifteen spelt (*Triticum spelta* L.) varieties cultivated today // Cereal Chem. 2017. V. 94. № 6. P. 1037–1044. https://doi.org/10.1094/CCHEM-05-17-0097-R
85. *Flintham J., Adlam R., Bassoi M. et al.* Mapping genes for resistance to sprouting damage in wheat // Euphytica. 2002. V. 126. P. 39–45. https://doi.org/10.1023/A:1019632008244
86. *Cabral A.L., Jordan M.C., McCartney C.A. et al.* Identification of candidate genes, regions and markers for pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) // BMC Plant Biol. 2014. V. 14. № 340. https://doi.org/10.1186/s12870-014-0340-1
87. *Fakthongphan J., Bai G., Amand P.S. et al.* Identification of markers linked to genes for sprouting tolerance (independent of grain color) in hard white winter wheat (HWWW) // Theor. Appl. Genet. 2016. V. 129. P. 419–430. https://doi.org/10.1007/s00122-015-2636-4
88. *Gupta P.K., Balyan H.S., Sharma S., Kumar R.* Genetics of yield, abiotic stress tolerance and biofortification in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2020. V. 133. P. 1569–1602. https://doi.org/10.1007/s00122-020-03583-3
89. *Tai L., Wang H.J., Xu X.J. et al.* Pre-harvest sprouting in cereals: genetic and biochemical mechanisms // J. Experim. Botany. 2021. V. 72. № 8. P. 2857–2876. https://doi.org/10.1093/jxb/erab024
90. *Tanksley S.D.* Mapping polygenes // Annu. Rev. Genet. 1993. V. 27. P. 205–233. https://doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.001225
91. *Mares D., Mrva K., Cheong J. et al.* A QTL located on chromosome 4A associated with dormancy in white- and red-grained wheats of diverse origin // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 111. P. 1357–1364. https://doi.org/10.1007/s00122-005-0065-5
92. *Torada A., Ikeguchi S., Koike M.* Mapping and validation of PCR-based markers associated with a major QTL for seed dormancy in wheat // Euphytica. 2005. V. 143. P. 251–255. https://doi.org/10.1007/s10681-005-7872-2
93. *Ogbonnaya F.C., Imtiaz M., Ye G. et al.* Genetic and QTL analyses of seed dormancy and preharvest sprouting resistance in the wheat germplasm CN10955 // Theor. Appl. Genet. 2008. V. 116. P. 891–902. https://doi.org/10.1007/s00122-008-0712-8
94. *Torada A., Koike M., Ogawa T. et al.* Causal gene for seed dormancy on wheat chromosome 4A encodes a map kinase kinase // Current Biology. 2016. V. 26. № 6. P. 782–787. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.063
95. *Hoecker U., Vasil I.K., McCarty D.R.* Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of maize // Genes Devel. 1995. V. 9. P. 2459–2469. https://doi.org/10.1101/gad.9.20.2459
96. *Paek N.C., Lee B.M., Bai D.G., Smith J.D.* Inhibition of germination gene expression by Viviparous-1 and ABA during maize kernel development // Mol. Cells. 1998. V. 8. P. 336–342.
97. *Wilkinson M.D., McKibbin R.S., Bailey P.C. et al.* Use of comparative molecular genetics to study pre harvest sprouting in wheat // Euphytica. 2002. V. 126. P. 27–33. https://doi.org/10.1023%2FA%3A1019627807335
98. *Chang C., Zhang H.P., Feng J.M. et al.* Identifying alleles of *Viviparous-1B* associated with pre-harvest sprouting in micro-core collections of Chinese wheat germplasm // Mol. Breeding. 2010. V. 25. P. 481–490. https://doi.org/10.1007%2Fs11032-009-9346-z
99. *Chang C., Zhang H.-P., Zhao Q.-X. et al.* Rich allelic variations of *Viviparous-1A* and their associations with seed dormancy/pre-harvest sprouting of common wheat // Euphytica. 2011. V. 179. P. 343–353. https://doi.org/10.1007/s10681-011-0348-7
100. *Sun Y.W., Nie L.N, Ma Y.Z. et al.* Cloning and functional analysis of Viviparous-1 promoter in wheat // Acta. Agronomica Sinica. 2011. V. 37. № 10. P. 1743–1751. https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2011.01743
101. *Flintham J.E.* Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy in wheat // Seed Sci. Res. 2000. V. 10. № 1. P. 43–50. https://doi.org/10.1017/S0960258500000052

102. *Santos L.T., Pinto R.J.B., Franco F.A., Schuster I.* Inheritance and potential use of grain color in the identification of genotypes resistant to pre-harvest sprouting in wheat // Crop Breed Appl. Biotechnol. 2010. V. 10. № 3. P. 218–224. https://doi.org/10.1590/S1984-70332010000300006

103. *Metzger R.J., Silbaugh B.A.* Locations of genes for seed coat colour in hexaploid wheat, *Triticum aestivum* L. // Crop Science. 1970. V. 10. № 5. P. 495–496. https://doi.org/10.2135/cropsci1970.0011183X00100-0050012x

104. *Mares D., Himi E.* The role of *TaMYB10-A1* of wheat (*Triticum aestivum* L.) in determining grain coat colour and dormancy phenotype // Euphytica. 2021. V. 217. № 89. https://doi.org/10.1007/s10681-021-02826-8

105. *Nakamura S., Abe F., Kawahigashi H. et al.* A wheat homolog of MOTHER OF FT AND TFL1 acts in the regulation of germination // Plant Cell. 2011. V. 23. № 9. P. 3215–3229. https://doi.org/10.1105/tpc.111.088492

106. *Liu S., Sehgal S.K., Li J. et al.* Cloning and characterization of a critical regulator for pre-harvest sprouting in wheat // Genetics. 2013. V. 195. № 1. P. 263–273. https://doi.org/10.1534/genetics.113.152330

107. *Zhang Y., Miao X., Xia X., He Z.* Cloning of seed dormancy genes (*TaSdr*) associated with tolerance to pre-harvest sprouting in common wheat and development of a functional marker // Theor. Appl. Genet. 2014. V. 127. P. 855–866. https://doi.org/10.1007/s00122-014-2262-6

108. *Zhang Y., Xia X., He Z.* The seed dormancy allele *TaSdr-A1a* associated with pre-harvest sprouting tolerance is mainly present in Chinese wheat landraces // Theor. Appl. Genet. 2017. V. 130. P. 81–89. https://doi.org/10.1007/s00122-016-2793-0

109. *Roy J.K., Prasad M., Varshney R.K.* Identification of a microsatellite on chromosomes 6B and a STS on 7D of bread wheat showing an association with pre-harvest sprouting tolerance // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 99. P. 336–340.

110. *Yang Y., Zhao X.L., Xia L.Q. et al.* Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 115. P. 971–980. https://doi.org/10.1007/s00122-007-0624-z

111. *Yang Y., Zhang C.L., Liu S.X. et al.* Characterization of the rich haplotypes of Viviparous-1A in Chinese wheats and development of a novel sequence-tagged site marker for pre-harvest sprouting resistance // Mol. Breed. 2014. V. 33. P. 75–88. https://doi.org/10.1007/s11032-013-9935-8

112. *Chen C.X., Cai S.B., Bai G.H.* A major QTL controlling seed dormancy and pre- harvest sprouting resistance on chromosome 4A in a Chinese wheat landrace // Mol. Breed. 2007. V. 21. P. 351–358. https://doi.org/10.1007/s11032-007-9135-5

113. *Yang Y., Zhang C.L., Chen X.M. et al.* Identification and validatation of molecular markers for PHS tolerance in red-grained spring wheat // J. Triticeae Crops. 2011. V. 31. № 1. P. 54–59.

114. *Yang Y., Zhao X.L., Zhang Y. et al.* Evaluation and validation of four molecular markers associated with pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats // Acta. Agronomica Sinica. 2008. V. 34. P. 17–24. https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2008.00017

115. *Liu S., Sehgal S.K., Li J. et al.* Cloning and characterization of a critical regulator for pre-harvest sprouting in wheat // Genetics. 2013. V. 195. № 1. P. 263–273. https://doi.org/10.1534/genetics.113.152330

116. *Zhang Y., Xia X., He Z.* The seed dormancy allele TaSdr-A1a associated with pre-harvest sprouting tolerance is mainly present in Chinese wheat landraces // Theor. Appl. Genet. 2017. V. 130. P. 81–89. https://doi.org/10.1007/s00122-016-2793-0

117. *Zhang H.P., Chang C., You G.X. et al.* Identification of molecular markers associated with seed dormancy in mini core collections of Chinese wheat and landraces // Acta. Agronomica Sinica. 2010. V. 36. № 10. P. 1649–1656. https://doi.org/10.1016/S1875-2780(09)60077-8

118. *Wang Y., Wang X.L., Meng J.Y. et al.* Characterization of Tamyb10 allelic variants and development of STS marker for pre-harvest sprouting resistance in Chinese bread wheat // Mol. Breed. 2016. V. 36. № 148. https://doi.org/10.1007/s11032-016-0573-9

119. *Xia L.Q., Yang Y., Ma Y.Z. et al.* What can the Viviparous-1 gene tell us about wheat pre-harvest sprouting // Euphytica. 2009. V. 168. P. 385–394. https://doi.org/10.1007/s10681-009-9928-1

120. *Беспалова Л.А., Васильев А.В., Аблова И.Б. и др.* Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Вавилов. журн. генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 37–43.

121. *Vanzetti L.S., Yerkovich N.Y., Chialvo E. et al.* Genetic structure of Argentinean hexaploid wheat germplasm // Genet. Mol. Biol. 2013. V. 36. № 3. P. 391–399.

122. *Rasheed A., Wen W., Gao F. et al.* Development and validation of KASP assays for functional genes underpinning key economic traits in wheat // Theor. Appl. Genet. 2016. V. 129. P. 1843–1860. https://doi.org/10.1007/s00122-016-2743-x

123. *Guo F.Z., Liang W.G., Fan Q.Q. et al.* The distribution and evolution of allelic variation of *Vp1B3* in Shandong Wheat // J. Triticeae Crops. 2009. V. 29. P. 575–578.

124. *Zhao B., Wan Y.X., Wang R.* Screening of wheat cultivar resources with pre-harvest sprouting resistance // J. Anhui Agric. Sci. 2010. V. 38. P. 8900–8902.

125. *Miao X.L., Wang D.S., Xia L.Q. et al.* Analysis on the mechanism of pre-harvest sprouting resistance in white-grain wheat // J. Triticeae Crops. 2011. V. 31. P. 741–746.

126. *Леонова И.Н.* Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов // Вавилов. журн. генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 2. С. 314–325.

Pre-Harvest Sprouting in Soft Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Evaluation Methods

A. V. Fedyaeva[a, b, *], E. A. Salina[a, c], and V. K. Shumny[a]

[a] *Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

[b] *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

[c] *Kurchatov Genomics Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Brauch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: fedyaeva.anna@mail.ru*

The review is devoted to pre-harvest sprouting (PHS) in soft winter wheat (*Triticum aestivum* L.) as one of the main problems faced by specialists in the field of genetics and selection of grain crops. Pre-harvest sprouting leads to a decrease in yields and economic losses. In the present work the internal and external factors which influence PHS grain crops as well as their interrelation, has been described. The characteristic for efficiency and featuresthe use of physiology-biochemical and molecular genetic methods to evaluate the pre-harvest sprouting resistance of soft wheat grain are given.

Keywords: pre-harvest sprouting, winter wheat, methods, tolerance.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 18–25

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 575.224.4

nm-ТЕСТ – УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ ВЕРСИЯ АЛЬФА-ТЕСТА ДЛЯ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*, ОБЛАДАЮЩАЯ БОЛЕЕ ВЫСОКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ ПО ОТНОШЕНИЮ К ГЕНОТОКСИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

© 2023 г. Е. И. Степченкова[1, 2, *], Ю. В. Андрейчук[1], Д. В. Афанасова[2], С. П. Задорский[1, 2], С. Г. Инге-Вечтомов[1, 2]

[1]Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Санкт-Петербургский филиал, Санкт-Петербург, 199034 Россия

[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

**e-mail: stepchenkova@gmail.com*

Поступила в редакцию 11.01.2022 г.
После доработки 10.03.2022 г.
Принята к публикации 04.05.2022 г.

Одной из актуальных проблем генетической токсикологии является разработка новых и совершенствование существующих тест-систем для своевременного выявления и оценки уровня мутагенной и канцерогенной активности различных факторов. Особое место среди тест-систем генетической токсикологии занимает альфа-тест, основанный на использовании особенностей жизненного цикла дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Его главное отличие от существующих тест-систем заключается в возможности выявлять широкий спектр генетических изменений, таких как генные мутации, конверсия, рекомбинация, потеря правого плеча и целой III хромосомы, а также первичные повреждения генетического материала до их устранения системами репарации. В рамках данной работы были намечены и апробированы способы генетической модификации используемых в альфа-тесте штаммов, направленные на повышение чувствительности и эффективности тест-системы. Полученные нами результаты позволили заключить, что предложенная нами модификация тестерного штамма привела к повышению разрешающей способности тест-системы на порядок.

Ключевые слова: альфа-тест, nm-тест, генетическая токсикология, генные мутации, первичные повреждения.

DOI: 10.31857/S0016675822120128, **EDN:** CLAKAN

Разработка новых методов выявления мутагенов и изучения механизмов их действия не теряет своей актуальности в связи с постоянным расширением спектра потенциальных генотоксических факторов, с которыми человек может столкнуться в повседневной жизни. Уникальное положение среди известных тест-систем занимает альфа-тест, разработанный нами ранее на модельном организме – дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и успешно применявшийся для изучения различных аспектов мутагенеза [1–7]. Отличительной особенностью альфа-теста является то, что с его помощью можно выявлять фенотипическое проявление первичных повреждений генетического материала до их устранения системами репарации, а также отличать первичные повреждения от генных или хромосомных мутаций [8]. Благодаря таким свойствам использование альфа-теста может быть весьма перспективно для первичного скрининга мутагенных факторов, а возможность выявления разных по своей природе генетических нарушений может стать полезной в фундаментальных исследованиях при изучении молекулярных механизмов мутагенеза.

При разработке альфа-теста были использованы особенности генетического контроля типа спаривания почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* [9]. Жизненный цикл *S. cerevisiae* состоит из гаплоидной и диплоидной фаз. Гаплоидные клетки дрожжей противоположных типов спаривания (a и α) могут скрещиваться с образованием диплоидных гибридов, которые в свою очередь способны вступать в мейоз с образованием тетрады гаплоидных спор (2a : 2α). Культуры гетероталличных штаммов дрожжей сохраняют гаплоидное состояние в течение длительного времени. Напротив, гомоталличные штаммы быстро диплои-

дизуются, поскольку у них с высокой частотой происходит генетически детерминированное переключение типа спаривания, в результате которого в чистой культуре гомоталличного штамма дрожжей появляются клетки противоположного типа. В результате гибридизации исходных клеток и клеток, переключивших тип спаривания на противоположный, доля диплоидных клеток в культуре гомоталличного штамма быстро нарастает.

Тип спаривания дрожжевой клетки определяется локусом *MAT* [9]. Переключение типа спаривания у гомоталличных штаммов происходит в результате конверсии генетической информации из молчащих кассет *HMRa* или *HMLα* в локус *MAT*. У гомоталличных штаммов переключение типа спаривания генетически детерминировано и происходит регулярно при каждом делении благодаря активности эндонуклеазы Ho, которая вносит разрыв в определенном сайте локуса *MAT* и таким образом стимулирует конверсию. У гетероталличных штаммов отсутствует эндонуклеаза Ho. Поэтому у таких штаммов переключение типа спаривания может происходить в результате более редких событий: конверсии, индуцированной случайными разрывами в локусе *MAT*, и мутаций или повреждений генетического материала в локусе *MATα* [1–3].

Локус *MAT* может быть представлен альтернативными последовательностями – *MATa* или *MATα*. Альтернативные варианты локуса *MAT* имеют разное происхождение, а их нуклеотидные последовательности существенно различаются, поэтому *MATa* и *MATα* называют идиоморфами, в отличие от аллелей, которые обычно имеют большее сходство [10]. Идиоморф *MATα* содержит две открытые рамки считывания – *MATα1* и *MATα2*, экспрессия которых регулируется общим двусторонним промотором [11]. В локусе *MATa* также имеются две открытые рамки считывания – *MATa1* и *MATa2*. Гены, содержащиеся в локусе *MAT*, кодируют транскрипционные факторы, которые регулируют экспрессию специфичных для каждого типа спаривания генов. Так, Matα1 совместно с белком Mcm1 активирует альфа-специфичные гены *αsg* (α-specific genes), а Matα2 в комплексе с Mcm1 является репрессором a-специфичных генов *asg* (a-specific genes), экспрессирующихся конститутивно [12–14]. В диплоидных клетках, в которых одновременно присутствуют *MATα* и *MATa*, белки Matα2 и Mata1 подавляют экспрессию гаплоид-специфичных генов *hsg* и активируют диплоид-специфичные гены, что необходимо для споруляции, диплоидные клетки не способны к дальнейшему скрещиванию. Нарушение экспрессии одновременно обоих генов *MATα1* и *MATα2* в результате мутации или повреждения ведет к тому, что клетка, исходно имевшая тип спаривания α, переключает его на тип спаривания a. Мутанты, у которых отсутствует экспрессия одновременно обоих генов *MATα1* и *MATα2*, способны скрещиваться с клетками α-типа спаривания. Гибриды от такого скрещивания имеют тип спаривания α, поэтому фенотип двойных мутантов *matα1 matα2* является рецессивным. При появлении мутаций только в одном из двух генов (*MATα1* или *MATα2*) клетки дрожжей теряют способность к спариванию и приобретают фенотип, условно обозначаемый nm (non-mating), поскольку при инактивации гена *MATα2* одновременно экспрессируются как *asg*, так и *αsg*, а при инактивации *MATα1* отсутствуют продукты *αsg* и *asg*.

Альфа-тест получил свое название в связи с тем, что показателем генетической активности тестируемого фактора является частота переключения типа спаривания α → a у гетероталличных штаммов дрожжей. Если какой-либо фактор приводит к статистически-значимому возрастанию частоты переключения типа спаривания α → a, то такой фактор является мутагеном. Частоту переключения типа спаривания оценивают по частоте образования “незаконных” гибридов двух штаммов α-типа спаривания. Для этого клетки двух штаммов высевают совместно на селективную среду для отбора гибридов, а затем определяют соотношение числа выросших “незаконных” гибридов к числу высеянных клеток. Эффективность альфа-теста была подтверждена в целом ряде научных исследований, кроме того были опубликованы работы, в которых альфа-тест был использован в качестве основного метода для изучения различных аспектов мутагенеза [1–7]. Опыт использования альфа-теста, накопленный к настоящему времени, позволяет наметить пути совершенствования тест-системы, которые будут способствовать повышению ее чувствительности и эффективности. Перспективным подходом к повышению чувствительности альфа-теста может стать модификация тестерного штамма путем инактивации одной из двух открытых рамок считывания локуса *MATα*. Мы полагаем, что использование мутанта по одному из двух генов локуса *MATα* в качестве тестерного штамма могло бы существенно повысить чувствительность тест-системы, поскольку в отличие от переключения типа спаривания α → a, переключение nm → a должно происходить чаще. В последнем случае для приобретения клеткой типа спаривания a необходимо появление лишь одной мутации (или первичного повреждения) во втором гене локуса

*MAT*α, а при скрещивании α × α для переключения α → a требуется осуществление двух событий, одновременно инактивирующих *MAT*α*1* и *MAT*α*2*. В настоящей работе мы проверили эту гипотезу и оценили частоту переключения типа спаривания nm → a в сравнении с α → a.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы дрожжей Saccharomyces cerevisiae, среды и условия культивирования. В работе использовали штаммы дрожжей: Д926 (*MAT*α *// MAT*α *leu2*Δ *// leu2*Δ *lys2*Δ *// lys2*Δ *ura3*Δ *// ura3*Δ *his4*Δ *// his4*Δ *thr4*Δ *// thr4*Δ) и K5-35B-Д924 (*MAT*α *ura3*Δ *leu2*Δ *lys5::KanMX met15*Δ) [15]; A-K5-35B-Д924 (*mat*α*2 ura3*Δ *leu2*Δ *lys5::kanMX met15*Δ) (получен в данной работе); 78A-П2345 (*MAT*α *his5*) и 2Г-П2345 (*MATa his5*) (Петергофская генетическая коллекция). Для внесения мутации *mat*α*2*, представляющей собой замену глутаминового кодона на преждевременный стоп-кодон TAA (C37T), мы использовали метод двухшагового замещения. Для этого штамм K5-35B-Д924 трансформировали интегративной плазмидой pRS306-MATα2-STOP, несущей полноразмерный локус *MAT*α с мутантным аллелем *mat*α*2*. Перед трансформацией плазмида была гидролизована рестриктазой SpeI по сайту, находящемуся в *MAT*α. Трансформантов отбирали на среде без урацила. Затем отобранных трансформантов высевали на среду с 5-фтороротовой кислотой (ФОК) для селекции клонов, у которых произошло выщепление плазмиды из хромосомы. Среди клонов Ura^- отбирали те, которые обладали фенотипом nm, что является следствием успешного замещения аллеля *MAT*α*2* дикого типа на мутантный *mat*α*2*. Полученный таким образом штамм с мутацией *mat*α*2* получил название A-K5-35B-Д924. Наличие мутации в гене *MAT*α*2* штамма A-K5-35B-Д924 подтверждали секвенированием.

Дрожжи выращивали на полных средах: жидкой и твердой среде YEPD [16, 17] и минимальной среде MD (минимальная дрожжевая среда по рецепту Yeast Nitrogen Base), содержащей необходимые аминокислоты, азотистые основания, витамины и микроэлементы [17]. Среду для отбора гибридов готовили на основе MD с добавлением урацила, гистидина, лейцина и треонина в стандартных концентрациях. Для отбора штаммов с мутацией по гену *URA3* использовали минимальную среду, которая содержала 1 г/л ФОК, а также все необходимые аминокислоты в стандартной концентрации и урацил (50 мг/л). Дрожжи выращивали при температуре 30°C.

Альфа-тест. Для каждого исследуемого штамма (тестерный штамм) выращивали 10 независимых культур в жидкой среде YEPD в течение 16 ч при 30°C на качалке. При тех же условиях растили культуру штамма-партнера для скрещивания. Для проведения теста на “незаконную” гибридизацию аликвоты из каждой культуры тестерного штамма и ночной культуры штамма-партнера для скрещивания высевали совместно на селективную среду для отбора “незаконных” гибридов. Параллельно подходящие разведения клеток тестерного штамма высевали на среду YEPD для оценки выживаемости. В экспериментах с использованием УФ-излучения сначала проводили облучение клеток тестерного штамма ультрафиолетовым светом с длиной волны 264 нм на твердых селективной и полной средах, а затем к тестерному штамму на среду для отбора гибридов подсевали штамм-партнер для скрещивания Д926. Доза облучения составляла 10 Дж/м^2. Чашки инкубировали трое суток при 30°C, затем подсчитывали число выросших колоний на каждой чашке. Общую частоту “незаконной” гибридизации в каждой культуре вычисляли как отношение числа колоний, выросших на среде для отбора “незаконных” гибридов, к числу колоний, выросших на полной среде, с учетом соответствующих факторов разведения.

Для каждого варианта экспериментальных условий (тестерный штамм и доза УФ) было отобрано и проверено не менее 500 “незаконных” гибридов с целью анализа их фенотипа. Для определения типа спаривания отобранные “незаконные” гибриды скрещивали с тестерными штаммами 2Г-П2345 и 78A-П2345 a и α типов спаривания соответственно. По способности “незаконных” гибридов скрещиваться с тестерными штаммами идентифицировали тип спаривания α или некопулирующий (nm). Отобранных “незаконных” гибридов распределяли по классам в соответствии с их фенотипом: типом спаривания и наличием ауксотрофностей по гистидину и треонину, являющихся маркерами левого и правого плеча хромосомы III соответственно (табл. 1). На основе полученных данных определяли частоту гибридов каждого класса.

Для попарного сравнения значений общей частоты “незаконной” гибридизации и частоты отдельных классов “незаконных” гибридов использовали непараметрические статистические методы: определяли медиану по 10 независимым измерениям и 95%-ный доверительный интервал для медианы. Верхнюю и нижнюю границы доверительного интервала определяли стандартным методом, описанным в ГОСТ Р 50779.24-2005 (https://docs.cntd.ru/document/1200039763, дата обращения 07.02.2022). Оценку статистической

Таблица 1. Генетические события, выявляемые в тесте на “незаконную” гибридизацию, и фенотип соответствующих “незаконных” гибридов при использовании тестерного штамма *MAT*α *HIS4 THR4* и штамма-партнера для скрещивания *MAT*α *his4 thr4*

Генетическое событие	Фенотип “незаконного” гибрида
Конверсия кассеты *HMRa* в локус *MAT*α	nm His+ Thr+
Реципрокная рекомбинация между локусом *MAT*α и кассетой *HMRa*	nm His+ Thr–
Потеря правого плеча хромосомы III	α His+ Thr–
Потеря хромосомы III	α His– Thr–
Мутация в локусе *MAT*α (в *MAT*α*1* или *MAT*α*2*)	α His+ Thr+
Мутации в *MAT*α (одновременно в *MAT*α*1* и *MAT*α*2* или в двустороннем промоторе, делеции *MAT*α)	
Временные (первичные) повреждения в локусе *MAT*α (одновременно в *MAT*α*1* и *MAT*α*2* или в двустороннем промоторе), устраняемые репарацией безошибочно после скрещивания	

Примечание. Маркеры *HIS4* и *THR4* находятся в левом и правом плечах хромосомы III соответственно.

значимости отличий проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для того чтобы оценить влияние мутации *mat*α*2* на эффективность теста на “незаконную” гибридизацию мы сравнили частоту и спектр генетических нарушений, выявляемых при использовании тестерного штамма *mat*α*2* и изогенного ему штамма дикого типа. При проведении тестов на “незаконную” гибридизацию мы оценивали частоту как спонтанных нарушений генетического материала, так и нарушений, индуцированных УФ-излучением. Для регистрации событий, приводящих к переключению типа спаривания nm → a и α → a, в качестве штамма-партнера для скрещивания использовали диплоидный штамм Д926, гомозиготный по *MAT*α и маркерам хромосомы III (*his4*Δ и *thr4*Δ). Процедура проведения теста описана в разделе “Материалы и методы”.

Согласно полученным нами данным наличие мутации *mat*α*2* в геноме тестерного штамма приводит к 10-кратному увеличению общей частоты “незаконной” гибридизации, как спонтанной, так и индуцированной УФ-излучением, по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 1).

Для того чтобы выявить генетические события, за счет которых увеличивается частота “незаконной” гибридизации на фоне мутации *mat*α*2*, мы проверили фенотип не менее 500 “незаконных” гибридов, возникших в скрещивании штаммов *mat*α*2* или *MAT*α*2* со штаммом-партнером для скрещивания Д926. Затем мы определили частоту всех классов событий, учитываемых в тесте на “незаконную” гибридизацию и перечисленных в табл. 1. Результаты этого анализа представлены в табл. 2. Мы показали, что частота возникновения “незаконных” гибридов фенотипического класса “мутации и первичные повреждения в локусе *MATa*” возрастает приблизительно в 63 раза без воздействия УФ и при облучении УФ приблизительно в 6 раз. Изменения частот остальных учитываемых в альфа-тесте генетических событий у мутанта *mat*α*2* по сравнению с *wt* незначительны, хотя статистически значимы: происходит небольшое (в 1.5 раза) повышение частоты конверсии кассеты *HMRa* в *MAT*α, а также небольшое (по сравнению с изменениями в частоте класса “мутации и временные повреждения”) снижение частоты потери правого плеча хромосомы III и частоты рекомбинации *HMRa* и *MAT*α. Полученные нами данные о влиянии мутации *mat*α*2* на общую частоту “незаконной” гибридизации и частоту отдельных классов “незаконных” гибридов соответствуют ожидаемым и укладываются в модель, согласно которой за счет временных повреждений и генных мутаций переключение типа спаривания α → a происходит реже, чем переключение типа спаривания nm → a, поскольку в первом случае необходима одновременная инак-

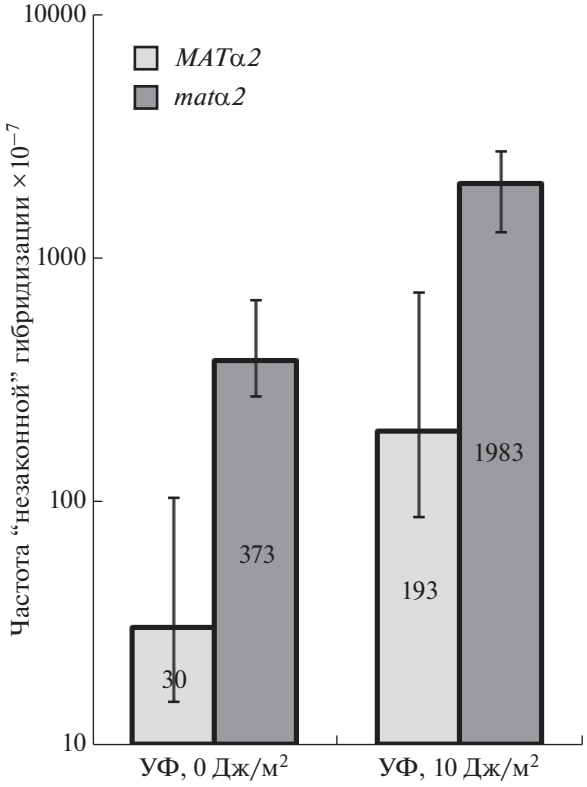


Рис. 1. Частота "незаконной" гибридизации в скрещивании штаммов K5-35B-Д924 (*MATα2*) × Д926 и A-K5-35B-Д924 (*matα2*) × Д926. На диаграмме с логарифмической шкалой представлены медиана и доверительный интервал ($n = 10$). Различия между штаммами *MATα2* и *matα2* статистически значимы по критерию Манна–Уитни (p-значение < 0.0001).

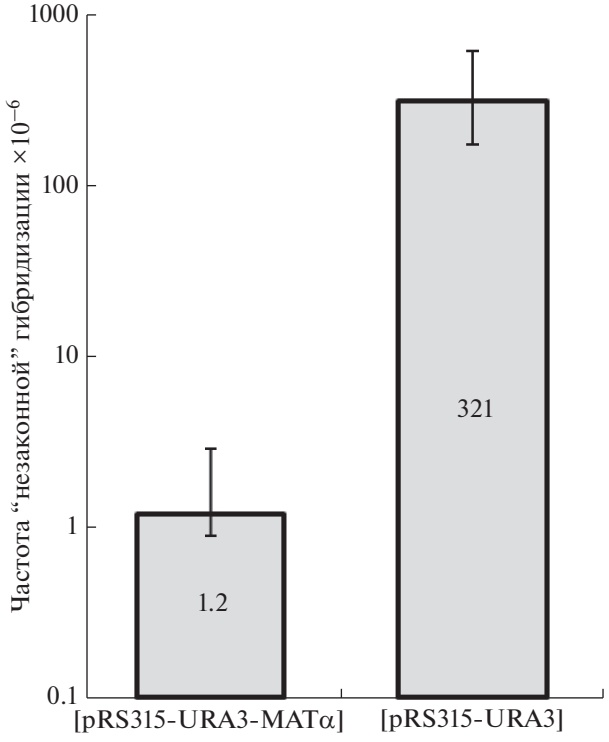


Рис. 2. Влияние дополнительной копии локуса *MATα* на частоту "незаконной" гибридизации. На диаграмме с логарифмической шкалой представлены медиана и доверительный интервал ($n = 10$). Различия между значениями частоты "незаконной" гибридизации статистически значимы по критерию Манна–Уитни (p-значение < 0.0001).

тивация обоих генов локуса *MAT*, а во втором случае только одного из двух генов. Частота хромосомных нарушений, учитываемых в альфа-тесте, не зависит от наличия в геноме тестерного штамма мутации в одном из генов *MATα*, что также соответствует ожидаемым результатам.

Для дополнительной проверки нашего предположения о причинах более высокой частоты гибридизации в скрещивании nm × α, чем в скрещивании α × α, мы провели дополнительный эксперимент, в котором оценили влияние дополнительной копии локуса *MATα* на эффективность "незаконной" гибридизации. Мы использовали штамм K5-35B-Д924, трансформированный центромерной плазмидой pRS315-URA3-MATα, несущей полноразмерный локус *MATα*. В качестве контроля использовали трансформанты штамма K5-35B-Д924, несущие вектор pRS315-URA3 без *MATα*. Данные, представленные на рис. 2, указывают на то, что введение дополнительной копии локуса *MATα* на плазмиде значительно снижает частоту "незаконной" гибридизации (приблизительно в 155 раз). Полученные результаты подтверждают нашу гипотезу о том, что подавляющее большинство событий, приводящих к переключению типа спаривания, представляют собой изменения в локусе типа спаривания *MATα*.

ОБСУЖДЕНИЕ

С целью повышения чувствительности тест-системы мы инактивировали ген *MATα2* у тестерного штамма, который при проведении альфа-теста подвергается обработке мутагенными факторами и переключение типа спаривания которого служит индикатором мутагенной активности исследуемых факторов. Мы показали, что мутация *matα2* в тестерном штамме на порядок повышает частоту "незаконной" гибридизации и таким образом способствует увеличению чувствительности тест-системы. Частота различных генетических событий, учитываемых в альфа-тесте, на фоне мутации *matα2* изменяется неравномерно (табл. 2). Поскольку вероятность инактивации одного гена выше, чем вероятность одновременной инактивации двух генов, переключение типа спаривания

Таблица 2. Частота различных генетических событий, учитываемых в альфа-тесте, при скрещивании штаммов K5-35B-Д924 (*MATα2*) × Д926 и A-K5-35B-Д924 (*matα2*) × Д926

Штамм	УФ, Дж/м^2	Частота генетических событий, учитываемых в альфа-тесте, $\times 10^{-7}$ (медиана и доверительный интервал)				
		мутации и первичные повреждения в локусе *MATα*	потеря правого плеча III хромосомы	потеря III хромосомы	конверсия кассеты *HMRa* в локус *MATα*	рекомбинация *MATα* и *HMRa*
K5-35B-Д924	0	7.33 (5.4–12.0)	36.2 (26.9–59.6)	15.6 (11.5–25.6)	1.0 (0.7–1.7)	0.9 (0.7–1.5)
	10	105.8 (58.2–137.1)	91.7 (50.4–118.8)	20.2 (11.1–26.2)	3.2 (1.8–4.3)	8.9 (4.9–11.5)
A-K5-35B-Д924	0	463.6*** (281.5–599.9)	26.3* (15.9–34.1)	18 (10.9–23.3)	5.2*** (3.2–6.8)	0
	10	676.5*** (478.7–955.6)	55.1* (38.9–77.8)	13.2 (9.3–18.6)	5.9** (4.2–8.4)	2.4*** (1.7–3.4)

Примечание. *–*** – значения частоты для штамма с мутацией *matα2*, которые статистически значимо отличаются от значения для штамма дикого типа в тех же условиях (* p-значение < 0.05; ** p-значение = 0.001; *** p-значение ≤ 0.0001).

nm → a происходит с большей частотой, чем α → a. Частота хромосомных нарушений, учитываемых в альфа-тесте, не зависит от наличия в геноме тестерного штамма мутации *matα2*, что также соответствует ожидаемым результатам. Дополнительное подтверждение данной модели мы получили при изучении влияния дополнительной копии *MATα* на частоту "незаконной" гибридизации. Так, мы показали, что при внесении дополнительного локуса *MATα* на центромерной плазмиде частота образования "незаконных" гибридов снижается приблизительно в 155 раз. Этот результат согласуется с данными, опубликованными ранее, о том, что при проведении тестов на "незаконную" гибридизацию и "незаконную" цитодукцию с использованием штаммов-дисомиков по третьей хромосоме и диплоидов, т.е. штаммов, содержащих две копии локуса *MATα*, частота образования "незаконных" гибридов и цитодуктантов снижается настолько, что невозможно отобрать колонии в количестве, достаточном для определения значения частоты [3].

Таким образом, результаты, полученные нами в рамках настоящей работы, позволили выявить такие способы изменения генотипа штаммов, используемых в альфа-тесте, которые повышают чувствительность и эффективность тест-системы. Эти модификации были апробированы, а их эффективность проверена экспериментально. Использование полученного нами штамма A-K5-35B-Д924, несущего мутацию *matα2*, значительно повышает разрешающую способность альфа-теста в отношении генных мутаций и временных повреждений *MATα*. В отличие от классического варианта альфа-теста, когда скрещивают два штамма одинакового альфа-типа спаривания, в предлагаемом нами варианте тест-системы с использованием мутанта *matα2* используют скрещивание стерильного штамма nm со штаммом α-типа спаривания. В последнем варианте, который мы предлагаем назвать nm-тест, учитывают генетические нарушения, приводящие к переключению типа спаривания nm → a.

Для дальнейшего повышения чувствительности тестерного штамма перспективным может стать использование мутантов по генам различных систем репарации или генам, ответственным за биосинтез клеточной стенки, а также использование сверхэкспрессии генов ДНК-полимераз, способных осуществлять синтез на поврежденной матрице. Подобные модификации используются в тесте Эймса, являющемся "золотым стандартом" генетической токсикологии [18, 19]. Использование мутантов по генам, контролирующим структуру клеточной стенки, может увеличить чувствительность к мутагенным агентам за счет повышения ее проницаемости для химических веществ и физических факторов, а внося дефекты систем репа-

рации и устойчивости к повреждениям ДНК, можно повысить чувствительность к факторам, вызывающим повреждения ДНК или генные мутации.

Авторы благодарны ресурсному центру СПбГУ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” за содействие в проведении исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00663.

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. *Inge-Vechtomov S.G., Pavlov Y.I., Noskov V.N. et al.* Tests for genetic activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Study of forward and reverse mutation, mitotic recombination and illegitimate mating induction // Progress in Mutation Research. Evaluation of short-term tests for carcinogens: Report of the International Programme on Chemical Safety’s collaborative study on in vitro assays. Amsterdam: The Netherlands Elsevier, 1985. P. 243–255.
2. *Инге-Вечтомов С.Г., Репневская М.В., Карпова Т.С.* Изучение скрещивания клеток одинакового типа спаривания у дрожжей сахаромицетов // Генетика. 1986. Т. 22. № 11. С. 2625–2636.
3. *Репневская М.В.* Наследуемые и ненаследуемые изменения типа спаривания у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: Дис. ... канд. биол. наук., Л.: ЛГУ, 1989. 210 с.
4. *Lemoine F.J., Degtyareva N.P., Lobachev K., Petes T.D.* Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase: A model for chromosome fragile sites // Cell. 2005. V. 120. P. 587–598. https://doi.org/10.1134/S000629791101007X
5. *Kochenova O.V., Soshkina Y.V., Stepchenkova E.I. et al.* Participation of translesion synthesis DNA polymerases in the maintenance of the chromosome integrity in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. № 1. P. 49–60. https://doi.org/10.1134/S000629791101007X
6. *Novoa C.A., Ang J.S., Stirling P.C.* The A-like faker assay for measuring yeast chromosome III stability // Methods Mol. Biol. 2018. V. 1672. P. 1–9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7306-4_1
7. *Жук А.С., Степченкова Е.И., Инге-Вечтомов С.Г.* Выявление модификаций первичной структуры ДНК, возникших под действием аналога азотистых оснований 6-N-гидроксиламинопурина, в альфа-тесте у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Экол. генетика. 2020. Т. 18. № 3. С. 357–367. https://doi.org/10.17816/ecogen34581
8. *Репневская М.В., Кашкин П.К., Инге-Вечтомов С.Г.* Модификационные изменения генетического материала у дрожжей сахаромицетов // Генетика. 1989. Т. 25. № 3. С. 425–436.
9. *Haber J.E.* Mating-type genes and *MAT* switching in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2012. V. 191. P. 33–64. https://doi.org/10.1534/genetics.111.134577
10. *Herskowitz I.* Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*// Microbiol. Reviews. 1989. V. 52. P. 536–553. https://doi.org/10.1128/MR.52.4.536-553.1988
11. *Siliciano P.G., Tatchell K.* Transcription and regulatory signals at the mating-type locus in yeast // Cell. 1984. V. 37. P. 969–978. https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90431-8
12. *Kassir Y., Simchen G.* Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating-type region // Genetics. 1976. V. 82. P. 187–206. https://doi.org/10.1093/genetics/82.2.187
13. *Hagen D.C., Bruhn L., Westby C.A., Sprague G.F. Jr.* Transcription of alpha-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*: DNA sequence requirements for activity of the coregulator alpha 1 // Mol. Cell. Biol. 1993. V. 13. P. 6866–6875. https://doi.org/10.1128/mcb.13.11.6866-6875.1993
14. *Bruhn L., Sprague G.F. Jr. MCM1* point mutants deficient in expression of alpha-specific genes: Residues important for interaction with alpha 1 // Mol. Cell. Biol. 1994.V. 14. P. 2534–2544. https://doi.org/10.1128/MCB.14.4.2534
15. *Степченкова Е.И., Коченова О.В., Инге-Вечтомов С.Г.* “Незаконная” гибридизация и “незаконная” цитодукция у гетероталличных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как система для анализа генетической активности экзогенных и эндогенных факторов в “альфа-тесте” // Вестник Санкт-Петербургского ун-та. Сер. 3. 2009. Вып. 4. С. 129–140.
16. *Инге-Вечтомов С.Г.* Идентификация некоторых групп сцепления у Петергофских генетических линий дрожжей // Генетика. 1971. Т. 7. № 9. С. 113–123.
17. *Rose M.D., Winston F., Hieter P.* Methods in Yeast Genetics. CSHL Press, 1990. 198 с.
18. *Maron D.M., Ames B.N.* Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test // Mutat. Res. 1983. V. 113. P. 173–215. https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9
19. *Mortelmans K., Zeiger E.* The ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay // Mutat. Res. 2000. V. 455. P. 29–60. https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6

nm-Test – An Improved Version of the Alpha-Test in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* with a Higher Sensitivity to Genotoxic Factors

E. I. Stepchenkova[a, b, *], Yu. V. Andreychuk[a], D. V. Afanasova[b], S. P. Zadorsky[a, b], and S. G. Inge-Vechtomov[a, b]

[a] *Vavilov Institute of General Genetics, Saint-Petersburg Branch, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 199034 Russia*

[b] *Saint Petersburg State University, Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg, 199034 Russia*

**e-mail: stepchenkova@gmail.com*

One of the urgent problems of genetic toxicology is the development of new and improvement of existing test systems for the detection and assessment of the level of mutagenic and carcinogenic activity of various factors. A unique position among the known test systems belongs to the alpha test, that is based on the life cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Its main difference from existing test systems is the ability to detect a wide range of genetic events, such as gene mutations, conversion, recombination, loss of the right arm and the entire III chromosome, as well as primary lesions to the genetic material before they are eliminated by repair systems. Here, we proposed and tested a genetic modification of tester strains that increased the sensitivity and efficiency of the test system. Our results allowed us to conclude that the proposed modification of the tester strain led to the sensitivity increase of the test system by an order of magnitude.

Keywords: alpha-test, nm-test, genetic toxycology, gene mutations, primary lesions.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 26–38

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 575.162+577.24

ВЛИЯНИЕ ГЕНА *aPKC*, КОДИРУЮЩЕГО АТИПИЧНУЮ ПРОТЕИНКИНАЗУ С, НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *D. melanogaster* ЗАВИСИТ ОТ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ GSK3

© 2023 г. М. В. Тростников[1, *], Е. Р. Веселкина[1], Ю. А. Андреев[1], А. Ю. Хрячкова[1], Н. В. Рощина[1, 2], Е. Г. Пасюкова[1]

[1]Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Москва, 123182 Россия

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

**e-mail: mikhail.trostnikov@gmail.com*

Поступила в редакцию 21.02.2022 г.
После доработки 14.04.2022 г.
Принята к публикации 26.05.2022 г.

Гены *shaggy* и *aPKC Drosophila melanogaster* кодируют высококонсервативные протеинкиназы GSK3 (Glycogen Syntase Kinase 3) и aPKC (Protein Kinase C), играющие ключевую роль во многих клеточных процессах. Ранее мы продемонстрировали, что изменение экспрессии гена *shaggy* в нейронах влияет на продолжительность жизни. В настоящей статье показано, что изменение экспрессии гена *aPKC* в нейронах также влияет на продолжительность жизни. Изменение экспрессии двух протеинкиназ во всех нейронах самцов и самок и в мотонейронах самцов приводило к изменению продолжительности жизни, свидетельствующему об отсутствии влияния aPKC на GSK3 и возможном ингибирующем действии GSK3 на aPKC. В то же время изменение экспрессии двух протеинкиназ в мотонейронах самок приводило к изменению продолжительности жизни, свидетельствующему о существовании пока неясного механизма взаимодействия между этими белками. Выяснение механизмов взаимодействия между aPKC, GSK3 и другими их партнерами позволит углубить и расширить наши представления о причинах долголетия и способах продления жизни.

Ключевые слова: продолжительность жизни, нервная система, протеинкиназа aPKC, протеинкиназа GSK3, *Drosophila melanogaster.*

DOI: 10.31857/S0016675823010125, **EDN:** CNOZBD

В современной биологии старения одним из наиболее активно развивающихся направлений является поиск ключевых факторов, приводящих к сокращению продолжительности жизни и сопутствующих возрастным изменениям. Выявление наиболее эволюционно консервативных триггеров старения создает базу для поиска потенциальных способов влияния на этот процесс и для выяснения общебиологических закономерностей, лежащих в основе ограниченной продолжительности жизни. В широко цитируемой работе [1] были сформулированы основные фундаментальные механизмы старения: увеличение уровня геномной нестабильности, уменьшение протеостаза, сокращение длины теломер, нарушение эпигенетической регуляции, появление сенесцентных и истощение стволовых клеток, нарушение работы митохондрий, усиление окислительного стресса, ослабление пищевого баланса и ряд других факторов. Существуют ли среди многообразных механизмов старения такие, которые инициируют развитие остальных? В ряде работ в качестве такого базового механизма рассматривается нарушение протеостаза, приводящее к накоплению агрегированных белков, неспособных корректно выполнять свою изначальную функцию, и ассоциированное с возрастными изменениями, средней продолжительностью жизни и широким спектром патологий [2].

Одним из наиболее устойчивых к протеолитическому стрессу типов клеток являются стволовые клетки, в которых выявлен повышенный уровень деградации белков с нарушенной структурой [3, 4]. Предполагается, что контроль протеостаза связан сзависимым от возраста распределением нарушенных белков между материнскими и дочерними клетками в процессе асимметричного деления стволовых клеток. Так, в старых стволовых клетках нервной ткани млекопитающих асимметрия в распределении поврежденных бел-

ков нарушается, в результате чего в дочерней клетке количество поврежденных белков увеличивается, нарушая ее функциональность [5].

Белки, контролирующие асимметричность клеточного деления, высоко консервативны, поэтому разумным является исследование взаимосвязи между молекулярными механизмами, регулирующими асимметричное деление клеток нервной системы и процесс старения, на модельных организмах с достаточно короткой продолжительностью жизни. К настоящему моменту одной из наиболее изученных моделей асимметричного деления является деление нейробластов плодовой мушки *Drosophila melanogaster* [6]. В процессе этого деления ось полярности определяется формированием и активностью комплекса, состоящего из атипичной протеинкиназы С (аPKC), а также белков Partitioning – defective 6 (Par-6) и Bazooka (Baz, гомолог Par-3 млекопитающих) [7]. В связи с изучением старения особый интерес представляет аPKC, поскольку у человека продемонстрировано изменение уровня ее экспрессии, ассоциированное с возрастом и развитием болезни Альцгеймера [8]. Такая ассоциация может быть обусловлена взаимодействием аPKC с протеинкиназой GSK3 [9]. Известно, что GSK3 участвует в работе различных метаболических путей, связанных с контролем продолжительности жизни и целого спектра патологий, среди которых особенно выделяются нарушения работы нервной системы [10, 11].

Ранее мы выяснили, что сильное или умеренное увеличение либо уменьшение экспрессии гена *shaggy* (*sgg*), кодирующего протеинкиназу GSK3, во всех нейронах уменьшает продолжительность жизни дрозофилы. В то же время нарушение экспрессии *sgg* в различных нейронах может приводить как к уменьшению, так и к увеличению продолжительности жизни в зависимости от направления и степени изменения экспрессии, типа нейронов и пола особей [12–14]. В настоящей статье мы показали, что уменьшение экспрессии гена *aPKC*, кодирующего протеинкиназу аPKC, в нервной системе также повлияло на продолжительность жизни дрозофилы. Изменение экспрессии двух протеинкиназ во всех нейронах самцов и самок и в мотонейронах самцов приводило к изменению продолжительности жизни, свидетельствующему об отсутствии влияния аPKC на GSK3 и возможном ингибирующем действии GSK3 на аPKC. В то же время изменение экспрессии двух протеинкиназ в мотонейронах самок приводило к изменению продолжительности жизни, свидетельствующему о существовании сложного и пока неясного механизма взаимодействия между исследуемыми протеинкиназами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии дрозофилы

Линии *y[1]sc[*]v[1]*; *P{y[+t7.7]v[+t1.8]==TRiP.HMC06305}attP40* (трансген аPKC_НД1) и *y[1]sc[*]v[1]*; *P{y[+t7.7]v[+t1.8]=TRiP.HMS01689}attP40* (трансген аPKC_НД2) с трансгенами, локализованными во второй хромосоме, использовали для нокдауна гена *aPKC*, приводящего к уменьшению уровня экспрессии аPKC. Исходную линию без трансгенов *y[1]v[1]*; *P{y[+t7.7]=CaryP}attP40* (контроль_аPKC) использовали в качестве контрольной в отношении нокдауна гена *aPKC* (http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/TRiPtb.htm).

Линию *w[1118]; P{w[+mC]=UAS-sgg.B}MB5* (трансген sggRB) с трансгеном, локализованным в третьей хромосоме и кодирующим основной транскрипт гена *sgg*, *RB* [15], использовали для сверхэкспрессии гена *sgg* и увеличения уровня экспрессии GSK3. Исходную линию *w[1118]* (контроль_sgg) без трансгена использовали в качестве контрольной в отношении сверхэкспрессии гена *sgg* [15].

Линии *P{w+mW.hs=GawB}elavC155w[1118]*; *P{w+mC=UAS-Dcr-2.D}2* (драйвер Д1) и *w**; *P{GawB}D42* (драйвер Д2) использовали для индукции экспрессии трансгенов во всех нейронах и в мотонейронах соответственно.

Измерение продолжительности жизни

Девственных самцов и самок каждого генотипа собирали в течение дня и помещали в пробирки с питательной средой (манная крупа, изюм, сахар, дрожжи, агар-агар, нипагин, пропионовая кислота), по пять мух каждого пола отдельно. Количество мертвых мух в пробирках регистрировали ежедневно; живых мух переносили на свежий корм раз в неделю; все культуры вели при 25°С. Выборка составила 50 особей на генотип/пол; опыты были повторены дважды. Для оценки полученных данных использовали стандартный статистический анализ продолжительности жизни [16, 17]. Для оценки статистической значимости различий между кривыми выживания использовали критерий Манна–Уитни.

Иммуногистохимический анализ

Личинок третьей стадии препарировали в натрий-фосфатном буфере (PBS) и фиксировали в 4%-ном параформальдегиде (Sigma-Aldrich) при комнатной температуре в течение 20 мин. Для иммуноокрашивания препараты помещали в блокирующий буфер (BlockPRO, Visual Protein Biotechnology Corporation) на один час при комнатной температуре, инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°С, с вторичными антителами в течение двух часов и помещали в среду для иммунофлуоресценции (VectaShield, Vector

Labs). После каждой стадии обработки препараты промывали в фосфатном буфере (3 × 15 мин). Были использованы первичные антитела против Bruchpilot (DSHB), белка, специфического для зон активных синаптических контактов [18], и пероксидазы хрена (Jackson ImmunoResearch), белка, широко используемого в качестве маркера пресинаптических мембран [19]. Нейромышечные связки были проанализированы в четвертой мышце третьего и четвертого сегментов брюшной полости пяти–семи личинок на генотип/пол с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (Zeiss LSM 900) и программ ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html) и LSM Image Browser (Zeiss).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа взаимодействия между генами *aPKC* и *sgg*, используя стандартные скрещивания с хромосомами-балансерами, мы получили линии, в геноме которых присутствовали первая хромосома *w[1118]*; вторая хромосома с одним из трансгенов, уменьшающих уровень экспрессии протеинкиназы aPKC; и третья хромосома с трансгеном, увеличивающим уровень экспрессии протеинкиназы GSK3, а также соответствующие контрольные линии. Линии были названы контроль_aPKC+ +контроль_sgg, aPKC_НД1+контроль_sgg, aPKC_НД2+контроль_sgg; aPKC_НД1+sggRB, aPKC_НД2+sggRB в соответствии с обозначением трансгенов (см. раздел “Материалы и методы”). Во всех линиях подтвердили отсутствие *Wolbachia*, симбионта дрозофилы, способного повлиять на ее продолжительность жизни [20].

Для индукции экспрессии трансгенов во всех нейронах или в мотонейронах самцов каждой из полученных линий скрещивали с самками соответствующей линии-драйвера. У самцов и самок всех генотипов была охарактеризована продолжительность жизни. Результаты двух повторных опытов хорошо совпали между собой (табл. 1), несмотря на небольшой объем каждого опыта, что, видимо, объясняется сильно выраженным влиянием уровня экспрессии aPKC и GSK3 на исследуемый признак. Это позволило нам ограничиться двумя повторностями и объединить их для представления результатов.

Уменьшение количества aPKC во всех нейронах снизило продолжительность жизни как самцов, так и самок (среднюю продолжительность жизни – на 68 и 35% в случае aPKC_НД1 и на 54 и 13% в случае aPKC_НД2; табл. 1, рис. 1). Этот эффект существенно усилился в том случае, когда уменьшение количества aPKC во всех нейронах происходило на фоне увеличении количества GSK3. Среди самцов с одним из вариантов нокдауна гена *aPKC* и сверхэкспрессией гена *sgg* выжило всего несколько особей, продолжительность их жизни не превышала двух дней; кривая выживания для этого случая не представлена (табл. 1, рис. 1,*а*). Самцы с другим вариантом нокдауна гена *aPKC* и сверхэкспрессией гена *sgg* выживали лучше, но средняя продолжительность их жизни не превышала трех дней (табл. 1, рис. 1,*б*). Средняя продолжительность жизни самок в обоих случаях также была крайне низкой (4 ± 0.2 дня; табл. 1, рис. 1,*б*, 1,*г*). Было показано, что GSK3 способна фосфорилировать aPKC и таким образом ингибировать ее [9]. Если это так, то у мух с нокдауном гена *aPKC* на фоне увеличения экспрессии GSK3 должно было наблюдаться дальнейшее уменьшение экспрессии aPKC и дальнейшее снижение продолжительности жизни. Именно такой эффект мы наблюдали в наших экспериментах, что позволяет говорить о возможном ингибирующем действии GSK3 на aPKC в нейронах в ходе контроля продолжительности жизни. В то же время дальнейшее снижение продолжительности жизни могло быть и следствием независимого, аддитивного влияния уменьшения активности aPKC и увеличения активности GSK3 в нейронах.

Действительно, в ранее проведенном исследовании мы показали, что само по себе увеличение экспрессии гена *sgg*, кодирующего GSK3, во всех нейронах также приводило к очень существенному снижению средней продолжительности жизни самцов и самок, до 3 ± 0.1 и 7 ± 0.4 дней соответственно [13]. Средняя продолжительность жизни самцов и самок с увеличенной экспрессией GSK3 во всех нейронах составила 4 и 9% от средней продолжительности жизни соответствующего контроля [13]. Результаты же, представленные в настоящей статье, показали, что средняя продолжительность жизни самцов и самок с увеличенной экспрессией GSK3 на фоне уменьшенной экспрессии aPKC во всех нейронах составила в среднем 12 и 8% от средней продолжительности жизни соответствующего контроля. Известно, что aPKC может фосфорилировать и тем самым ингибировать GSK3 [21]. В таком случае в наших опытах у мух с увеличенной экспрессией GSK3 на фоне нокдауна гена *aPKC* должно было наблюдаться еще большее увеличение экспрессии GSK3, а следовательно еще большее снижение продолжительности жизни. Однако ни у самцов, ни у самок такого не наблюдалось, влияние увеличения экспрессии GSK3 на продолжительности жизни было сходным в отсутствие и в присутствии нокдауна гена *aPKC*. Тем не менее, поскольку продолжительность жизни была очень низкой у мух всех генотипов с увеличенной экспрессией GSK3, сделать надежное заключение о взаимодействии генов aPKC и GSK3 на основании полученных данных было трудно.

Чтобы преодолеть возникшее затруднение, мы использовали два подхода. Первый подход заключался в том, чтобы оценить влияние увеличенной экспрессии GSK3 на фоне нокдауна *aPKC*

Таблица 1. Параметры, характеризующие продолжительность жизни самцов и самок с нокдауном гена *aPKC*

Тип клеток (драйвер)	Линии с трансгенами	Пол	Вариант опыта	*N*	Средняя продолжительность жизни (ошибка средней), дни	Достоверность отличия от контрольного генотипа, тест Манна–Уитни*
Все нейроны (Д1)	Контроль_aPKC+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	50 (2.4)	
			Опыт 2	50	61 (2.6)	
			Сумма	100	56 (1.9)	
		♀	Опыт 1	50	79 (2.6)	
			Опыт 2	50	77 (2.2)	
			Сумма	100	78 (1.7)	
	aPKC_НД1+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	17 (1.9)	<0.0001
			Опыт 2	50	19 (1.3)	<0.0001
			Сумма	100	18 (1.1)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	53 (2.3)	<0.0001
			Опыт 2	50	50 (1.8)	<0.0001
			Сумма	100	51 (1.5)	<0.0001
	aPKC_НД1+sggRB	♂	Опыт 1	1	2	–
			Опыт 2	2	2	–
			Сумма	3	2	0.0032
		♀	Опыт 1	50	4 (2.4)	<0.0001
			Опыт 2	50	3 (1.4)	<0.0001
			Сумма	100	4 (1.2)	<0.0001
	aPKC_НД2+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	34 (2.6)	<0.0001
			Опыт 2	50	18 (1.8)	<0.0001
			Сумма	100	26 (1.8)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	70 (2.6)	0.0038
			Опыт 2	50	66 (3.0)	0.0165
			Сумма	100	68 (1.9)	0.0003
	aPKC_НД2+sggRB	♂	Опыт 1	50	3 (0.2)	<0.0001
			Опыт 2	50	2 (0.1)	<0.0001
			Сумма	100	3 (0.1)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	4 (0.4)	<0.0001
			Опыт 2	50	4 (0.4)	<0.0001
			Сумма	100	4 (0.3)	<0.0001

Таблица 1. Окончание

Тип клеток (драйвер)	Линии с трансгенами	Пол	Вариант опыта	*N*	Средняя продолжительность жизни (ошибка средней), дни	Достоверность отличия от контрольного генотипа, тест Манна–Уитни*
Мотонейроны (Д2)	Контроль_aPKC+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	73 (2.5)	
			Опыт 2	50	57 (2.6)	
			Сумма	100	65 (1.9)	
		♀	Опыт 1	50	76 (2.9)	
			Опыт 2	50	85 (1.9)	
			Сумма	100	81 (1.8)	
	aPKC_НД1+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	57 (1.7)	<0.0001
			Опыт 2	50	47 (2.4)	<0.0001
			Сумма	100	52 (1.6)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	70 (2.6)	0.0331
			Опыт 2	50	77 (2.5)	0.0059
			Сумма	100	74 (1.8)	0.0005
	aPKC_НД1+sggRB	♂	Опыт 1	50	25 (1.3)	<0.0001
			Опыт 2	50	27 (1.3)	<0.0001
			Сумма	100	26 (0.9)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	60 (1.6)	0.0004
			Опыт 2	50	66 (1.9)	0.0006
			Сумма	100	63 (1.3)	<0.0001
	aPKC_НД2+контроль_sgg	♂	Опыт 1	50	54 (3.4)	<0.0001
			Опыт 2	50	35 (2.4)	<0.0001
			Сумма	100	45 (2.3)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	68 (1.9)	0.0014
			Опыт 2	50	73 (2.6)	<0.0001
			Сумма	100	70 (1.6)	<0.0001
	aPKC_НД2+sggRB	♂	Опыт 1	50	32 (2.1)	<0.0001
			Опыт 2	50	22 (1.9)	0.0006
			Сумма	100	27 (1.5)	<0.0001
		♀	Опыт 1	50	63 (1.8)	0.0388
			Опыт 2	50	66 (2.8)	0.0827
			Сумма	100	64 (1.7)	0.0093

* Продолжительность жизни сравнивали у гибридов от скрещивания между линиями-драйверами Д1 или Д2 и следующими линиями с трансгенами: контроль_aPKC+контроль_sgg и aPKC_НД1+контроль_sgg; aPKC_НД1+контроль_sgg и aPKC_НД1+sggRB; контроль_aPKC+контроль_sgg и aPKC_НД2+контроль_sgg; aPKC_НД2+контроль_sgg и aPKC_НД2+sggRB. Описание генотипов см. разделы “Материалы и методы” и “Результаты”.

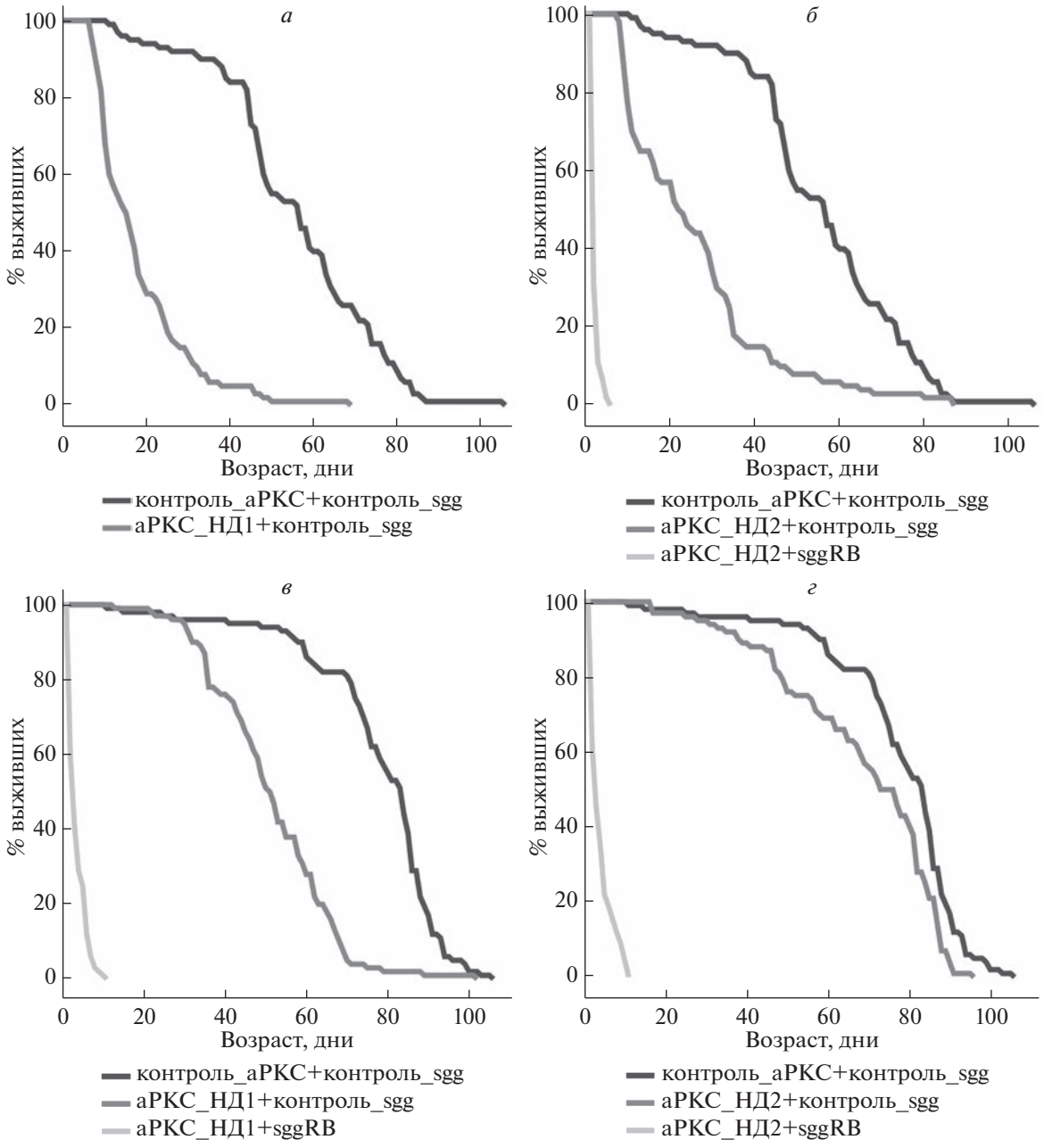


Рис. 1. Влияние нокдауна гена *aPKC*, вызванного трансгенами во всех нейронах, на продолжительность жизни самцов (*а*, *б*) и самок (*в*, *г*). Продолжительность жизни сравнивали у гибридов от скрещивания между линиями-драйверами Д1 или Д2 и линиями с трансгенами. Описание генотипов см. разделы "Материалы и методы" и "Результаты".

во всех нейронах не на продолжительность жизни, а на свойства нервной системы, поскольку ранее мы показали, что при увеличении уровня экспрессии GSK3 во всех нейронах эти признаки меняются согласованно [13].

Известно, что GSK3 и aPKC влияют на различные свойства нейронов [19, 22–24]. В частности, ранее мы показали, что увеличение уровня экспрессии GSK3 во всех нейронах приводит к достоверному уменьшению количества зон активных синаптических контактов в нейромышечных связках самок [13]. Синаптическая активность является одним из интегральных показателей работы нервной системы, а нейромышечные связки личинок дрозофилы часто используются в качестве модельной системы для изучения функции синапсов [25]. Поэтому чтобы оценить, как взаимодействуют GSK3 и aPKC в процессе контроля свойств нервной системы, мы измерили количество зон активных синаптических контактов у самок,

полученных от скрещивания между самцами линий аPKC_НД1+контроль_sgg или аPKC_НД1+sggRB и самками линии-драйвера, индуцирующего экспрессию трансгенов во всех нейронах. Как и при изучении продолжительности жизни, полученные результаты о влиянии GSK3 на активность синапсов в присутствии нокдауна гена *aPKC* были сопоставлены с ранее полученными данными о таком влиянии в отсутствие нокдауна гена *aPKC* [13].

Увеличение экспрессии гена *sgg*, кодирующего GSK3, во всех нейронах приводило к достоверному снижению количества зон активных синаптических контактов у самок, со 158 ± 4.2 до 89 ± 3.0 [13]. Количество зон активных синаптических контактов у самок с увеличенной экспрессией GSK3 во всех нейронах составило, таким образом, 58% от контрольного. Количество зон активных синаптических контактов у самок с увеличенной экспрессией GSK3 на фоне уменьшенной экспрессии аPKC во всех нейронах также снижалось со 117 ± 9 до 66 ± 11 (рис. 2) и составило 55% от контрольного. Если аPKC является ингибитором GSK3 [21], то в наших опытах у особей с увеличенной экспрессией GSK3 на фоне нокдауна гена *aPKC* должно было наблюдаться еще большее увеличение активности GSK3, а следовательно еще большее снижение активности синапсов. Однако этого не произошло, и у самок с увеличенной экспрессией GSK3 во всех нейронах активность синапсов уменьшилась одинаково в отсутствие и в присутствии нокдауна гена *aPKC*. Этот результат хорошо соответствует описанному выше характеру влияния увеличенной экспрессии GSK3 в отсутствие и в присутствии нокдауна гена *aPKC* на продолжительность жизни. Таким образом, исследование взаимодействия аPKC и GSK3 в нейронах указывает на то, что аPKC не влияет на эффекты GSK3 в отношении активности синапсов и продолжительности жизни. Полученные результаты нельзя также объяснить аддитивным действием измененной экспрессии двух протеинкиназ.

Второй подход заключался в том, что мы индуцировали экспрессию трансгенов в мотонейронах, поскольку ранее было показано, что увеличение экспрессии гена *sgg* в этих клетках снижает продолжительность жизни, но не так сильно, как увеличение экспрессии гена *sgg* во всех нейронах [13]. Оказалось, что уменьшение количества аPKC в мотонейронах снизило продолжительность жизни как самцов, так и самок, но менее значительно, чем в случае уменьшения количества аPKC во всех нейронах (на 20 и 9% в случае аPKC_НД1 и на 31 и 14% в случае аPKC_НД2; табл. 1, рис. 3). Этот эффект усилился в том случае, когда уменьшение количества аPKC в мотонейронах происходило на фоне увеличения количества GSK3 (табл. 1, рис. 3). Увеличение экспрессии GSK3 в мотонейронах само по себе также приводило к снижению средней продолжительности жизни самцов и самок [13]. Учитывая эти факты, можно заключить, что закономерности влияния нокдауна *aPKC* на продолжительность жизни в отсутствие и в присутствии изменений в уровне экспрессии GSK3 в мотонейронах и во всех нейронах совпали.

Таким образом, изменение продолжительности жизни, вызванное нарушением экспрессии исследуемых протеинкиназ и во всех нейронах, и отдельно в мотонейронах, соответствовало как гипотезе обингибирующем действии GSK3 на аPKC, так и гипотезе об их независимом, аддитивном влиянии на исследуемый признак. Влияние GSK3 на аPKC и совместное действие двух протеинкиназ на продолжительность жизни было одинаковым у самцов и самок.

Средняя продолжительность жизни самцов и самок с увеличенной экспрессией GSK3 в мотонейронах составила 65 и 75% от средней продолжительности жизни соответствующего контроля [13]; средняя же продолжительность жизни самцов и самок с увеличенной экспрессией GSK3 на фоне уменьшенной экспрессии аPKC в мотонейронах составила 55 и 88% от средней продолжительности жизни соответствующего контроля. Таким образом, увеличение экспрессии GSK3 на фоне нокдауна гена *aPKC* в мотонейронах самцов привело к усилению отрицательного влияния на продолжительность жизни. Этот результат соответствует как гипотезе о том, что аPKC является ингибитором GSK3, так и гипотезе об аддитивности эффектов двух протеинкиназ. У самок со сниженной экспрессией аPKC в мотонейронах наблюдалось определенное смягчение отрицательного влияния увеличенной экспрессии GSK3 на продолжительность жизни. Такой результат невозможно объяснить независимым, аддитивным действием двух исследуемых протеинкиназ. Следовательно, можно говорить о том, что влияние уровня экспрессии GSK3 в мотонейронах на продолжительность жизни самок зависит от аPKC. Однако такой результат предполагает существование какого-то сложного, возможно непрямого взаимодействия между двумя белками.

Обобщая полученные результаты, можно сказать, что изменение продолжительности жизни, вызванное нарушением экспрессии исследуемых протеинкиназ во всех нейронах самцов и самок и отдельно в мотонейронах самцов, с наибольшей вероятностью соответствовало гипотезе об ингибирующем действии GSK3 на аPKC и отсутствии влияния аPKC на GSK3. В то же время характер изменения продолжительности жизни, возникающего в результате измененной экспрессии аPKC и GSK3 в мотонейронах самок, предполагает существование пока неизвестных механизмов взаимодействия между исследуемыми протеинкиназами.

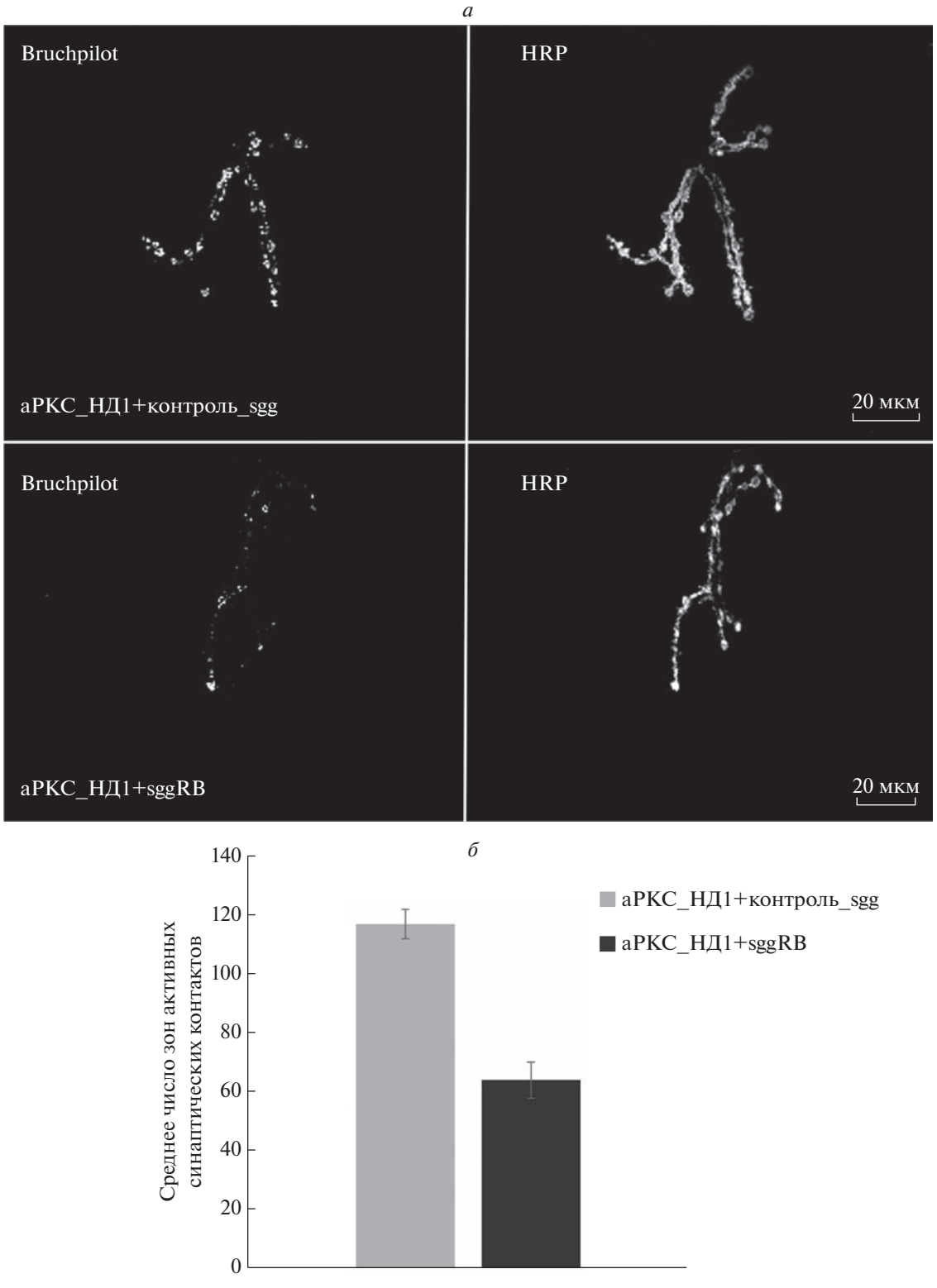


Рис. 2. Влияние нокдауна гена *aPKC* во всех нейронах на активность синапсов у самок. Число зон активных синаптических контактов сравнивали у гибридов от скрещивания между линией-драйвером Д1 и линиями с трансгенами. Описание генотипов см. разделы “Материалы и методы” и “Результаты”. Препарат нейромышечных связок личинок окрашивали антителами к пероксидазе хрена, маркеру пресинаптических мембран, и белку Bruchpilot, специфичному для зон активных синаптических контактов, белые точки (*а*). Достоверность отличия от контрольного генотипа, *t*-тест: $P < 0.001$ (*б*).

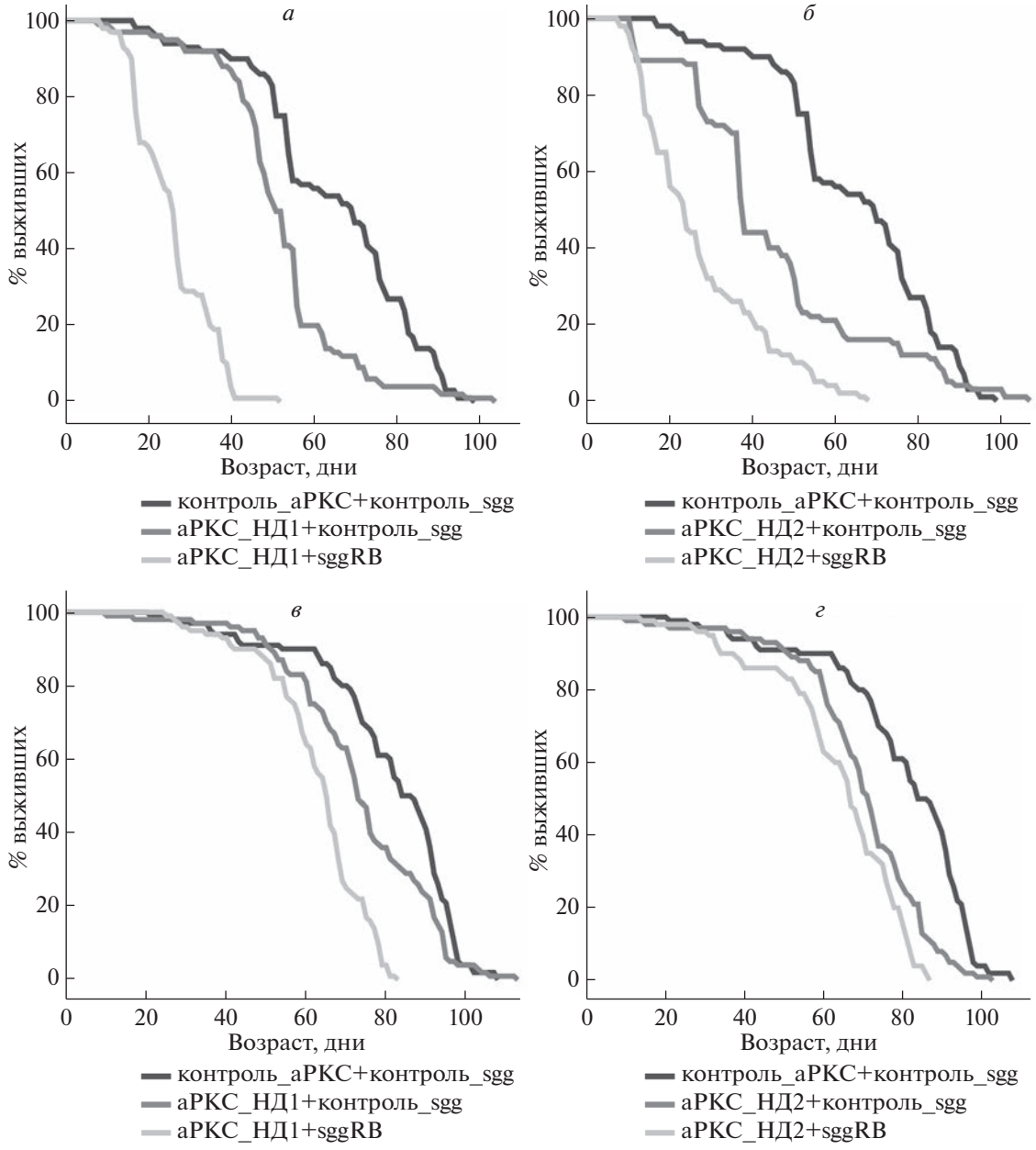


Рис. 3. Влияние нокдауна гена *aPKC* в мотонейронах на продолжительность жизни самцов (*а*, *б*) и самок (*в*, *г*). Продолжительность жизни сравнивали у гибридов от скрещивания между линиями-драйверами Д1 или Д2 и линиями с трансгенами. Описание генотипов см. разделы “Материалы и методы” и “Результаты”.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ранее проведенных пилотных экспериментах мы показали, что снижение уровня экспрессии гена *aPKC* в мотонейронах приводит к уменьшению продолжительности жизни самцов [14]. В настоящей статье представлены результаты более детального изучения роли нейрональной экспрессии *aPKC* в контроле продолжительности жизни, которые подтвердили и существенно расширили имевшиеся данные. Как и ожидалось, уменьшение экспрессии *aPKC* во всех нейронах оказало большее влияние на продолжительность жизни, чем уменьшение экспрессии протеинкиназы в мотонейронах. И в том, и в другом случае степень уменьшения продолжительности жизни зависела от пола – у самцов эффект был более сильным, чем у самок. Зависимость эффекта от пола не раз была отмечена в наших работах, в том числе при изменении уровня экспрессии GSK3 [13, 14], и в

работах других ученых [26], однако причины такого диморфизма пока остаются неясными.

В настоящей работе были использованы две разные линии дрозофилы, вызывающие нокдаун гена *aPKC* в результате РНК-интерференции. На качественном уровне влияние нокдауна *aPKC*, вызванного трансгенами, находящимися в разных линиях, на продолжительность жизни оказалось одинаковым. Это важно, поскольку сделанные в работе выводы основаны на двух независимых вариантах опытов. Однако на количественном уровне эффекты двух разных трансгенов различались. Такие отличия могут быть связаны с тем, что трансгены влияют на разные транскрипты гена *aPKC*: аРКС_НД1 – на все 12 аннотированных транскриптов (https://flybase.org/reports/FBal0323907.html), а аРКС_НД2 – только на транскрипты RG и RJ (https://flybase.org/reports/FBal0278807.html). Эта характеристика трансгенов хорошо соответствует тому факту, что индукция аРКС_НД1 во всех нейронах снизила продолжительность жизни сильнее, чем индукция аРКС_НД2. Однако индукция аРКС_НД1 в мотонейронах вызвала меньший эффект, чем индукция аРКС_НД2. Этот факт можно объяснить, если предположить, что в мотонейронах наиболее важна экспрессия именно RG и/или RJ, а аРКС_НД2 нарушает ее сильнее, чем аРКС_НД1, поскольку малые интерферирующие РНК в первом случае расходуются только на эти два транскрипта, а во втором – на все 12. Конечно, это объяснение является механистическим и нуждается в экспериментальной проверке. В целом о функциях разных транскриптов гена *aPKC* у дрозофилы практически ничего не известно, и для выяснения роли каждого из них нужны дальнейшие исследования.

Наиболее интересным нам представлялся вопрос о том, взаимодействуют ли между собой гены/белки *aPKC*/аРКС и *sgg*/GSK3 в ходе контроля продолжительности жизни. Роль *sgg*/GSK3 в контроле продолжительности жизни была подробно исследована нами ранее [12–14]. Взаимодействие между аРКС и GSK3 также было экспериментально продемонстрировано в ряде работ. Так, было убедительно показано, что у дрозофилы GSK3 способна фосфорилировать аРКС, что может приводить к ее протеасомной деградации и, таким образом, ингибированию в ходе асимметричного деления эмбриональных нейробластов [9] и клеток эмбрионального эпителия [27]. Мы предположили, что такое же взаимодействие между двумя протеинкиназами может играть роль и в контроле продолжительности жизни, участие в котором каждой из них мы уже показали. Действительно, генетические эксперименты, описанные в настоящей статье, указывают на ингибирующее действие GSK3 на аРКС и в этом случае. В ходе контроля асимметричного деления клеток и клеточной полярности GSK3 взаимодействует с аРКС, находящейся в комплексе Par6–Baz–аРКС. Связано ли совместное влияние GSK3 и аРКС на продолжительность жизни с этим комплексом остается пока неясным.

В ряде опубликованных работ можно найти указания на то, что аРКС, в свою очередь, также способна фосфорилировать аминокислотные остатки, определяющие уровень активности GSK3, и таким образом ингибировать ее [21]. Кроме того, оказалось, что комплекс Par6–аРКС регулирует гибель и/или пролиферацию клеток: нарушение экспрессии Par6 подавляет аРКС и повышает активность ее мишени, GSK3, приводя к усилению апоптоза [28]. Наши генетические эксперименты, однако, не выявили ингибирующего действия аРКС на GSK3 в ходе контроля продолжительности жизни. Возможно, участие аРКС и GSK3 в контроле продолжительности жизни не связано с их взаимодействием с Par6–аРКС-комплексом. Стоит отметить также, что наши эксперименты позволяют оценить взаимодействие аРКС и GSK3 не в норме, а в условиях подавления/усиления экспрессии кодирующих их генов. Нельзя исключить, что в этом случае характер взаимодействия двух белков может отличаться от нормального. Правда, и в упомянутых выше работах других авторов взаимодействие белков было проанализировано у особей с измененным уровнем их экспрессии.

Мы показали, что уменьшение уровня экспрессии аРКС в нервной системе приводит к уменьшению продолжительности жизни, но пока неясно, каким может быть эффект увеличения уровня экспрессии аРКС. Известны гены (например, кодирующие белки, участвующие в детоксификации активных форм кислорода), увеличение экспрессии которых приводит к увеличению продолжительности жизни (https://genomics.senescence.info/genes/index.html). Кажется наиболее вероятным, однако, что любое сильное нарушение экспрессии генов, кодирующих такие многофункциональные белки как аРКС и GSK3, должно приводить к многочисленным сбоям в работе клеток и уменьшению продолжительности жизни. В то же время можно ожидать, что небольшие изменения экспрессии этих генов могут быть связаны с тонкой перенастройкой работы клеток и увеличением продолжительности жизни, Так, ранее мы показали, что небольшое снижение активности GSK3 в дофаминэргических нейронах связано с увеличением продолжительности жизни самок [14]. Можно предположить, что увеличение уровня экспрессии аРКС в дофаминэргических

нейронах самок приведет к частичному ингибированию активности GSK3 и вследствие этого к увеличению продолжительности жизни. Экспериментальная проверка этого предположения позволит лучше понять, влияет ли aPKC на GSK3 в процессе контроля продолжительности жизни.

Регуляция механизмов клеточной полярности является одним из наиболее охарактеризованных процессов, в которых взаимодействуют GSK3 и aPKC, в том числе фосфорилируя общие мишени, такие как белок Par-1. На локализацию белка Par-1, вовлеченного в определение полярности клеточных компонентов Baz и Par-6 в эпителиальных клетках и ооцитах плодовой мушки, влияет фосфорилирование протеинкиназой aPKC [29]; одновременно с этим Par-1 является непосредственной мишенью фосфорилирования GSK3 [30]. Par-1 претендует на роль связующего звена между GSK3 и aPKC и в других молекулярных процессах, таких как Wnt-каскад [31]. В процессе регуляции работы ассоциированных с микротрубочками белков (MAP) одной из мишеней фосфорилирования киназами Par-1 и GSK3 является белок Tau [32, 33]. Стоит отметить, что белок Tau является одной из перспективных мишеней в изучении молекулярных основ ассоциированных со старением заболеваний нервной системы.

В настоящее время сведения о взаимодействии aPKC и GSK3 носят достаточно ограниченный характер и касаются их совместной работы лишь в ходе регуляции отдельных процессов. Тем не менее даже имеющиеся факты свидетельствуют о том, что взаимодействие между aPKC и GSK3 может быть достаточно сложным и неоднозначным. Наши генетические эксперименты также свидетельствуют о том, что в мотонейронах самок, например, взаимодействие между aPKC и GSK3 может быть достаточно сложным. Исследование влияния уровня экспрессии aPKC и GSK3 в мотонейронах самок на продолжительность жизни представляется особенно интересным, поскольку ранее мы показали, что небольшое увеличение активности GSK3 в них приводит к увеличению продолжительности жизни [14]. Выяснение механизмов взаимодействия между aPKC, GSK3 и другими их партнерами позволит углубить и расширить наши представления о причинах долголетия и способах продления жизни.

Мы выражаем глубокую признательность Центру культур *Drosophila* (Блюмингтон, США, https://bdsc.indiana.edu/index.html) за многолетнее содействие нашим исследованиям. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием НИЦ “Курчатовский институт” – ИМГ.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 19-34-80042-мол_эв_а и Государственным заданием НИЦ “Курчатовский институт” – ИМГ, регистрационный № 121030200227.

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. *López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L. et al.* The hallmarks of aging // Cell. 2013. V. 153. № 6. P. 1194–1217. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039
2. *Hipp M.S., Kasturi P., Hartl F.U.* The proteostasis network and its decline in ageing // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. V. 20. № 7. P. 421–435. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y
3. *Vilchez D., Boyer L., Morantte I. et al.* Increased proteasome activity determines human embryonic stem cell identity // Nature. 2012. V. 489. № 7415. P. 304–308. https://doi.org/10.1038/nature11468
4. *Schröter F., Adjaye J.* The proteasome complex and the maintenance of pluripotency: Sustain the fate by mopping up? // Stem Cell Research & Therapy. 2014. V. 5. № 1. P. 24. https://doi.org/10.1186/scrt413
5. *Moore D., Pilz G., Araúzo-Bravo M. et al.* A mechanism for the segregation of age in mammalian neural stem cells // Science. 2015. V. 349. № 6254. P. 1334–1338. https://doi.org/10.1126/science.aac9868
6. *Loyer N., Januschke J.* Where does asymmetry come from? Illustrating principles of polarity and asymmetry establishment in *Drosophila* neuroblasts // Curr. Opinion in Cell Biology. 2020. V. 62. P. 70–77. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.018
7. *Gallaud E., Pham T., Cabernard C. Drosophila melanogaster* neuroblasts: A model for asymmetric stem cell divisions // Results Probl. Cell Differ. 2017. V. 61. P. 183–210. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53150-2_8
8. *Shao C.Y., Crary J.F., Rhao C. et al.* Atypical protein kinase C in neurodegenerative disease II: PKCiota/lambda in tauopathies and alpha-synucleinopathies // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2006. V. 65. № 4. P. 327–335. https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000218441.00040.82
9. *Colosimo P.F., Liu X., Kaplan N.A., Tolwinski N.S.* GSK3beta affects apical-basal polarity and cell-cell adhesion by regulating aPKC levels // Dev. Dyn. 2010. V. 239. № 1. P. 115–125. https://doi.org/10.1002/dvdy.21963
10. *Beurel E., Grieco S.F., Jope R.S.* Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases // Pharmacol. Ther. 2015. V. 148. P. 114–131. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016

11. *Souder D.C., Anderson R.M.* An expanding GSK3 network: Implications for aging research // Geroscience. 2019. V. 41. № 4. P. 369–382. https://doi.org/10.1007/s11357-019-00085-z

12. *Тростников М.В., Веселкина Е.Р., Кременцова А.В. и др.* Инсерционные мутации гена shaggy, кодирующего протеинкиназу GSK3, увеличивают продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2019. Т. 55. № 9. С. 1099–1104. https://doi.org/10/1134/S0016675819090170

13. *Trostnikov M.V., Roshina N.V., Boldyrev S.V. et al.* Disordered expression of shaggy, the *Drosophila* gene encoding a serine-threonine protein kinase GSK3, affects the lifespan in a transcript-, stage-, and tissue-specific manner // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 9. https://doi.org/10.3390/ijms20092200

14. *Trostnikov M.V., Veselkina E.R., Krementsova A.V. et al.* Modulated expression of the protein kinase GSK3 in motor and dopaminergic neurons increases female lifespan in *Drosophila melanogaster* // Front. Genet. 2020. V. 11. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00668

15. *Bourouis M.* Targeted increase in shaggy activity levels blocks wingless signaling // Genesis. 2002. V. 34. № 1–2. P. 99–102. https://doi.org/10.1002/gene.10114

16. *Wilmoth J.R., Horiuchi S.* Rectangularization revisited: Variability of age at death within human populations // Demography. 1999. V. 36. № 4. P. 475–495.

17. *Carey J.R.* Longevity: The Biology and Demography of Lifespan. Princeton, NT: Princeton Univ. Press, 2003.

18. *Wagh D.A., Rasse T., Asan E. et al.* Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila* // Neuron. 2006. V. 49. № 6. P. 833–844. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.008

19. *Franco B., Bogdanik L., Bobinnec Y. et al.* Shaggy, the homolog of glycogen synthase kinase 3, controls neuromuscular junction growth in *Drosophila* // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 29. P. 6573–6577. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1580-04.2004

20. *McGraw E.A., O'Neill S.L.* Wolbachia pipientis: Intracellular infection and pathogenesis in *Drosophila* // Curr. Opin. Microbiol. 2004. V. 7. № 1. P. 67–70. https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.12.003

21. *Moore S.F., van den Bosch M.T.J., Hunter R.W. et al.* Dual regulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3)α/β by protein kinase C (PKC)α and Akt promotes thrombin-mediated Integrin αIIbβ3 activation and granule secretion in platelets // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 6. P. 3918–3928. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.429936

22. *Hapak S.M., Rothlin C.V., Ghosh S.* aPKC in neuronal differentiation, maturation and function // Neuronal Signal. 2019. V. 3. № 3. P. NS20190019. https://doi.org/10.1042/NS20190019

23. *Cuesto G., Jordán-Álvarez S., Enriquez-Barreto L. et al.* GSK3β inhibition promotes synaptogenesis in *Drosophila* and mammalian neurons // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. P. e0118475. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118475

24. *Chiang A., Priya R., Ramaswami M. et al.* Neuronal activity and Wnt signaling act through Gsk3-beta to regulate axonal integrity in mature *Drosophila* olfactory sensory neurons // Development. 2009. V. 136. № 8. P. 1273–1282. https://doi.org/10.1242/dev.031377

25. *Ruiz-Cañada C., Budnik V.* Introduction on the use of the *Drosophila* embryonic/larval neuromuscular junction as a model system to study synapse development and function, and a brief summary of pathfinding and target recognition // Int. Rev. Neurobiol. 2006. V. 75. P. 1–31. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)75001-2

26. *Tower J.* Sex-specific gene expression and lifespan regulation // Trends Endocrinol. Metab. 2017. V. 28. № 10. P. 735–747. https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.07.002

27. *Kaplan N.A., Colosimo P.F., Liu X., Tolwinski N.S.* Complex interactions between GSK3 and aPKC in *Drosophila* embryonic epithelial morphogenesis // PLoS One. 2011. V. 6. № 4. P. e18616. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018616

28. *Kim M., Datta A., Brakeman P. et al.* Polarity proteins PAR6 and aPKC regulate cell death through GSK-3β in 3D epithelial morphogenesis // J. Cell Sci. 2007. V. 120. № 14. P. 2309–2317. https://doi.org/10.1242/jcs.007443

29. *Jiang H., McKinley R.F.A., McGill M.A. et al.* Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: Critical roles of GSK-3β and its upstream regulators // Cell. 2005. V. 120. № 1. P. 123–135. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.033

30. *Kosuga S., Tashiro E., Kajioka T. et al.* GSK-3beta directly phosphorylates and activates MARK2/PAR-1 // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 52. P. 42715–42722. https://doi.org/10.1074/jbc.M507941200

31. *Sun T.Q., Lu B., Feng J.J. et al.* PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling // Nat. Cell Biol. 2001. V. 3. № 7. P. 628–636. https://doi.org/10.1038/35083016

32. *Nance J., Zallen J.A.* Elaborating polarity: PAR proteins and the cytoskeleton // Development. 2011. V. 138. № 5. P. 799–809. https://doi.org/10.1242/dev.053538

33. *Nishimura I., Yang Y., Lu B.* PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila* // Cell. Elsevier. 2004. V. 116. № 5. P. 671–682. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00170-9

The Effect of the *aPKC* Gene Encoding Atypical Protein Kinase C on the Lifespan of *Drosophila melanogaster* Depends on the Expression Level of Protein Kinase GSK3

M. V. Trostnikov[a, *], E. R. Veselkina[a], Y. A. Andreev[a], A. Y. Khryachkova[a], N. V. Roshina[a, b], and E. G. Pasyukova[a]

[a] *Institute of Molecular Genetics of the National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia*
[b] *Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
**e-mail: mikhail.trostnikov@gmail.com*

Drosophila melanogaster *shaggy* and *aPKC* genes encode highly conserved GSK3 (Glycogen Syntase Kinase 3) and aPKC (Protein Kinase C) proteinkinases that play key roles in many cellular processes. We previously demonstrated that changes in *shaggy* expression in neurons affect lifespan. In this article we show that changing the expression of the *aPKC* gene in neurons also affects lifespan. Changing the expression of the two protein kinases in all male or female neurons and in male motoneurons led to changes in lifespan, indicating that aPKC has no effect on GSK3 and GSK3 has a possible inhibitory effect on aPKC. At the same time, changes in the expression of two protein kinases in female motoneurons led to changes in lifespan, indicating the existence of a still unclear mechanism of interaction between these proteins. The elucidation of the mechanisms of interaction between aPKC, GSK3 and their other partners will deepen and expand our understanding of the causes of longevity and the ways to extend life.

Keywords: lifespan, nervous system, protein kinase aPKC, protein kinase GSK3, *Drosophila melanogaster.*

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 39–49

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 577.212.3:575.113.12

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *Myb114* У КУЛЬТУР ВИДА КАПУСТА ОГОРОДНАЯ (*Brassica oleracea* L.) В СВЯЗИ С РЕГУЛЯЦИЕЙ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ НА ОСНОВЕ СРАВНЕНИЯ С MYB-ФАКТОРАМИ ОВОЩНЫХ ПАСЛЕНОВЫХ КУЛЬТУР

© 2023 г. Д. А. Фатеев[1, *], Ф. А. Беренсен[1], А. М. Артемьева[1], О. Г. Бабак[2], К. К. Яцевич[2], Е. В. Дрозд[2], А. В. Кильчевский[2]

[1]Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, 190000 Россия

[2]Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

**e-mail: fateevdm1@gmail.com*

Поступила в редакцию 09.02.2022 г.
После доработки 14.03.2022 г.
Принята к публикации 05.04.2022 г.

С целью изучения механизма регуляции одного из древнейших у растений процессов биосинтеза антоцианов, на основе сравнения генов R2R3-MYB транскрипционных факторов (ТФ) у пасленовых (*S. lycopersicum*: *An1*, *An2*; *S. melongena*: *Myb1*; *C. annuum*: *Myb113-like1* и *Myb113-like2*) и капустных культур выполнен поиск ортологичных последовательностей у *Brassica oleracea*. Выявлена наиболее близкая по нуклеотидной структуре к ранее изученным генам у пасленовых последовательность, кодирующая MYB114 ТФ. Подобраны праймеры и выполнен сравнительный анализ последовательностей гена *Myb114* у овощных культур *B. oleracea* (разновидности капуста белокочанная, краснокочанная, листовая, цветная, брокколи, кольраби) с широким внутривидовым разнообразием по накоплению антоцианов в листьях и различных продуктовых органах – кочанах, головках (соцветиях) и стеблеплодах. По результатам выравнивания последовательностей *Myb114* выявлен ряд однонуклеотидных замен, тесно коррелирующих с высоким накоплением антоцианов в листьях *B. oleracea,* включающих 3 SNP в экзонных областях и делецию в первом интроне размером 271 пн. Выявленные SNP ведут к замене двух аминокислот, расположенных в области ДНК-связывающих доменов, что приводит к изменению эффективности связывания данного транскрипционного фактора с промоторами структурных генов биосинтеза и снижению уровня их экспрессии у форм без антоциана в листьях по сравнению с формами с его накоплением в вегетативных частях растений. Предложен молекулярный маркер MYB114.2, который может быть использован для идентификации кочанных и листовых капуст с высоким/низким накоплением антоцианов. По аминокислотной структуре и фенотипическому проявлению (регуляция накопления антоцианов в листьях) *Myb114 B. oleracea* наиболее близок к аллелям *Ant2* томата, *Myb2* баклажана и *Myb113-like2* перца. Установлена высокая степень консерватизма SANT ДНК-связывающих доменов ТФ MYB114 *B. oleracea* и R2R3-MYB транскрипционных факторов овощных пасленовых культур.

Ключевые слова: разновидности капусты *Brassica oleracea*, род *Solanum*, биосинтез антоцианов, R2R3-MYB транскрипционные факторы, домены ТФ, секвенирование, ДНК-маркеры.

DOI: 10.31857/S0016675823010046, **EDN:** CLOYTD

Антоцианы представляют собой водорастворимые пигменты, синтезируемые в ходе фенилпропаноидного пути, участвующего во вторичном метаболизме растений; антоцианы придают растениям яркую окраску, защищают их от биотических и абиотических стрессов [1, 2]. Как составной элемент продуктов питания антоцианы необходимы для повседневного потребления населением, так как они обладают антиоксидантной активностью, бактерицидным действием, улучшают строение волокон и клеток соединительной ткани, препятствуют повреждению мембран клеток [3, 4].

Механизм биосинтеза и регуляции антоцианов хорошо изучен на модельных растениях, таких как арабидопсис, кукуруза, пшеница, пасленовые [5–7], а также на плодовых яблоне, груше, клубнике и персике [8]. В исследованиях генетических и молекулярных механизмов биосинтеза антоцианов в растениях показано, что данный процесс состоит из трех основных этапов [8].

Первый – метаболизм фенилпропаноидов – предшественников флавоноидов, включая фенилаланинаммиаклиазу (PAL), циннамат-4-гидроксилазу (C4H) и 4-кумарат. Второй, ранний этап включает образование халконсинтазы (CHS), халконизомеразы (CHI), флаванон-3-гидроксилазы (F3H), флаванон-3'-гидроксилазы (F3'H) и флавонолсинтазы (FLS), которые являются предшественниками флавонолов и антоцианов [9]. Третий, поздний этап биосинтеза приводит к синтезу и модификации антоцианов посредством процессинга дигидрофлавонол-4-редуктазы (DFR), антоцианидинсинтазы (ANS), УДФ-глюкозилтрансферазы (UGT) и ацилтрансферазы (AT) [5]. Конкуренция флавонолсинтазы и дигидрофлавонол-4-редуктазы приводит к образованию либо флавонолов, либо антоцианов [2].

Функциональные факторы транскрипции R2R3-MYB (такие как MYB11, MYB12 и MYB111) обычно участвуют в прямой активации генов раннего биосинтеза CHS, CHI, F3H, F3'H и FLS. Поздние гены биосинтеза DFR, ANS, UGTs и ATs активируются тройным комплексом MYB–bHLH–WD40 (MBW), который образован фактором R2R3-MYB, под контролем регуляторного комплекса, называемого MyB–bHLH–WD40 (MBW) [10]. Эти регуляторы или комплексы способны связываться с промоторами генов биосинтеза антоцианов и активировать их экспрессию; регуляторная сеть биосинтеза флавоноидов обычно функционирует как механизм положительной обратной связи с участием и взаимодействием как положительных, так и отрицательных регуляторов, управляя накоплением и восстановлением антоцианина или проантоцианидина [11]. У арабидопсиса в формировании комплекса MBW в основном участвуют следующие позитивные регуляторы: R2R3-MYB AtPAP1, AtPAP2, AtMYB113, AtMYB114 и AtTT2; bHLH AtTT8, AtEGL3 и AtGL3 [10]; комплекс MBW, образованный *AtTT2*, *AtTT8* и *AtTTG1*, стимулирует выработку проантоцианидина в семенах арабидопсиса [12].

У пасленовых механизм биосинтеза и деградации антоцианов изучен достаточно хорошо. При этом исследований по полиморфизму аллелей, кодирующих транскрипционные факторы, очень мало.

Сравнительный анализ ряда последовательностей генов R2R3-MYB ТФ у пасленовых [13] позволил выявить наиболее близкие к *Ant1 Solanum lycopersicum* по нуклеотидному составу последовательности *Myb113-like1* и *Myb113-like2* у *Capsicum annuum*, а также *Myb1* у *Solanum melongena*. Были установлены SNP данных генов, приводящие к изменению структуры кодируемого белка и нарушению процесса биосинтеза антоцианов в плодах и вегетативных органах. Так, выявлена однонуклеотидная делеция в третьем экзоне фактора *Myb113-like1,* приводящая к сдвигу рамки считывания с появлением стоп-кодона и синтезу усеченного белка. В гене *Myb1* найдены делеция в 26 пн, вызывающая выпадение экзона 2 из зрелой мРНК при ее сплайсинге и сдвиг рамки считывания с образованием стоп-кодона, как следствие–синтез нефункционального белка, а также делеция размером 6 пн, приводящая к выпадению двух аминокислот в белке (сокращению области первого ДНК-связывающего домена SANT). Наряду с мутациями, вызывающими структурные изменения белков, показана связь с отдельными SNP в гене *Myb113-like2*.

Исследования антоцианов у представителей рода *Brassica* L. в основном были сосредоточены на идентификации компонентов, картировании и оценке уровня экспрессии генов биосинтеза антоцианов. Картирование показало, что антоциановая окраска является доминирующим признаком; однако локусы различаются у видов и разновидностей *Brassica*. У фиолетовой цветной капусты *B. oleracea* L. var. *botrytis* окраска контролируется *BoMYB2* [14]; у краснокочанной капусты *B. oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* – *BoMYB2* или *BoMYBL2.1* [15, 16]; у кольраби *B. oleracea* L. var. *gongylodes* – *BoPAP2* и *BoTT8* [17]; у пурпурной капусты цикайтай *B. rapa* L. ssp. *chinensis* var. *purpurea* – *BrbHLH49*, *BrEGL3.2* и *BrMYBL2.1* [18]; у китайской капусты пак-чой *B. rapa* L. ssp. *chinensis* – *BrMYB73* [19]; у фиолетовой горчицы сарептской *B. juncea* – *BjP11* [18]; у горчицы пурпурной опухолевидной *B. juncea* var. *tumida* Tsen et Lee – *BjTT8* [20, 21].

Цель настоящей работы – изучить полиморфизм гена *Myb114* у разновидностей капусты огородной (*B. oleracea*) с различным накоплением антоцианов в продуктовых органах для расширения понимания теоретической основы регуляции процесса биосинтеза антоцианов у капустных культур, а также для разработки молекулярных маркеров, связанных с нарушением/активацией синтеза антоцианов с целью использования в селекции форм с различным содержанием антоцианов; установить степень консерватизма механизма регуляции биосинтеза антоцианов путем сравнения генетических и белковых последовательностей, структуры ДНК-связывающих доменов у двух отдаленных семейств – пасленовые и капустные для получения нового представления о механизме биосинтеза антоцианов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили образцы *B. oleracea* из коллекции ФГБНУ ФИЦ Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Выборка включала три образца белокочанной капусты: СГВ 0417 F_1 (вр.к-2276, Швейцария), Сахарная гора F_1 (вр.к-

Таблица 1. Праймеры, разработанные для секвенирования гена *Myb114*

Праймер	Нуклеотидная последовательность	*t* отжига, °C	ПЦР-продукт, пн	Примечание
BrMYB114.1F	TCAAGGGAGACCAAGAACC	53.7	679	Часть экзона 1
BrMYB114.1R	CATCGCCTCAAGAGACTATC	56.0		
BrMYB114.2F	TCACTGCCTATGTCCCTCAC	56.6	995	Часть экзона 1, интрон 1, часть экзона 2
BrMYB114.2R	GCCATCTTAGTCTACAACTCTTCC	57.8		
BrMYB114.3F	AGGTGTAGGAAGAGTTGTAG	51.3	483	Часть экзона 2, интрон 2, часть экзона 3
BrMYB114.3R	TGTTGTTGAGTCCAAGGC	52.1		
BrMYB114.4F	ACATTCTCTTCTACCACACC	52.2	649	Часть экзона 3
BrMYB114.4R	AAACAGACGCTCTCACC	53.1		

2287, Россия), Derbent F_1 (вр.к-2316, Франция), пять образцов краснокочанной капусты: Михневская (к-175, Россия), Pecky F_1 (вр.к-198, Швейцария), Pretino F_1 (вр.к-200, Япония), Mohrenkopf (вр.к-201, Турция), Прометей F_1 (вр.к-202, Россия), два образца листовой капусты: Di Wang (вр.к-265, Китай) с антоциановой окраской верхушечных листьев, Berza alta (вр.к-300, Испания) с зелеными листьями, два образца цветной капусты: Барбара F_1 (вр.к-1021, Россия) с белой головкой, Graffiti (к-974, Нидерланды) с ярко-фиолетовой головкой, два образца брокколи: Summer Purple (вр.к-358, Швеция) со светло-фиолетовыми головками и Kuba F_1 (вр.к-364, Франция) с зеленой головкой, два образца кольраби: China KRNR1 (к-286, Нидерланды) с бледно-зеленым стеблеплодом и Szentesi folias kek (к-284, Венгрия) с фиолетовым стеблеплодом. Изучаемые образцы характеризовались широким фенотипическим полиморфизмом по признаку накопления антоцианов в листьях и продуктовых органах.

Биохимический анализ осуществляли в отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР. Антоцианы извлечены экстракцией раствором 1%-ной соляной кислоты с последующим спектрофотометрированием при длине волны 510 нм, в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид (453 нм). Для внесения поправки на содержание зеленых пигментов одновременно определяли оптическую плотность полученных экстрактов при 657 нм. Абсорбция была измерена на спектрофотометре Ultrospec II.

Выделение ДНК проводили при помощи набора Сорб-ГМО-Б (Синтол) из молодых листьев растений согласно рекомендациям производителя (для выделения ДНК используются кремниевый сорбент и ионный детергент CTAB). Количество ДНК в образце определяли на спектрофотометре SmartSpecplus (Bio-Rad). Нуклеотидные последовательности аллелей гена *Myb114* определяли путем секвенирования, выполненного в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси. Для этого фрагменты амплификации, полученные на геномной ДНК с подобранными нами геноспецифическими праймерами (табл. 1), разделяли в 1.0%-ном агарозном геле, затем вырезали и очищали с использованием набора DNA ExtractionKit (Thermo Scientific) согласно методике производителя. Секвенирующие реакции выполняли с применением набора BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно методике производителя. Продукты секвенирующей реакции очищали спиртовым осаждением и растворяли в 20 мкл формамида, денатурировали нагреванием до 95°C в течение 2 мин и далее проводили капиллярный электрофорез с использованием ДНК-секвенатора ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Компьютерную обработку данных, полученных в результате секвенирования, проводили с использованием программы Sequencing Analysis Software v 5.2 (Applied Biosystems). На основе выявленного полиморфизма были подобраны праймеры (табл. 2) и на их основе проведено ДНК-типирование коллекции образцов. ПЦР-реакцию проводили в термоциклере Biometra TProfessional Basic (Германия). Реакционная ПЦР-смесь объемом 15 мкл содержала 60–100 нг геномной ДНК; 2.5 мМ dNTP Mix (Thermo Scientific); 1.4 единицы Tornado DNA-полимеразы в инкубационном буфере “F” (Праймтех, Беларусь) и 0.25 пмоль/мл олигонуклеотидных праймеров (Евроген, Россия). Праймеры были разработаны с использованием программы DNAMAN (10.0; Lynnon BioSoft) и синтезированы компанией “Евроген” (Россия). Режим ПЦР был следующим: 95°C – 15 мин, затем следовало 35 циклов, состоящих из инкубаций: 99°C – 1 с, 52–58°C – 30 с и 72°C – 1 мин. Реакцию завершали при 72°C в течение 7 мин. Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия и документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000 (США). Размеры амплифицированных фрагментов определяли при использовании в

Таблица 2. Идентичность генов MYB-транскрипционных факторов представителей семейств Solanaceae и *Myb114* Brassicaceae по результатам BLAST-анализа

Ген *Myb114 [Brassica oleracea (wild cabbage)]* – GenBank: XM_013771565		
Описание видовой принадлежности гена	Область перекрытия, %	Идентичность, %
Solanum melongena Myb1, mRNA, complete cds	29	77.66
Solanum melongena cultivar Zi Chang anthocyanin R2R3-MYB transcription factor (MYB2), mRNA, complete cds	29	77.32
PREDICTED: *Capsicum annuum* transcription factor MYB113-like (LOC107844901), mRNA; *Myb113-like1*	31	75.57
Capsicum annuum transcription factor MYB113-like (LOC107844888), mRNA; *Myb113-like2*	30	75.00
Solanum lycopersicum cultivar Ailsa Craig anthocyanin 1 (ANT1), mRNA, complete cds	30	81.35
Solanum lycopersicum cultivar Purple Smudge MYB transcription factor AN2 (An2) gene, partial cds	19	75.59

качестве маркера молекулярной массы 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific).

Выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MEGA4 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis [22], VectorNTI и Unipro UGENE [23]. Для анализа ассоциаций между однонуклеотидными заменами и содержанием антоцианов использовали программное обеспечение TASSEL 5.0 [24] на основе модели GLM.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведена работа по поиску ортологов у капустных культур к генам, кодирующим R2R3-MYB ТФ у пасленовых культур. С помощью программы Blast выполнены поиск и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ранее изученных генов Myb-факторов семейства Solanaceae: *S. lycopersicum* (MYB R2R3 ТФ: *An1*, *An2*), *S. melongena* (MYB R2R3mel ТФ: *Myb1*, *Myb2*), *C. annuum* (MYB R2R3caps ТФ: *Myb113-like1*, *Myb113-like2*) с последовательностями базы данных NCBI у *Brassica*. В результате был найден ген *Myb114* транскрипционного фактора MYB114 (XM_013771565), показывающий максимальную идентичность в области перекрытия у *B. oleracea* (табл. 2).

К данной последовательности были подобраны праймеры, полностью перекрывающие область экзонов 1–3 (табл. 1). С их помощью методом ПЦР на геномной ДНК у коллекционных образцов капусты с контрастной антоциановой окраской (см. раздел “Материалы и методы”) были получены ампликоны, которые затем секвенированы.

В результате сиквенса ампликонов были получены полные последовательности гена *Myb114* у образцов *B. oleracea*, различающихся окраской продуктовых органов.

Путем выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей образцов *B. oleracea* с контрастным накоплением антоцианов относительно последовательности LOC106333082 выявлены следующие однонуклеотидные замены: SNP в первом экзоне, 2 SNP во втором экзоне и 2 SNP в третьем экзоне аллеля *Myb114* у сортов белокочанной капусты (рис. 1).

Наряду с SNP в экзонных областях выявлено множество однонуклеотидных замен в интронах и делеция размером в 271 пн в первом интроне у образцов белокочанной и зеленой листовой капусты. Образцы листовой капусты имели несколько уникальных однонуклеотидных замен, которые не встречались у кочанной капусты, хотя паттерн остальных однонуклеотидных замен был схож с таковым у кочанных форм. Так, образец листовой декоративной капусты Di Wang, отличающийся накоплением антоцианов в верхушечных листьях, имел нуклеотидную последовательность, схожую с краснокочанными образцами.

Аллели гена *Myb114* у изученных образцов имели разный размер (1502 пн у белокочанной, 1773 пн у краснокочанной) и содержали три экзона. По размерам экзонов аллели были идентичны, но существенно различались по размеру первого интрона.

На рис. 2 представлены результаты электрофоретической разгонки ПЦР-продукта с парой праймеров BrMYB114.2.

Оценка связи проявления признака “накопление антоцианов в продуктовых органах” с выявленными однонуклеотидными заменами аллелей гена *Myb114,* для которого были использованы данные о содержании антоцианов у 10 образцов

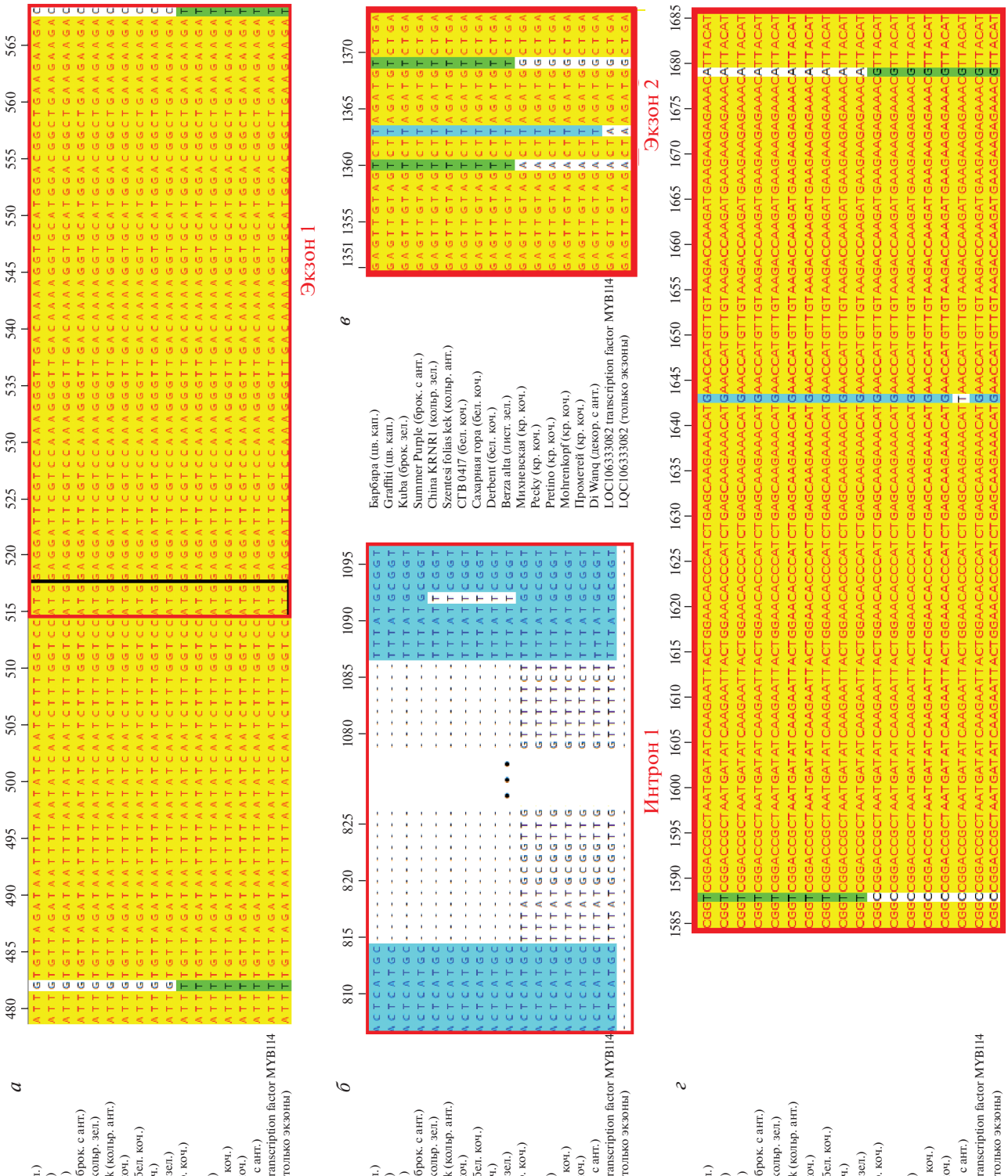


Рис. 1. Полиморфизм аллелей гена *Myb114 B. oleracea* у форм с различным накоплением антоцианов: *а* – в первом экзоне, *б* – в первом интроне, *в* – во втором экзоне, *г* – в третьем экзоне.

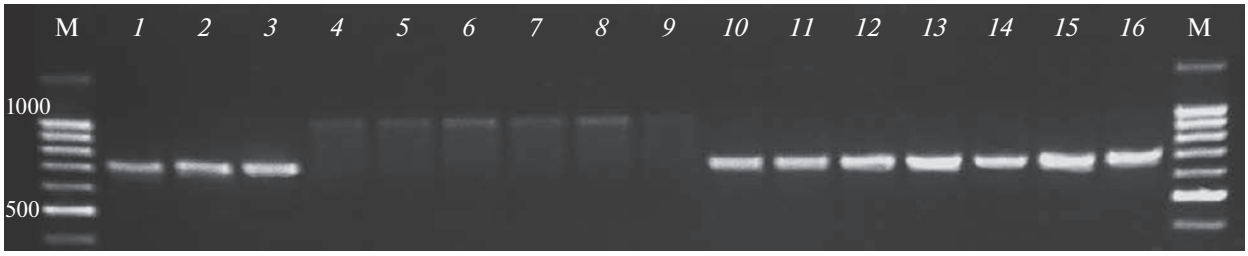


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК образцов *B. oleracea* с праймерами BrMYB1.2. M – маркер молекулярной массы; *1* – СГВ 0417 F_1, *2* – Сахарная гора F_1, *3* – Derbent F_1, *4* – Михневская, *5* – Pecky F_1, *6* – Pretino F_1, *7* – Mohrenkopf, *8* – Прометей F_1, *9* – Di Wang, *10* – Berza alta, *11* – Барбара F_1, *12* – Graffiti, *13* – Summer Purple, *14* – Kuba F_1, *15* – China KRNR1, *16* – Szentesi folias kek.

белокочанной, краснокочанной и листовой капусты (табл. 3), выявила высокую степень сопряженности с пятью однонуклеотидными заменами в первом, втором и третьем экзонах и делецией в первом интроне (*P*-value 0.0001, R^2 0.65). При этом при оценке изучаемой связи только у образцов листовой и кочанной капусты уровень значимости составил 0.001, а коэффициент детерминации 0.76. При этом SNP T → C (1-й экзон) и C → T (3-й экзон) к аминокислотной замене не ведут.

Выполнен анализ влияния генетических полиморфизмов на структуру и функции синтезируемого белка. На основании полученных нуклеотидных последовательностей с помощью программы Unipro UGENE выполнено выравнивание и сравнение аминокислотных последовательностей изученных образцов и референсных последовательностей (рис. 3). Выявлены аминокислотные замены у белокочанной капусты: R → S в позиции 50, W → C в позиции 53 и V → I в позиции 125.

Таблица 3. Содержание антоцианов в продуктовых органах разновидностей капусты огородной и их связь с выявленными полиморфизмами и делецией гена *Myb114*

Наименование образца	SNP, экзон 1	SNP, экзон 2		SNP, экзон 3		Делеция, интрон 1	Окраска листьев	Антоцианы в прод. органах, мг/100 г сухого вещества
Кочанная, листовая капуста								
СГВ 0417 F_1	C	T	T	T	A	+	Зеленая	2.16
Сахарная гора F_1	C	T	T	T	A	+	Зеленая	3.34
Derbent F_1	C	T	T	T	A	+	Зеленая	4.56
Михневская	T	A	G	C	G	–	Фиолетовая	2096.68
Pecky F_1	T	A	G	C	G	–	Фиолетовая	3349.65
Pretino F_1	T	A	G	C	G	–	Фиолетовая	1181.18
Mohrenkopf	T	A	G	C	G	–	Фиолетовая	2586.56
Прометей F_1	T	A	G	C	G	–	Фиолетовая	1768.34
Di Wang	T	A	G	C	G	–	Фиолетовая	945.73
Berza alta	C	T	T	T	A	+	Зеленая	13.37
Цветная, брокколи, кольраби								
Барбара F_1	C	T	T	T	A	+	Зеленая	7.08
Graffiti	C	T	T	T	A	+	Зеленая	126.82
Summer Purple	C	T	T	T	A	+	Зеленая	97.55
Kuba F_1	C	T	T	T	A	+	Зеленая	22.95
China KRNR1	C	T	T	T	A	+	Зеленая	9.35
Szentesi folias kek	C	T	T	T	A	+	Фиолетовая	271.78

На основании аминокислотных последовательностей MYB114 ТФ (CDSXP 013627020.1, CDSXP 013627019.1) выполнен поиск ДНК-связывающих доменов и их сравнение с доменами R2R3-MYB транскрипционных факторов, кодируемых ранее изученными генами пасленовых культур [13, 25]. Дополнительно показана структура доменов *S. melongena* с выявленными ранее нарушениями синтеза антоцианов, а также структуры транскрипционных факторов томата и баклажана группы MYB2 из базы NCBI (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Антоциановая окраска у разновидностей *B. oleracea* обычно связана с активацией генов биосинтеза антоцианов и/или их транскрипционных активаторов. Ранее было обнаружено, что фиолетовый цвет листьев у *B. oleracea* связан с увеличением экспрессии активаторов транскрипции, таких как *BoMYB2* и *BoTT8* (BobHLH) [14–16], а также *BoPAP1* и *BoPAP2* [24, 26].

Настоящее исследование показало, что накопление антоцианов в кочанной и листовой капусте также может регулироваться геном транскрипционного фактора MYB114, который на 75–81% идентичен в области перекрытия генам последовательностей R2R3-MYB ТФ у пасленовых культур [13, 25], что позволяет предположить их сходные функции.

С помощью разработанных праймеров были амплифицированы и секвенированы полные последовательности гена *Myb114* у разновидностей *B. oleracea*, различающихся окраской листьев и продуктовых органов. Был выявлен аллельный полиморфизм генов *Myb114*, который тесно коррелирует с фенотипическим проявлением антоциановой окраски листьев/кочанов (табл. 3). При этом последовательности гена *Myb114* изученных образцов с контрастной окраской других органов (генеративных головок/соцветий цветной капусты и брокколи, а также стеблеплодов кольраби) независимо от наличия или отсутствия антоцианов были идентичны последовательностям капусты белокочанной. По всей вероятности, регуляция биосинтеза антоцианов в соцветиях и стеблеплодах у разновидностей *B. oleracea* контролируется другими генами, в отличие от листьев, что согласуется с другими исследованиями. Только у образца листовой капусты Di Wang (вр. к-265) были идентифицированы SNP в экзонах и инсерции, как у краснокочанной капусты, а также несколько уникальных однонуклеотидных замен, которые не встречались у других образцов. Предположительно, этот образец декоративной капусты представляет собой гибрид листовой и краснокочанной капусты.

Ассоциативный анализ показал наибольшую степень связи пяти SNP в экзонах и делеции в первом интроне у форм (*P*-value 0.0001, R^2 0.76) с нарушением синтеза антоциана, в результате чего нами предложена пара праймеров (BrMYB114.2) для маркируемой области гена, для разделения листовых и кочанных форм капусты по накоплению антоцианов. Маркер MYB114.2 может быть использован для идентификации кочанных и листовых капуст с высоким/низким накоплением антоцианов.

Согласно выполненному анализу последовательностей ДНК-связывающих доменов в аминокислотной последовательности ранее изученных генов пасленовых показано наличие двух доменов типа SANT в ТФ MYB114 *Brassica oleracea* и R2R3-MYB ТФ овощных пасленовых, что свидетельствует об их одинаковой структуре и позволяет предполагать выполнение одинаковых функций. Идентичность первого домена у *B. oleracea* составляет 42 аминокислоты из 50 с доменами ТФ пасленовых ANT1, MYB113-like2, 41 из 50 с доменом ТФ MYB113-like1 и 40 аминокислот из 50 с ТФ MYB1 (84–80%). В структуре второго домена последовательности ТФ MYB114 (NCBICDSXP 013627020.1; XM_013771566.1) важным отличием от доменов всех пасленовых культур является его сокращение на семь аминокислот. Идентичность последовательности *B. oleracea* без аминокислотной делеции (XP_013627019.1) транскрипционным факторам пасленовых составляет 32 из 41 аминокислоты с доменом ТФ MYB113-like2 и 31 из 41 аминокислоты с доменами ТФ ANT1, MYB113-like1, MYB1. Наибольшее совпадение выявлено в структуре доменов ТФ MYB114 *B. oleracea* и ТФ MYB113-like2. Несмотря на то что по числу аминокислот оно незначительно, но эти общие аминокислоты, характерные только для двух этих последовательностей, имеют особое расположение: аминокислота аланин (A) в третьем положении первого домена и аминокислота лизин (K) – в конце второго домена. Учитывая, что ранее нами выявлены 2 SNP в структуре 3-го экзона гена *Myb113-like2*, приводящих к отсутствию синтеза антоцианов в листьях перца и в данном исследовании, установлена связь между рядом SNP в структуре гена *Myb114* и нарушением синтеза антоцианов, предполагаем, что по своим функциям эти два гена наиболее близки. Для сравнения с MYB114 ТФ были взяты дополнительно последовательности, кодируемые рядом известных генов R2R3-MYB ТФ базы данных NCBI (RF 7227477.1) *S. melongena Myb2* и *SlAn2* (FJ705320.1), *SlAn2-like* (Solyc10g086290), *Myb75* (NM_001279063.2) *S. lycopersicum*, которые оказывают преимущественное влияние на накопление антоцианов в вегетативных органах [27]. Сравнение с этими последовательностями также показывает наличие аминокислоты аланин (A) в тре-

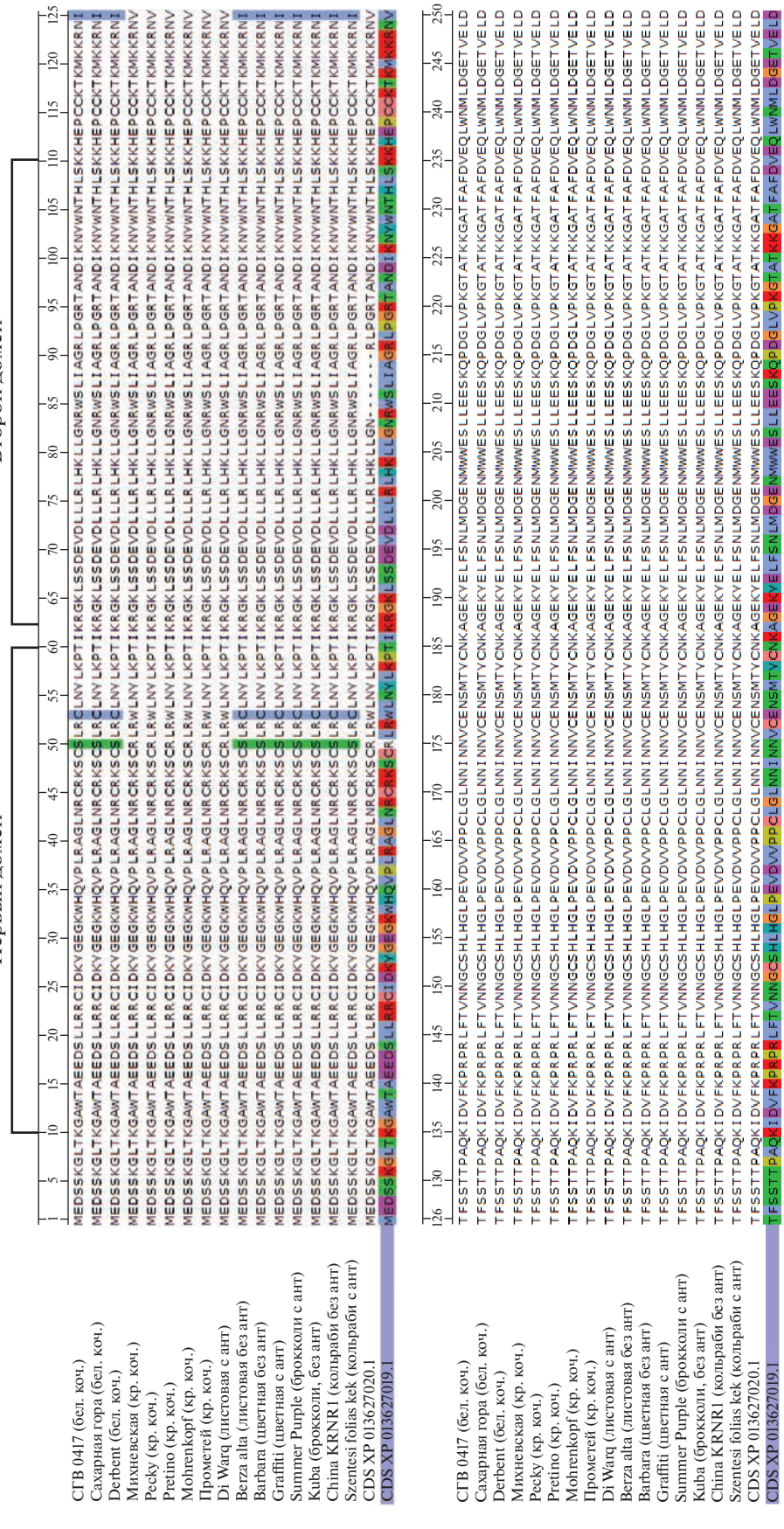


Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей изученных образцов *B. oleracea*.

тьем положении первого домена и аминокислоты лизин (K) в конце второго домена у группы MYB2 факторов, вместо серина (S) и аргинина (R) у группы MYB1 факторов соответственно, что увеличивает предположение о сходстве функций гена *Myb114* и группы генов MYB2 факторов. Аминокислотная последовательность транскрипционного фактора MYB75, который имеет схожее действие с ТФ ANT1 и AN2, имеет третью аминокислоту серин в начале первого домена, как у группы MYB1 факторов, и аминокислоту лизин в конце второго домена, как у группы MYB2 факторов. Данное сравнение структуры SANT доменов и соответствующих фенотипов растений позволяет предположить, что оба домена действуют комплексно и их структура в начале первого и в конце второго оказывает более сильное влияние на выполняемые в растении функции.

Сопоставление нуклеотидной и аминокислотной структуры с выделением областей ДНК-связывающих доменов показывает, что выделенные нами SNP в позициях 50 и 53 (рис. 3) приводят к аминокислотным заменам в конце первого домена, что свидетельствует об их наибольшей связи с регуляцией экспрессии структурных генов. Высокая связь с инсерцией в первом интроне размером в 271 пн, которая встречается у образцов кочанной и листовой капуст только у форм без антоциановой окраски, будет изучена далее. Возможно, по аналогии с последовательностями *Myb1-del26 S. melongena* (рис. 4), где крупные делеции в интронной области ведут к нарушению сплайсинга, выпадению второго экзона [13, 25], что, в свою очередь, ведет к нарушению структуры первого домена и полному выпадению второго домена, подобное происходит и с геном у *B. oleracea*. Данное предположение будет проверено путем синтеза РНК изучаемых форм и их секвенирования в дальнейших исследованиях.

Таким образом, в результате сравнения нуклеотидных последовательностей группы MYB транскрипционных факторов овощных пасленовых и капустных культур у капусты огородной *B. oleracea* выявлен ген *Myb114*, наиболее близкий по структуре генам R2R3-MYB ТФ пасленовых. Впервые выявлен аллельный полиморфизм *Myb114* у форм *B. oleracea* с широким внутривидовым разнообразием по накоплению антоцианов в листьях. Изучены особенности влияния выявленных SNP и делеции на структуру ДНК-связывающих доменов, кодируемых транскрипционных факторов, а также их связь с накоплением антоцианов в различных продуктовых органах. Предложен молекулярный маркер MYB114.2, который может быть использован для идентификации кочанных и листовых капуст с высоким/низким накоплением антоцианов. Образцы с различным сочетанием аллельного полиморфизма отобраны как модельные для дальнейшего изучения генетической ре-

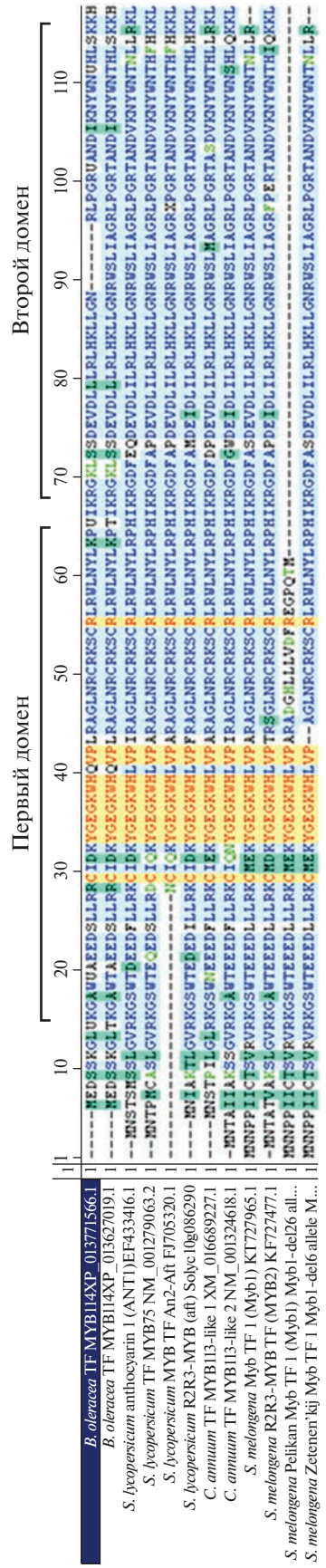


Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей доменов SANT ТФ MYB114 *B. oleracea* и R2R3-MYB ТФ овощных пасленовых культур.

гуляции накопления антоцианов в продуктовых органах и повышения эффективности создания ценных сортов и гибридов для сельского хозяйства.

Работа выполнена при поддержке гранта № 20-516-00017 Бел_а, а также гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Б20Р-285 “Изучение генетических механизмов регуляции накопления антоцианов и каротиноидов у овощных пасленовых (Solanaceae) и капустных (Brassicaceae) культур”.

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. *Zhai R., Wang Z., Yang C. et al.* PbGA2ox8 induces vascular-related anthocyanin accumulation and contributes to red stripe formation on pear fruit // Hortic Res. 2019. № 6. https://doi.org/10.1038/s41438-019-0220-9
2. *Li H., Li Y., Yu J. et al.* MdMYB8 is associated with flavonol biosynthesis via the activation of the MdFLS promoter in the fruits of Malus crabapple //Hortic. Res. 2020. № 7. https://doi.org/10.1038/s41438-020-0238-z
3. *Mazewski C., Liang K., Gonzalez de Mejia E.* Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin-rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays // Food Chem. 2018. V. 242. P. 378–388. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.086
4. *Middleton E.Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C.* The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer // Pharmacol. Rev. 2000. V. 52. P. 673–751.
5. *Albert N.W., Davies K.M., Lewis H.D. et al.* A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 962–980. https://doi.org/10.1105/tpc.113.122069
6. *Хлесткина Е.К., Шоева О.Ю., Гордеева Е.И.* Гены биосинтеза флавоноидов пшеницы // Вавилов. журн. генетики и селекции. 2017. Т. 18. № 4/1. С. 784–796.
7. *Liu Y., Tikunov Y., Schouten R.E. et al.* Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous Vegetables: a review // Frontiers in Chemistry. 2018. V. 6. P. 1–17. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00052
8. *Naing A.H., Kim C.K.* Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants // Plant Mol. Biol. 2018. V. 98. P. 1–18. https://doi.org/10.1007/s11103-018-0771-4
9. *Xie L., Li F., Zhang S. et al.* Mining for candidate genes in an introgression line by using RNA Sequencing: The anthocyanin overaccumulation phenotype in Brassica // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1245. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01245
10. *Guo N., Cheng F., Wu J. et al.* Anthocyanin biosynthetic genes in *Brassica rapa* // BMC Genomics. 2014. V. 15. P. 71–81. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-426
11. *Petroni K., Tonelli C.* Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs // Plant Sci. 2011. V. 181. P. 219–229. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.009
12. *Baudry A., Heim A.M., Dubreucq B. et al.* TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2004. V. 39(3). P. 366–380. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02138.x
13. *Babak O., Nikitinskaya T., Nekrashevich N. et al.* Identification of DNA markers of anthocyanin biosynthesis disorders based on the polymorphism of anthocyanin 1 tomato ortholog genes in pepper and eggplant // Crop. Breed. Genet. Genom. 2020. V. 2. https://doi.org/10.20900/cbgg20200011
14. *Chiu L.W., Zhou X., Burke S. et al.* The purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor // Plant Physiol. 2010. V. 154. P. 1470–1480. https://doi.org/10.1104/pp.110.164160
15. *Yuan Y.X., Chiu L.W., Li L.* Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage // Planta. 2009. V. 230. P. 1141–1153. https://doi.org/10.1007/s00425-009-1013-4
16. *Jin S.W., Rahim M.A., Kim H.T. et al.* Molecular analysis of anthocyanin-related genes in ornamental cabbage // Genome. 2018. V. 61. P. 111–120. https://doi.org/10.1139/gen-2017-0098
17. *Rahim M.A., Robin A.H.K., Natarajan S. et al.* Identification and characterization of anthocyanin biosynthesis-related genes in Kohlrabi // Appl. Biochem. Biotechnol. 2018. V. 184. P. 1120–1141. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2613-2
18. *Zhang X., Zhang K., Wu J. et al.* QTL-Seq and sequence assembly rapidly mapped the gene BrMYBL2.1 for the purple trait in *Brassica rapa* // Sci. Rep. 2020. V. 10. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58916-5
19. *Wang J., Su T.B., Yu Y.J.* Molecular characterization of BrMYB73: A candidate gene for the purple-leaf trait in *Brassica rapa* // Int. J. Agric. Biol. 2019. V. 22. P. 122–130. https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1041
20. *Zhao Z., Xiao L., Xing X. et al.* Fine mapping the BjPl1 gene for purple leaf color in B2 of *Brassica juncea* L. through comparative mapping and whole-genome resequencing // Euphytica. 2017. V. 213. P. 80–90. https://doi.org/10.1007/s10681-017-1868-6
21. *Xie Q., Hu Z., Zhang Y. et al.* Accumulation and molecular regulation of anthocyanin in purple tumorous stem mustard (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee) // J. Agric. Food Chem. 2014. V. 62. P. 7813–7821. https://doi.org/10.1021/jf501790a
22. *Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.* Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // Bioinfor-

matics. 2012. V. 28. P. 1166–1167.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091

23. *Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E. et al.* TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples // Bioinformatics. 2007. V. 23. P. 2633–2635.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308
24. *Zhang B., Hu Z., Zhang Y. et al.* A putative functional MYB transcription factor induced by low temperature regulates anthocyanin biosynthesis in purple kale (*Brassica oleracea* var. *acephala* f. tricolor) // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. P. 281–289.
https://doi.org/10.1007/s00299-011-1162-3
25. *Бабак О.Г., Некрашевич Н.А., Никитинская Т.В. и др.* Изучение полиморфизма генов Myb-факторов на основе сравнительной геномики овощных пасленовых культур (томат, перец, баклажан) для поиска ДНК-маркеров, дифференцирующих образцы по накоплению антоцианов // Докл. Национ. акад. наук Беларуси. 2019. Т. 63. № 6. С. 721–729.
https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-6-721-729
26. *Zhang Y., Hu Z., Zhu M. et al.* Anthocyanin accumulation and molecular analysis of correlated genes in purple kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.) // J. Agr. Food Chem. 2015. V. 63. P. 4160–4169.
https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00473
27. *Kiferle C., Fantini E., Bassolino L. et al.* Tomato R2R3-MYB proteins SlANT1 and SlAN2: same protein activity, different roles // PLoS One. 2015. V. 10.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136365

Study of *Myb114* Gene Polymorphism in the Cole Crops (*Brassica oleracea* L.) in Connection with Anthocyanin Biosynthesis Regulation Based on Comparison with the MYB Factors of Vegetable Nightshades (Solanaceae)

D. A. Fateev[a, *], F. A. Berensen[a], A. M. Artemyeva[a], O. G. Babak[b], K. K. Yatsevich[b], E. V. Drozd[b], and A. V. Kilchevsky[b]

[a] *Federal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, 190000 Russia*
[b] *Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus*
**e-mail: fateevdm1@gmail.com*

In order to study a regulation mechanism for one of the most ancient processes of anthocyanin biosynthesis in plants based on comparison of R2R3-MYB genes in Solanaceae (*S. lycopersicum*: *An1, An2*; *S. melongena*: *Myb1*; *C. annuum*: *Myb113-like1* и *Myb113-like2*) and Brassicaeae crops, a search for orthologous sequences in *Brassica oleracea* was performed. A sequence encoding MYB114 TF was found to be the closest in a nucleotide structure to the previously investigated genes in Solanaceae. Primers were selected and a comparative analysis of *Myb114* gene sequences was performed in *B. oleracea* varieties (white cabbage, red cabbage, kale, cauliflower, broccoli, and kohlrabi) with a wide intraspecies diversity by the anthocyanin accumulation in leaves and various food organs: heads, curds and stems. Alignment of *Myb114* sequences revealed a number of gene polymorphisms that closely correlate with high anthocyanin accumulation in *B. oleracea* leaves, including 3 SNPs in exon regions and a 271 bp deletion in the 1st intron. The identified SNPs lead to the replacement of two amino acids located in the region of DNA-binding domains, which leads to a change in the binding efficiency of this transcription factor with the promoters of structural biosynthesis genes and a decrease in their expression level in the forms without anthocyanin accumulation in leaves compared with the forms with their accumulation in vegetative plant parts. A molecular marker MYB114.2 has been proposed that may be used for the identification of headed cabbages and kales with high/low anthocyanin accumulation. By the amino acid structure and phenotypic manifestation (regulation of anthocyanin accumulation in leaves), *Myb114 B. oleracea* is the closest to *Ant2* tomato, *Myb2* eggplant and *Myb113-like2* pepper alleles. A high degree of conservatism of the SANT DNA-binding domains of MYB114 TF of *B. oleracea* and R2R3-MYB TF of nightshades was established.

Keywords: *Brassica oleracea* varieties, anthocyanin biosynthesis, R2R3-MYB transcription factors, TF domains, sequencing, DNA markers.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 50–64

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 575.174.5+582.632.2

МАРКЕРЫ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК В ИССЛЕДОВАНИИ ФИЛОГЕОГРАФИИ РОБУРОИДНЫХ ДУБОВ (*Quercus* L. СЕКЦИИ *Quercus*, Fagaceae) КРЫМСКО-КАВКАЗСКОГО РЕГИОНА

© 2023 г. С. А. Семерикова*

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

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

Поступила в редакцию 24.02.2022 г.
После доработки 22.06.2022 г.
Принята к публикации 23.06.2022 г.

Исследована изменчивость пяти участков хлоропластной ДНК (ASq, CDq, TFq, *trn*H-*psb*A и *trn*K-*mat*K) общей длиной более 10000 пн у трех видов робуроидных дубов крымско-кавказского региона (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*). Всего у 290 особей из 20 популяций обнаружено 11 гаплотипов, 10 из которых отличались от гаплотипов восточноевропейской части ареала. Полученные результаты показывают выраженную структуру географического распределения гаплотипов робуроидных дубов в Крыму и на Кавказе и принадлежность хлоропластных гаплотипов региона к нескольким дивергентным филогенетическим линиям. Проведено сравнение с данными других исследований, с оценкой степени эффективности использования разных хлоропластных регионов и маркеров. Обособленное филогенетическое положение гаплотипов крымско-кавказских популяций и значительное отличие от гаплотипов более северной части ареала позволяет сделать заключение об исторически длительном изолированном существовании робуроидных дубов на Кавказе и в Крыму. В то же время наличие общих гаплотипов указывает на тесные исторические связи крымско-кавказских популяций с Малой Азией и с Балканами. Все гаплотипы выявляются тремя фрагментами (ASq, CDq и TFq), с достаточным уровнем изменчивости и пригодными для решения задач филогеографии дубов в крымско-кавказском регионе. Маркеры *trn*H-*psb*A и *trn*K-*mat*K имели низкий уровень изменчивости и не выявили дополнительных гаплотипов. Предложены оптимизированные варианты генотипирования, включающие как поэтапное секвенирование, так и предполагающие сочетание анализа микросателлитных локусов хлоропластной ДНК (cpSSR), рестриктного анализа (PCR-RFLP) и секвенирования. Для оценки изменчивости маркеров в большем таксономическом диапазоне в анализ были включены представители других секций рода *Quercus*. Показано, что специфичные для дуба праймеры, предложенные для фрагментов ASq, CDq и TFq, пригодны для видов других секций.

Ключевые слова: Quercus robur, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, Кавказ, Крым, изменчивость хлоропластной ДНК, молекулярные маркеры, cpSSR, PCR-RFLP, филогеография, популяционная структура.

DOI: 10.31857/S0016675823010095, **EDN:** CNHMLD

Деревья рода *Quercus* (Fagaceae) являются важнейшими эдификаторами умеренных и субтропических лесов Северного Полушария [1, 2]. Хотя европейские виды и составляют небольшую долю от мирового разнообразия дубов [1], их экологическое и экономическое значение огромно. Среди них важнейшее место занимают виды робуроидных дубов (Roburoids), под которыми, согласно современной классификации, понимаются евразийские представители секции *Quercus* [1, 2]. Робуроидные дубы возникли в результате миграции из Сев. Америки видов секции *Quercus*, с последующей гибридизацией в Евразии с видами секции *Ponticae* [2]. После разделения в позднем миоцене робуроидных дубов на европейскую и восточноазиатскую группы [3] эволюция европейской группы была связана с горными системами Средиземноморья, среди которых Кавказ и Крым являются древними центрами флористического разнообразия [4–6] и плейстоценовыми рефугиумами лесной, в том числе широколиственной растительности [6–8]. На Кавказе, несмотря на почти непрерывное распространение дубовых лесов и отсутствие существенных географических барьеров, наблюдается сложная картина взаимоотношения видов и внутривидовых форм [9, 10],

нуждающаяся во всестороннем исследовании с помощью молекулярных методов.

Большой объем литературы посвящен изучению изменчивости европейских робуроидных дубов, в том числе филогеографии на основе анализа хлоропластной ДНК (**хпДНК**) [11–21]. К сожалению, восточная часть ареала, включая крымско-кавказский регион, изучена слабо. Исследования на территории Причерноморья, в Малой Азии и на Кавказе проводились в основном с применением метода RFLP (полиморфизм длин рестриктных фрагментов) и ограничивались небольшим числом особей [11–13] или отдельными областями [14–17]. Нерешенными остались вопросы связи Кавказа с прилегающими территориями: с Крымом, Малой Азией, в том числе с северными популяциями Восточной Европы, отделенными от Причерноморского региона степной зоной. Недавние исследования структуры изменчивости хпДНК дуба черешчатого в Восточной Европе показали наличие локальных рефугиумов дуба на востоке Русской равнины и на Урале [20, 21], в то же время в двух кавказских популяциях не были встречены гаплотипы, характерные для основного ареала Восточной Европы [20].

В единственной до настоящего времени работе по кавказскому региону, проведенной с использованием секвенирования [18], исследовалась филогеография дуба скального (*Q. petraea* ssp. *iberica* (Steven ex M. Bieb.) Krassiln.) и других видов дуба в пределах Грузии на основе двух межгенных спейсеров хпДНК (*trn*K-*mat*K, *trn*H-*psb*A) [22, 23]. У робуроидных дубов в Закавказье было выявлено пять гаплотипов, H1–H5 (далее в тексте как H1g–H5g), которые подразделялись на две отчетливые географические группы, западную и восточную, в соответствии с флористическими провинциями – Эвксинской и Кавказской [4]. Однако низкая изменчивость использованных фрагментов, изученная в ограниченном районе Закавказья, не позволила детально определить филогеографическую структуру дубов в крымско-кавказском регионе и сопоставить изменчивость с результатами других работ.

Более обширное филогеографическое исследование видов дубов трех секций (*Quercus*, *Cerris*, *Ilex*) было проведено в Турции [19] на основе трех некодирующих участков *trnT–L–F* региона хпДНК [24]. Внутри секции *Quercus* (робуроидные дубы) было идентифицировано девять гаплотипов (далее как H1t–H9t), для которых была выявлена филогеографическая структура в Турции. Отсутствие в пределах одного включенного в исследование региона хпДНК достаточного количества информативных сайтов привело к низкому разрешению дерева внутри клады робуроидных дубов. При этом сравнение с другими работами по филогеографии робуроидных дубов не проводилось.

Несмотря на достаточно многочисленные исследования изменчивости хпДНК европейских дубов, существенной проблемой являлось использование разных участков хпДНК и разных методик: RFLP-анализ, секвенирование, cpSSR (хлоропластные микросателлитные локусы) и SNPs (single nucleotide polymorphisms, однонуклеотидные полиморфизмы). Кроме того, очевидно, что для исследования изменчивости на низком таксономическом уровне необходим подбор маркеров, пригодных для проведения сравнений между исследованиями разных авторов и с достаточной изменчивостью внутри рассматриваемого географического региона.

В нашей предыдущей работе [20] по изменчивости дуба черешчатого были использованы три в основном некодирующих участка хпДНК (*psa*A-*trn*S, *psb*C-*trn*D и *trn*T-*trn*F) [24, 25], с применением новых, специфичных для рода праймеров [20]. Результаты секвенирования удалось частично сопоставить с данными RFLP-анализа аналогичных фрагментов у робуроидных дубов в Европе. Была предложена методика генотипирования с помощью cpSSR-маркеров гаплотипов дуба из северо-восточной части ареала. Однако при этом было показано [20], что для разных географических регионов (северная часть ареала – Кавказ) аллельные комбинации cpSSR-локусов могут совпадать между некоторыми гаплотипами, при существенном различии самих гаплотипов между регионами, что требует дальнейшего сопоставления вариабельности cpSSR-маркеров с данными секвенирования в разных регионах.

Цель работы состоит в: 1) изучении изменчивости хлоропластных маркеров в популяциях робуроидных дубов крымско-кавказского региона; 2) оценке степени эффективности использования разных хлоропластных маркеров для решения задач филогеографии дубов в крымско-кавказском регионе; 3) подборе методов, пригодных для широкомасштабного генотипирования большого количества образцов, в том числе, кроме секвенирования, таких анализов, как cpSSR и PCR-RFLP.

Для этого в дополнение к нашим предыдущим исследованиям [20] восточной части ареала дуба черешчатого, которые включали две выборки образцов с Кавказа, был собран материал из 18 популяций трех (*Q. robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl. и *Q. pubescens* Willd.) наиболее распространенных представителей робуроидных дубов в Крыму, на Северном Кавказе и в Закавказье [5, 6]. Исследо-

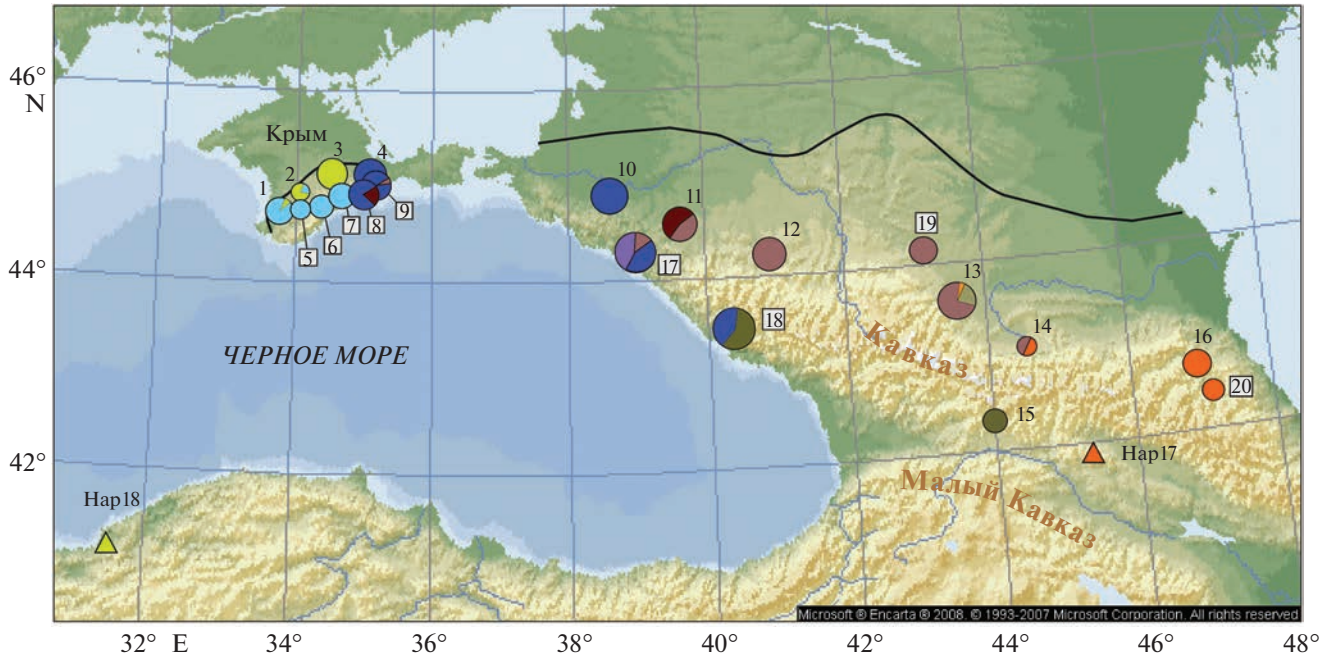


Рис. 1. Исследованные популяции *Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens* и географическое распределение хлоропластных гаплотипов дуба в крымско-кавказском регионе. Цифрами обозначены номера популяций из табл. 1. Номера выборок *Q. petraea* и *Q. pubescens* приведены в рамках. Цветовые обозначения гаплотипов соответствуют рис. 2. Площадь диаграмм пропорциональна размеру выборки. Частоты гаплотипов в популяциях приведены в табл. 1. Указана северная граница крымско-кавказской части ареала дуба. Треугольниками маркировано происхождение пластомов, полученных из базы данных [31].

валось пять участков хпДНК, три из которых использовались в предыдущей работе [20], еще два (*trn*K-*mat*K, *trn*H-*psb*A) были взяты из работ по филогеографии и баркодингу дубов Грузии и Средиземноморья [18, 22, 23]. Проводилось сравнение с данными секвенирования участков *trn*K-*mat*K, *trn*H-*psb*A из Грузии [18] и региона *trnT–L–F* из Турции [19], а также с результатами филогеографических исследований европейских робуроидных дубов в работах Petit et al. [12, 13], проведенных с использованием RFLP-анализа. Для оценки изменчивости маркеров в большем таксономическом диапазоне в анализ были включены представители других секций рода *Quercus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было исследовано 20 популяционных выборок (табл. 1, рис. 1) наиболее распространенных в крымско-кавказском регионе таксонов дуба. Для дуба черешчатого (*Q. robur* L.) всего изучено 159 деревьев из 11 популяций. Для дуба скального (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.) и дуба пушистого (*Q. pubescens* Willd.) – 131 дерево из девяти популяций. В Западном и Восточном Крыму на северном и южном макросклонах Главной гряды Крымских гор исследовано 105 образцов из девяти выборок. На Кавказе проанализировано 185 деревьев из 11 популяций, расположенных в разных ботанико-географических районах [5], включая Западный, Центральный и Восточный Кавказ, Западное и Центральное Закавказье. Расстояние между изученными деревьями составляло не менее 50 м. Таксономическая принадлежность устанавливалась по описаниям, приведенным в [10]. Ваучерные образцы хранятся в лаб. молекулярной экологии растений ИЭРиЖ УрО РАН. Выделение геномной ДНК проводилось с помощью метода CTAB [26] из высушенных в силикагеле листьев.

Для трех из пяти хлоропластных регионов (далее – фрагментов), *psa*A-*trn*S (ASq), *psb*C-*trn*D (CDq) и *trn*T-*trn*F (TFq), используемые праймеры, условия амплификации и секвенирования описаны ранее [20]. Фрагменты ASq, CDq и TFq были секвенированы у 38 образцов дуба полностью, у 45 образцов – частично для подтверждения гаплотипов. Дополнительно для всех выявленных нами гаплотипов у двух–трех образцов из разных географических регионов были секвенированы фрагменты *trn*H-*psb*A и *trn*K-*mat*K, как описано в [23]. ПРЦ-продукты очищали с помощью набора ExoSAP-IT (Affimetrix). Реакция секвенирования проводилась с помощью набора BigDye v 3.1 (Applied Biosystems), продукты реакции анализирова-

Таблица 1. Характеристика исследованных крымско-кавказских популяций дуба черешчатого (*Q. robur*), дубов скального *Q. petraea* (*pt*) и пушистого *Q. pubescens* (*pb*)

№	Популяции	Координаты		*n*	*N*	Гаплотипы (число особей)
		с.ш.	в.д.			
	Крым, *Q. robur*					
1	р. Бельбек	44°40′43″	33°38′30″	13	2	T (1), K (12)
2	р. Бодрак	44°45′59″	34°02′00″	5	2	T (4), K (1)
3	г. Ак-Кая	45°06′50″	34°36′33″	15	1	T (15)
4	г. Агармыш	45°00′38″	35°01′48″	17	1	Z-I (17)
	Крым, *Q. petraea*, *Q. pubescens*					
5	Чуфут-Кале (*pt*)	44°44′18″	33°55′58″	6	1	K (6)
6	Изобильное (*pt*)	44°41′58″	34°20′34″	9	1	K (9)
7	р. Биюк-Карасу (*pt*)	44°58′49″	34°36′33″	11	1	K (11)
8	г. Эчки-Даг (*pb*)	44°54′19″	35°07′58″	14	2	Z-I (11), E-III (3)
9	Старый Крым (*pb*)	45°08′28″	35°08′04″	15	2	Z-I (14), E-I (1)
	Кавказ, *Q. robur*					
10	Убинская	44°42′20″	38°31′27″	23	1	Z-I (23)
11	Куринская	44°24′20″	39°26′03″	20	2	E-I (9), E-III (11)
12	Псебай	44°02′28″	40°45′38″	18	2	E-I (18)
13	Нальчик	44°26′41″	43°35′36″	24	3	E-I (18), X-II (5), A-II (1)
14	Балта	42°55′12″	44°38′21″	4	2	F (2), E-I (2)
15	Цхинвал	42°14′57″	43°59′47″	8	1	X-I (8)
16	Эрпели	42°47′21″	46°58′40″	12	1	F (12)
	Кавказ, *Q. petraea*					
17	Новомихайловский (*pt*)	44°14′35″	38°50′35″	28	3	Z-I (12), Z-II (12), E-I (4)
18	Гагра (*pt*)	43°16′04″	40°19′40″	29	2	Z-I (12), X-III (17)
19	Пятигорск (*pt*)	44°03′16″	43°06′35″	12	1	E-I (12)
20	Терменлик (*pt*)	42°44′39″	47°00′17″	7	1	F (7)
	Среднее			14.5	1.6	
	Всего			290	11	

Примечание. *n* – объем выборки; *N* – число гаплотипов.

лись на автоматическом секвенаторе Нанофор 05 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) в Центре коллективного пользования "Современные технологии для экологических исследований" ИЭРиЖ УрО РАН. Редактирование и выравнивание полученных последовательностей выполняли вручную в программе BioEdit v 7.2.5 [27].

Филогенетические деревья гаплотипов построены с использованием байесовского подхода (BI) в программе MrBayes v 3.1.2 [28] и метода максимальной экономии (MP) в программном пакете PAUP*4.0b1 [29], параметры BI- и MP-анализов описаны в работе [30]. Нуклеотидные последовательности пяти фрагментов хпДНК были конкатенированы. Учитывались точковые мутации, инделы и инверсии, за исключением мутаций числа микросателлитных повторов ввиду их возможной гомоплазии. В филогенетический анализ, кроме новых гаплотипов из крымско-кавказского региона, были включены гаплотипы, ранее полученные нами [20] из восточной части основного ареала дуба черешчатого, а также нового гаплотипа Y-II из Хорватии (45°16′10″/14°03′29″, образец QR15, *Q. robur*). В анализ не вошли некоторые гаплотипы (R, N, E-II) из предыдущей работы [20], отличавшиеся от родственных гаплотипов только микросателлитными повторами. Для сравнения были взяты участки соответствующих фрагментов полных последовательностей хлоропластных геномов (пластомов) образцов дуба скального, происходящих из восточной части ареала: "Qpetraea_249.35.12.4" (RFLP-гаплотип Hap18 согласно [13]), Турция, Bolu (Ayikayasi) и "Qpetraea_184.43.9.4" (Hap17, Грузия, Telavi) из коллекции пластомов 22 деревьев для *Q. robur* и *Q. petraea* [31]. Кроме европейских робуроидных дубов, анализ был дополнен гаплотипом восточноазиатского робуроидного дуба *Q. mongolica* Fisch. ex Ledeb. (секция *Quercus*, Roburoids) (пластом из GenBank, номер MK564083). Для определения масштаба различий гаплотипов робуроидных дубов от видов других секций и групп рода *Quercus*, а также проверки возможности использования анализируемых хлоропластных регионов для европейских дубов других секций, секвенирование всех пяти участков было проведено для двух средиземноморских видов дубов подрода *Cerris* из разных секций, образцы которых взяты от деревьев, растущих в ООПТ парк Массандра, Ялта: пробковый дуб *Q. suber* L. (секция *Cerris*) и каменный дуб *Q. ilex* L. (секция *Ilex*). В анализ был включен американский вид *Q. lobata* Nee (пластом из GenBank, CM012305 [32]) (секция *Quercus*, Dumosae), поскольку евроазиатские виды секции *Quercus* монофилетичны по хпДНК по отношению к американским видам той же секции [33]. В качестве внешней группы был использован *Trigonobalanus doichangensis* (A. Camus) Forman (Fagaceae) (пластом из GenBank, KF990556). Нуклеотидное разнообразие π вычислялось с помощью DnaSP v 10.1 [34].

Одной из целей работы был подбор методики надежного и быстрого генотипирования большого числа образцов. Кроме подбора оптимальных для секвенирования участков с диагностическими для гаплотипов мутациями, была оценена возможность идентификации гаплотипов сочетанием анализа изменчивости хлоропластных микросателлитных локусов (cpSSR) и рестриктного анализа (PCR-RFLP). Ранее для дуба черешчатого [20] был апробирован метод экономичного и быстрого типирования гаплотипов у большого количества образцов, где в качестве маркеров использовались микросателлитные локусы μdt1, μdt3, μdt4, μcd4 и μcd5 [35]. Было установлено соответствие комбинации аллелей cpSSR-локусов с гаплотипами, выявленными в результате секвенирования трех хлоропластных фрагментов ASq, CDq и TFq в восточной части ареала дуба черешчатого, чем была подтверждена возможность типирования маркерами cpSSR хлоропластных гаплотипов дуба в пределах одного региона. Методика исследования изменчивости пяти cpSSR-локусов методом электрофореза в полиакриламидном геле подробно описана в предыдущей работе [20]. Для всех 290 новых образцов крымско-кавказского региона был проведен анализ изменчивости пяти cpSSR-локусов, результаты сопоставлены с данными секвенирования части образцов (3–4) для каждого cpSSR-гаплотипа в каждой популяции. На основе результатов секвенирования подбирались соответствующие рестриктазы, позволяющие подтвердить гаплотип рестриктным анализом. Для всех образцов был проведен анализ RFLP (сочетание фрагмент/рестриктаза, см. Результаты) и установлено соответствие полученных хпДНК гаплотипов с набором cpSSR-аллелей. У части образцов, для которых рестриктаза не была подобрана (образцы с родственными гаплотипами X-I, X-II, X-III и Z-I, Z-II), разделение гаплотипов осуществлялось секвенированием соответствующих фрагментов (см. Результаты).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследования 290 индивидуумов из 20 популяций робуроидных дубов в крымско-кавказском регионе по совокупности результатов секвенирования пяти фрагментов хпДНК обнаружено 10 региональных гаплотипов (табл. 1, рис. 1), которые отличались от гаплотипов основного

Таблица 2. Показатели изменчивости пяти фрагментов хлоропластной ДНК, определенные (I) на основе последовательностей 19 гаплотипов европейских робуроидных дубов в восточной части ареала, (II) при включении в анализ последовательностей видов других групп и секций *Quercus*

Фрагмент	(I) 19 гаплотипов европейских робуроидных дубов					(II) Все гаплотипы*		
	AL, пн	L, мин–макс	общее число мутаций (инделы, инверсии)**	π	*N* hap**	AL, пн	π	общее число мутаций (инделы, инверсии)**
ASq	3727	3663–3717	16 (4)	0.00062 ± 0.00012	12	3776	0.00163 ± 0.00049	54 (8)
CDq	3586	3554–3577	16 (4)	0.00054 ± 0.00010	16	3591	0.00130 ± 0.00040	44 (7)
TFq	1818	1804–1812	14 (3)	0.00143 ± 0.00025	12	1839	0.00231 ± 0.00044	33 (8)
*trn*K-*mat*K	602	602	1 (0)	0.00082 ± 0.00011	2	603	0.00463 ± 0.00169	18 (0)
*trn*H-*psb*A	434	432–434	2 (0)	0.00160 ± 0.00046	4	468	0.00502 ± 0.00150	16 (6)
Всего	10167		49 (11)		19	10277		165 (29)

Примечание. AL – длина выровненных последовательностей; L – длина последовательностей, мин–макс; *N* hap – число гаплотипов; π – нуклеотидное разнообразие.
* – вместе с *Q. mongolica*, *Q. lobata* и видами других секций *Q. suber* и *Q. ilex* (без внешней группы).
** – не учитывались микросателлитные повторы.

ареала, выявленных ранее [20]. На Кавказе найдено восемь специфичных гаплотипов (Z-I, Z-II, E-I, E-III, X-I, X-II, X-III, F) и один гаплотип основного ареала (A-II). В Крыму присутствуют пять региональных гаплотипов (K, T, Z-I, E-I, E-III). Наиболее распространенными в Крыму оказались гаплотипы T (19%), K (37%), Z-I (40%), на Кавказе – гаплотипы Z-I (25%), E-I (34%) и F (11.3%). В большинстве выборок обнаружено один или два гаплотипа, в нескольких – по три гаплотипа. Наиболее частые гаплотипы (Z-I, E-I, F – на Кавказе, Z-I и K – в Крыму) присутствуют в популяциях как *Q. robur*, так и в выборках *Q. petraea* или *Q. pubescens*. Гаплотип T в Крыму отмечен только у *Q. robur*. Более редкие гаплотипы обычно обнаружены в одной из выборок. На Кавказе гаплотипы X-I и X-II встретились в выборках дуба черешчатого, гаплотипы X-III и Z-II – в выборках дуба скального.

У трех исследованных видов европейских робуроидных дубов в трех географических областях (восточноевропейская часть ареала, Крым, Кавказ) суммарно, с дополнением данных из предыдущей работы [20], обнаружено 19 хпДНК гаплотипов. В пяти секвенированных регионах у 19 гаплотипов присутствуют 49 мутаций, из них 38 точковых замен и 11 инделов и инверсий (табл. 2). При включении в анализ видов других секций (*Q. suber, Q. ilex*), а также американского вида *Q. lobata* и азиатского *Q. mongolica* число изменчивых признаков возрастает в несколько раз. Наибольшее число изменчивых признаков у робуроидных дубов (46 изменчивых сайтов) содержали наиболее длинные фрагменты (ASq, CDq, TFq). Несмотря на то что секвенирование фрагмента CDq выявляет наибольшее число гаплотипов (табл. 2), фрагмент TFq оказался наиболее оптимальным при идентификации гаплотипов секвенированием – у робуроидных дубов в нем присутствовало 14 мутаций (11 замен, 3 индела), из них в Крыму и на Кавказе – шесть мутаций (5 замен, 1 индел). Изменчивые сайты в регионе TFq приведены в табл. 3. Установлено, что секвенированием с праймера TFq(A) определяются почти все крымско-кавказские гаплотипы, кроме некоторых близкородственных в группах X и Z. В восточноевропейской части ареала дуба черешчатого последовательностями TFq также идентифицируется большинство гаплотипов. Разделение близких гаплотипов осуществляется дополнительным секвенированием участков других фрагментов (табл. 3). Кроме указанных в табл. 3, маркирующие гаплотипы диагностические мутации имеются также во фрагменте ASq – для идентификации гаплотипа Z (секвенирование с помощью праймера ASq(A2)), гаплотипа T (праймеры ASq(A2) и ASq(A)), гаплотипа F (праймер ASq(S3)), гаплотипа K (праймер ASq(S)); во фрагменте CDq присутствуют диагностические мутации гаплотипов Z и T (секвенирование с праймера CD(C)).

Инверсия GA, обнаруженная во фрагменте CDq (позиция 2936, положение сайта в последо-

Таблица 3. Изменчивые сайты в регионе TFq хлоропластной ДНК для 19 гаплотипов робуроидных дубов: *Q. robur* из основного ареала [20], *Q. robur*, *Q. petraea* и *Q. pubescens* из крымско-кавказского региона. Серым цветом отмечены диагностические признаки для гаплотипов. Последовательность нуклеотидов для инсерций и инверсии см. в Примечании

Гаплотипы	TFq (0–1806)[1]														Фрагмент[3]	Праймер для секвенирования[3]
	TFq(A)[2]										TFq(F)[2]					
	34[1]	189	199	203	209–232	291–292	357	492	695	769	1007	1204	1464	1528–1529		
Основной ареал																
A-I	C	T	A	G	–	–	G	A	A	A	T	T	G	–		
A-II	C	T	A	G	+[a]	–	G	A	A	A	T	C	G	–		
C	C	T	A	G	–	–	G	A	A	G	T	C	G	+[c]		
B	C	T	A	T	–	–	G	A	G	A	C	C	G	–	CDq	CDq(D)
D	C	T	A	T	–	–	G	A	G	A	C	C	G	–	CDq	CDq(D)
S	C	T	A	T	–	–	G	A	G	A	C	C	G	–	CDq	CDq(D)
G	C	T	A	T	–	–	G	A	G	A	C	C	G	–	ASq	ASq(A3)
Y-I	C	A	G	T	–	–	A	A	A	A	T	C	A	–		
Y-II	C	A	G	T	–	–	G	A	A	A	T	C	A	–		
Крым, Кавказ							G									
T	C	T	A	G	–	–	G	C	A	G	T	C	G	–		
F	C	T	A	G	–	–	G	A	A	A	T	C	G	–		
K	C	T	A	T	–	–	G	A	A	A	T	C	G	–		
E-I	C	T	A	T	–	+[b]	G	A	G	A	T	C	G	–	CDq	CD(C)
E-III	C	T	A	T	–	–	G	A	G	A	T	C	G	–	CDq	CD(C)
X-I	C	T	A	T	–	–	G	A	G	A	T	C	G	–	CDq	CDq(D)
X-II	C	T	A	T	–	–	G	A	G	A	T	C	G	–	CDq	CDq(D)
X-III	C	T	A	T	–	–	G	A	G	A	T	C	G	–	CDq	CDq(D)
Z-I	T	T	A	T	–	+[b]	G	A	G	A	T	C	G	–	CDq	CDq(D)
Z-II	T	T	A	T	–	+[b]	G	A	G	A	T	C	G	–	CDq	CDq(D)

Примечание.
[1] – положение сайтов в последовательности *Q. robur*, гаплотип A-I (номер GenBank MT180931).
[2] – праймер для секвенирования.
[3] – дополнительный минимальный набор фрагментов для разделения близкородственных гаплотипов и используемые праймеры.
[a] – инверсия “ATCTAGAATTAGAATAAATAAGTA”.
[b] – инсерция “ATAAT”.
[c] – инсерция “TTACA”.

Таблица 4. Хлоропластные гаплотипы и описание соответствующих им аллелей хлоропластных микросателлитных локусов (cpSSR), используемых для типирования гаплотипов

Крымско-кавказские гаплотипы	cpSSR-локус [35]				Восточно-европейские гаплотипы [20][3]
	μdt1[1]	μdt3	μdt4	μcd4	
T	3 $(A)_{11}$	1 $(A)_9$	1 $(A)_9$	2 $(T)_{11}$	A-I*
F	3 $(A)_{11}$	1 $(A)_9$	1 $(A)_9$	1 $(T)_{10}$	A-II
K	2 $(A)_{10}$	3 $(A)_{11}$	2 $(A)_{10}$	1 $(T)_{10}$	S
E-I, E-III*	2 $(A)_{10}$	2 $(A)_{10}$	2 $(A)_{10}$	1 $(T)_{10}$	B
X, X-II, X-III*	2 $(A)_{10}$	4 $(A)_{12}$	2 $(A)_{10}$	1 $(T)_{10}$	D
X-III	2 $(A)_{10}$	4 $(A)_{12}$	2 $(A)_{10}$	2 $(T)_{11}$	
Z-I	2 $(A)_{10}$	2 $(A)_{10}$	2 $(A)_{10}$	2 $(T)_{11}$	
Z-II	2 $(A)_{10}$	2 $(A)_{10}$	2 $(A)_{10}$	3 $(T)_{12}$	
Позиция[2]	35327	34341	35148	31835	

Примечание.
[1] – приводятся номера аллелей в порядке убывания подвижности на геле и число повторов в микросателлите по данным секвенирования, см. [20].
[2] – положение в хлоропластном геноме *Quercus lobata*, CM012305 [32].
[3] – гаплотипы из работы [20], выявленные в популяциях *Q. robur* основной части ареала, совпадающие по набору cpSSR аллелей с крымско-кавказскими гаплотипами.
* – разделение гаплотипов с совпадающими наборами cpSSR-аллелей см. Результаты.

вательности *Q. robur*, гаплотип A-I (номер GenBank MT180905), является высоко гомопластичной – изменчивость данного признака встречается в разных линиях. Эта инверсия изменчива между такими родственными гаплотипами как Y-I и Y-II, B/D и S/G, F и Hap17. Гаплотипы Z и Z-II, X-I и X-II отличаются друг от друга только этой инверсией. Подобные гомопластичные мутации обычно не учитываются в филогенетическом анализе, однако инверсия, возможно, будет маркировать недавно возникшие “молодые” гаплотипы и их распределение у родственных видов дубов.

В cpSSR-локусах μdt1, μdt3, μdt4, μcd4 и μcd5 было выявлено от двух до четырех аллелей, при этом локус μcd5 был неизменчив (аллель 1). Комбинация четырех вариабельных локусов в крымско-кавказском регионе маркировала гаплотипы K, T, F, Z, Z-II и, не разделяя между собой, родственные гаплотипы E и E-III и близкие X-I, X-II, X-III (табл. 4). Почти для всех гаплотипов Крыма и Кавказа имеются гаплотипы из восточноевропейской части ареала, совпадающие с ними по сочетанию cpSSR-аллелей (табл. 4), но значительно отличающиеся от них по нуклеотидным последовательностям. Для идентификации гаплотипов с одинаковым сочетанием cpSSR-аллелей, кроме секвенирования, использовался рестриктный анализ: комбинацией TFq/*Hin*fI дифференцировались гаплотипы группы E (Крым–Кавказ) от гаплотипа B (Восточная Европа), комбинацией ASq/*Tru*9 разделялись гаплотипы группы X от гаплотипа D, гаплотип T от A-I, гаплотип K от S, комбинацией CDq/*Hin*fI – гаплотип F от A-II. В результате исследования 290 образцов было установлено, что все гаплотипы являлись регионально-специфичными, за исключением одной особи на Кавказе, в популяции Нальчик, имевшей гаплотип A-II, подтвержденный секвенированием и характерный для востока Русской равнины (см. [20]). Таким образом, в пределах крымско-кавказского региона большинство гаплотипов возможно диагностировать cpSSR-методом (табл. 4). Однако некоторые близкородственные гаплотипы требовали для идентификации дополнительного секвенирования или PCR–RFLP-анализа. Гаплотип E-III дифференцировался секвенированием фрагмента TFq с праймера TFq(A) или рестриктным анализом (TFq/*Hin*fI). Разделение родственных гаплотипов группы X проводилось секвенированием участка фрагмента CDq (табл. 4).

Суммарная длина выровненных последовательностей фрагментов для 19 гаплотипов европейских робуроидных дубов составила 10167 пар нуклеотидов (пн), с учетом *Q. lobata*, *Q. mongolica* и видов других секций – 10277 пн, с внешней группой – 10394 пн. На рис. 2 представлено байе-

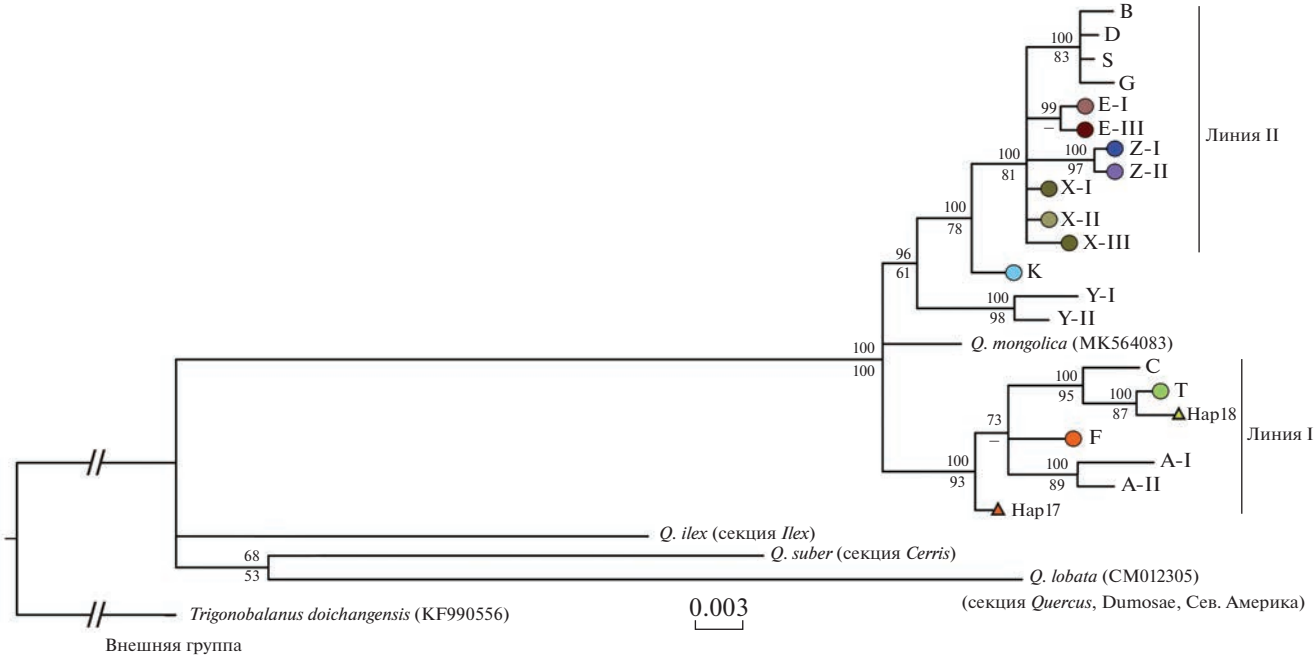


Рис. 2. Филогенетическое дерево хлоропластных гаплотипов робуроидных дубов (*Quercus robur*, *Q. petraea, Q. pubescens* и *Q. mongolica*) и гаплотипов *Q. lobata*, *Q. ilex*, *Q. suber*, построенное с помощью байесовского метода (50%-ный консенсус) на основе нуклеотидных последовательностей пяти фрагментов хпДНК общей длиной ~10100 пн. Над линиями приведена статистическая поддержка байесовским методом (значения апостериорной вероятности, %), под линиями – бутстреп-поддержка (MP, 1000 репликаций). Цветными кругами маркированы полученные в нашей работе крымско-кавказские гаплотипы. Треугольниками обозначены гаплотипы пластомов из базы данных [31]. Обозначения гаплотипов восточноевропейской части ареала и филогенетические линии I и II соответствуют принятым в работе [20]. Шкала отражает число замен на нуклеотидную позицию. Для гаплотипов *Q. lobata*, *Q. mongolica* и для внешней группы приводятся номера пластомов из GenBank.

совское дерево (BI), с указанием значений статистических поддержек клад обоих деревьев (MP). Гаплотипы робуроидных дубов образуют высокоподдержанную монофилетичную кладу, которая значительно дифференцирована от гаплотипов дубов других секций и американского вида секции *Quercus*.

Внутри “робуроидной” клады гаплотипы восточноевропейских и крымско-кавказских дубов распределены на две дивергентные ветви, внутри которых, в свою очередь, идет подразделение еще на несколько субклад. Первая ветвь соответствует выделенной ранее [20] в европейской части ареала линии I, с дополнением крымского гаплотипа T, кавказского гаплотипа F (Дагестан) и RFLP-гаплотипа Hap17 (Восточная Грузия). Крымский гаплотип T почти совпадал по набору признаков с RFLP-гаплотипом Hap18 пластома из Западной Турции [31] и филогенетически является родственным гаплотипу C из Восточной Европы [20]. Вторая ветвь разделяется на две дивергентные линии: одну из них образуют европейские гаплотипы Y-I и Y-II. Гаплотип K является сестринским для линии II, соответствующей выделенной ранее в европейской части ареала дуба черешчатого [20]. Линия II включает несколько крымско-кавказских гаплотипов (группы X, Z, E) и субкладу восточноевропейских гаплотипов (B, S, D, G). Обособленное положение гаплотипа восточноазиатского вида *Q. mongolica* показывает, что время дивергенции гаплотипа *Q. mongolica* сравнимо со временем разделения основных линий европейско-западноазиатских хлоропластных гаплотипов робуроидных дубов.

На Северном Кавказе в направлении с запада на восток обнаружена дифференциация популяций по составу гаплотипов (рис. 1). Гаплотип Z встречен только в выборках Западного Кавказа и Западного Закавказья (Гагра), гаплотип F – только в восточных популяциях (Дагестан, Сев. Осетия). В центральной и западной части преобладают родственные гаплотипы E-I и E-II. Гаплотипы группы X были встречены на северном макросклоне Большого Кавказа в Нальчике (X-II), на южном макросклоне в выборке Цхинвал (X-I) и в выборке Гагра (X-III). На Крымском п-ове в западной и центральной части обнаружены два гаплотипа, T и K. Причем если на северном макро-

склоне Главной гряды Крымских гор присутствуют оба гаплотипа (T и K), то в выборках южного макросклона, где не встречается дуб черешчатый, гаплотип T не обнаружен. В Восточном Крыму во всех популяциях преобладают кавказские гаплотипы: в основном гаплотип Z-I, в некоторой пропорции встречены E-I и E-III.

По результатам секвенирования межгенных спейсеров *trn*H-*psb*A и *trn*K-*mat*K было проведено сопоставление полученных гаплотипов с данными по дубам в Закавказье (Грузии) [18]. Изменчивость *trn*H-*psb*A и *trn*K-*mat*K была низкой (табл. 2). В пределах крымско-кавказского региона их сочетание определило у наших образцов всего два гаплотипа по точковым заменам и пять гаплотипов добавлением изменчивого микросателлита в *trn*H-*psb*A. Гаплотип F по набору признаков, включая микросателлитный повтор, который учитывался авторами работы [18], и по географическому распространению совпал с H1g [18]. Гаплотипы групп E и X совпали с H2g [18]. Последовательности, указанные еще для трех гаплотипов робуроидных дубов Закавказья (H3g, H4g, H5g) [18], в наших данных не обнаружены.

В значительно большей степени удалось провести сравнение по фрагменту *trn*T-*trn*F (TFq) полученных нами гаплотипов с данными из Турции [19]. С учетом неполного соответствия между последовательностями, вызванного отсутствием небольших участков фрагмента *trn*T-*trn*F в работе [19], большинство изменчивых сайтов совпадает и можно сделать вывод о родстве гаплотипов. Так, при наличии специфических мутаций в TFq обнаружено совпадение гаплотипа T (Крым) с гаплотипом H5t (Турция) [19], гаплотипа C (Восточная Европа) с гаплотипом H4t. По совокупности признаков совпали гаплотипы X (Кавказ) и H7t, гаплотипы F (Кавказ) и H1t. Близкородственными оказались гаплотипы E и H8t, K и H3t. Некоторые гаплотипы: Z (Крым–Кавказ) и большинство гаплотипов из Восточной Европы в Турции отсутствуют. Сравнение полученных нами последовательностей TFq для дубов других секций показало соответствие с видами тех же секций из турецких популяций: гаплотип *Q. suber* совпал с гаплотипом H14t (MT934505, встречен у видов клады Cerris, *Q. cerris* и др., Центр. Турция). Гаплотип *Q. ilex* почти совпал с гаплотипом H27t (MT934553, клада Ilex, *Q. ilex*, север Турции).

В GenBank помещены последовательности вновь полученных гаплотипов – для фрагментов ASq (ON101338–ON101346), CDq (ON101347–ON101355) и TFq (ON101376–ON101384); для всех гаплотипов, выявленных у изученных робуроидных дубов – последовательности фрагментов *trn*H-*psb*A (ON101385–ON101403) и *trn*K-*mat*K (ON101356–ON101375).

ОБСУЖДЕНИЕ

У трех видов дубов (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*) в трех исследованных областях (восточноевропейская часть ареала, Крым и Кавказ) обнаружено 19 хлоропластных гаплотипов. Из них в крымско-кавказском регионе присутствуют 11 гаплотипов, 10 из которых были специфичны для крымско-кавказской части ареала. Надежная идентификация гаплотипов достигается сочетанием трех фрагментов ASq, CDq и TFq. Для массового генотипирования наиболее эффективным было последовательное секвенирование определенных изменчивых участков, начиная с фрагмента TFq с помощью праймера TFq(A), при добавлении по необходимости секвенирования дополнительных участков (табл. 3). При больших объемах данных может быть применено сочетание cpSSR-маркирования ([20], настоящее исследование), дополненное секвенированием или рестриктным анализом. Показано, что в пределах отдельных регионов (восточноевропейская часть основного ареала дуба черешчатого/крымско-кавказский регион) для генотипирования, как правило, достаточно анализа хлоропластных микросателлитных локусов (табл. 4), что было подтверждено секвенированием (см. Результаты). Кроме того, анализ cpSSR может быть использован для поиска новой изменчивости, так как быстро мутирующие микросателлитные локусы могут маркировать новые гаплотипы (примером является выявление с помощью cpSSR-маркеров гаплотипа Z-II).

Применение маркеров *trn*H-*psb*A и *trn*K-*mat*K в настоящем исследовании не выявило новых гаплотипов, по сравнению с тремя более длинными фрагментами (ASq, CDq и TFq). Наши образцы, представляющие все географические регионы, эти маркеры делят на восемь гаплотипов (с учетом микросателлитного повтора в последовательности *trn*H-*psb*A, который авторами работы [18] использовался для учета гаплотипов) или всего на четыре гаплотипа, без учета микросателлита. Использование изменчивости микросателлитного повтора в *trn*H-*psb*A [18] при малом числе изменчивых нуклеотидов (табл. 2) может приводить к неверной интерпретации филогенетических отношений гаплотипов. Так, совпадение гаплотипов робуроидных дубов из Грузии с гаплотипами из Кореи, Италии, Болгарии, Украины по маркерам *trn*H-*psb*A и *trn*K-*mat*K, согласно результатам работы [18], может всего лишь означать совпадение последовательностей по двум данным маркерам и

требует проверки с применением более изменчивых фрагментов. Например, в настоящей работе сочетание последовательностей *trn*H-*psb*A и *trn*K-*mat*K, включая микросателлитный повтор, совпадает у двух достаточно отличающихся друг от друга по другим фрагментам гаплотипов T (Крым) и Hap17 (Грузия, пластом из [31]).

Сравнением полученных нами последовательностей кавказских гаплотипов с гаплотипами из работы [18] удалось установить соответствие с нашими данными двух гаплотипов из Грузии (H1g и H2g). Еще три родственных им гаплотипа (H3g, H4g, H5g), указанных в работе [18], в исследованных на Кавказе выборках не обнаружены. Возможно, что в Закавказье могут присутствовать дополнительные, по сравнению с Северным Кавказом, гаплотипы. Однако использование маркеров *trn*H-*psb*A и *trn*K-*mat*K с низкой изменчивостью не позволяет разделить некоторые гаплотипы (например, гаплотипы E и X), поэтому для филогеографических исследований робуроидных дубов кавказского региона, очевидно, выбор должен быть сделан в пользу маркеров с большим разрешением.

Лучшую эффективность имело типирование с помощью фрагмента *trn*T-*trn*F, которое показало высокую степень совпадения с полученными в работе [19] гаплотипами таксонов секции *Quercus* в Турции (H1t–H9t). Все они совпали или были близкородственны выявленным в нашем исследовании гаплотипам из Крыма и Кавказа. Использование нами специфических праймеров для региона TFq [20], вместо амплификации и секвенирования трех небольших коротких участков с разными протоколами амплификации [19, 24], позволило получить последовательности большей длины (весь фрагмент *trn*T-*trn*F) при меньшем числе ПЦР и меньших затратах. Однако из-за небольшого в целом количества парсимонически информативных сайтов использование только одного фрагмента TFq не позволяет с достаточным разрешением определить филогенетические отношения гаплотипов.

Дополнение нового материала позволило с большей определенностью, по сравнению с нашей предыдущей работой [20], сопоставить полученные филогенетические линии гаплотипов (рис. 1) с RFLP-линиями из работ Petit et al. [12, 13], выделенными для восточной части ареала европейских робуроидных дубов. Клада линии I (рис. 2) определяется как соответствующая зеленой линии “E” из работ [12, 13]. Субклада восточноевропейских гаплотипов (B, S, D, G) аналогична гаплотипам синей линии “A” [12, 13]. Характер изменчивости последовательностей, в частности, наличие общей для гаплотипов Z и E-I инсерции в TFq позволяет соотнести крымско-кавказские гаплотипы групп E и Z с RFLP-гаплотипами 8 и 9 [13], которые принадлежат крымско-кавказской линии “F” [12]. Гаплотипы Y-I и Y-II (Калининградская обл. и Хорватия) близкородственны RFLP-гаплотипам 1 и 2 из красной линии “C” (Апеннинской) [12, 13]. Дивергентный гаплотип K, распространенный в Крыму, не удалось сопоставить с линиями, определенными в работах Petit et al. [12, 13].

Глубокое разделение представителей разных секций и дифференцирование американского *Q. lobata* от робуроидных дубов на уровне различий секций *Cerris* и *Ilex* соответствует данным последних исследований филогении рода *Quercus* [3, 36]. Таксономическая принадлежность включенных в анализ образцов дубов других секций (*Q. suber* и *Q. ilex*) подтверждается сравнением с последовательностями из работы [19]. Показано, что специфичные для дуба праймеры, предложенные для фрагментов ASq, CDq и TFq [20], пригодны для видов других секций.

Для крымско-кавказского региона характерны значительная дифференциация от восточноевропейской части ареала [20] и отсутствие с последней близкородственных гаплотипов. В исследованных районах наблюдается выраженная пространственная структура распределения гаплотипов. Популяции дуба на Крымском п-ове дифференцированы как от основного ареала, так и от Кавказа. В западной и центральной части там преобладают два гаплотипа, T и K, входящие в разные филогенетические клады. Эти гаплотипы пока не обнаружены на Кавказе. Гаплотип T, при сравнении с данными [19], распространен в Турции и, по-видимому, пришел в Крым из Малой Азии вдоль кавказского побережья или через Балканы. Происхождение гаплотипа K также может быть связано с Малой Азией, где распространены родственные ему гаплотипы [19]. Наличие в лесах Восточного Крыма западно-кавказского гаплотипа Z-I свидетельствует о связях популяций дуба из Восточного Крыма с Западным Кавказом.

На Кавказе, при сравнении наших данных с данными из работы [18], отмечается совпадение нескольких гаплотипов, подтверждающее параллельную дифференциацию с запада на восток на Северном Кавказе и в Закавказье, где по маркерам, использованным в [18], выявлено подразделение на две области. Для Северного Кавказа предварительно предполагается, по крайней мере, три района: западный, центральный и восточный (рис. 1). Возможно, на Кавказе имеется дифференциация и в широтном направлении, так как гаплотипы группы X больше распространены в Закавказье.

Отметим также, что гаплотип Z в выборках Грузии не найден, что вероятно означает ограниченность генетического потока между Закавказьем и Западным Кавказом. Более детальное сравнение разнообразия и географического распределения гаплотипов внутри региона и в прилегающих областях поможет объяснить миграционные пути и локализацию рефугиумов. Особое внимание заслуживает увеличение числа выборок и таксонов робуроидных дубов в Закавказье.

В исследованной крымско-кавказской части ареала подавляющее большинство особей (289 из 290) несет гаплотипы, специфичные этому региону. У дуба черешчатого на Кавказе единично встречен гаплотип, характерный для восточной части основного ареала (A-II), и его обнаружение вблизи города Нальчик, возможно, связано с его антропогенным происхождением. Однако факт присутствия "северного" гаплотипа на Кавказе требует расширения исследований популяций дуба в Предкавказье, в областях, близких к северной границе кавказского ареала дуба.

Обособленное филогенетическое положение гаплотипов крымско-кавказских популяций и значительное отличие по хпДНК от восточноевропейской части ареала (рис. 2) позволяет сделать заключение об исторически длительном изолированном существовании робуроидных дубов в Крыму и на Кавказе. При сравнении с данными, полученными с помощью разных хпДНК маркеров [13–16, 19], выявляется историческая связь популяций дуба в крымско-кавказском регионе с Малой Азией и Балканским п-овом в гораздо большей степени, чем с северо-восточной частью ареала. Ранее в нескольких работах, проведенных с помощью RFLP-анализа, были отмечены гаплотипы и группы гаплотипов с дизъюнктивно-широтным распределением, встреченные на Кавказе, в Крыму и на Балканах [11–17]. Наиболее широкое распространение от Италии, через Балканы, до Кавказа отмечается для RFLP-гаплотипа 17 [11–15, 17]. Следует отметить, что этот гаплотип является "комплексным", т.е. подразделяется на несколько субгаплотипов (17a–17e), дизъюнктивно распределенных на Балканах [12, 14, 15, 17]. В настоящей работе показано близкое, но не полное соответствие RFLP-гаплотипа Hap17 из Грузии и восточно-кавказского гаплотипа F (Дагестан) (рис. 2). Вероятно, гаплотип F совпадает также с турецким гаплотипом H1t из работы [19], который широко распространен в Сев. Турции вплоть до европейской части [19]. Особый интерес представляет обнаружение в Румынии [14, 16] RFLP-гаплотипов (9' и 13), которые указываются в работе Petit et al. на Кавказе [13] и предположительно могли мигрировать из Восточного Причерноморья [14, 16]. Точную степень родства крымско-кавказских гаплотипов с балканскими (такие, как RFLP-гаплотипы 9', 13, 17) можно будет установить только при дальнейшем секвенировании.

В крымско-кавказском регионе наиболее частые гаплотипы присутствуют в популяциях как *Q. robur*, так и *Q. petraea* или *Q. pubescens* (табл. 1, рис. 1). Отдельные, более редкие гаплотипы обнаружены в малом количестве выборок, иногда только у одного из видов. Общность гаплотипов у близких видов робуроидных дубов отмечается во многих работах [11–13], в том числе в Грузии и в Турции [18, 19], и чаще всего связывается с историческим генным потоком, гибридизацией и интрогрессией. Однако информация о локализации редких, более молодых гаплотипов может свидетельствовать об истории конкретной популяции или о разной интенсивности межвидового генного потока. В некоторых работах [19, 37] отмечается разница в составе гаплотипов между симпатрическими популяциями разных видов. Так, в работе [37] гаплотип, преобладающий у *Q. robur*, отсутствует у других видов в смешанном насаждении, что свидетельствует, по мнению авторов, о поздней миграции этого вида в район исследований. Таким образом, различия в гаплотипическом составе симпатрических популяций может указывать на разные пути колонизации, используемые разными видами. Так, редкий гаплотип E-III на Кавказе был отмечен в выборке дуба черешчатого, в Крыму – в выборке дуба скального. Интересно, что достаточно частый гаплотип T (Крым) был отмечен только в выборках дуба черешчатого. Однако совпадающий с ним по последовательности TFq гаплотип H5t был отмечен в Турции у всех таксонов робуроидных дубов [19]. Для дальнейшего установления соотношений гаплотипов разных видов дубов в Крыму необходимо увеличить число выборок *Q. petraea* и *Q. pubescens* на северном макросклоне Главной гряды в Крыму, в том числе в местах их совместного обитания с дубом черешчатым.

В настоящее время все большее значение в популяционных исследованиях приобретают высокопроизводительные ('high-throughput') методы генотипирования, позволяющие определять генотип сотен и тысяч индивидуумов по большому количеству маркеров ядерного и цитоплазматического происхождения. Важным этапом разработки соответствующих методик является подбор информативных снипов (SNP) и инделов. В широкомасштабном исследовании с помощью "таргетного секвенирования" 1970 особей в 197 популяциях дубов черешчатого и скального из Восточ-

ной и Центральной Европы был использован набор из 381 полиморфных локусов, в том числе 17 хлоропластных и пяти митохондриальных SNP. Было выявлено 13 хлоропластных гаплотипов [21]. При сравнении SNP, использованных при разработке набора, с изменчивостью секвенированных нами фрагментов было обнаружено, что в наших фрагментах CDq и TFq присутствует по одному SNP из набора [38], обе мутации маркируют гаплотипы Y-I и Y-II (Апеннинская линия). Во фрагментах ASq, *trn*H-*psb*A и *trn*K-*mat*K нет ни одного SNP из приведенного набора [38]. При анализе различий между гаплотипами, выявляемыми с помощью SNP из работы [38], очевидно, что большая часть изменчивости приходится на различия между основными линиями хпДНК, выделенными RFLP-анализом в работе Petit et al. [12] (линии B, C, A, E) и, вероятно, маркеры SNP были подобраны с учетом способности дифференциации линий. Но внутри линий (и географических регионов) изменчивость SNP низкая. Например, гаплотипы H_06 и H_07 [21], распространенные в восточной части ареала дуба черешчатого и, несомненно, совпадающие с гаплотипами из нашего предыдущего исследования A-I и A-II [20], различались между собой по SNP только одной мутацией, в то время как по секвенированным фрагментам, использованным в настоящем исследовании, – семью мутациями, что означает необходимость значительного увеличения числа SNP для получения обоснованных филогеографических выводов. В крымско-кавказском регионе, где распространены гаплотипы “восточных” линий из работы Petit et al. [12], также нужны дополнительные маркеры. Выявленная в ходе исследования крымско-кавказских популяций дубов изменчивость пяти участков хпДНК (всего 49 мутаций) может быть использована для разработки новых наборов SNP для высокопроизводительного генотипирования.

Автор благодарит Л.И. Агафонова, И.Ю. Исакова, В.В. Корженевского, В.Л. Семерикова, Е.Г. Филиппова, Х.У. Алиева, И.А. Шанцера, П.А. Волкову за помощь в сборе образцов дуба, К.А. Паниковскую и С.М. Подергину за помощь в лабораторных анализах, рецензента работы за замечания и предложения.

Исследование выполнено 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 животных.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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
2. *Denk T., Grimm G.W., Manos P.S. et al.* An updated infrageneric classification of the oaks: Review of previous taxonomic schemes and synthesis of evolutionary patterns // Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus *Quercus* L. / Eds Gil-Pelegrin E., Peguero-Pina J.J., Sancho-Knapik D. Cham, Switzerland: Springer, 2017. V. 7. P. 13–38.
3. *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
4. *Тахтаджян А.Л.* Флористические области Земли. Л.: Наука, Ленингр. отд., 1978. 247 с.
5. Конспект флоры Кавказа: в 3 томах / Под ред. Кудряшовой Г.Л., Татанова И.В. СПб.; М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2012. Т. 3. Ч. 2. 623 с.
6. *Ена А.В.* Природная флора Крымского полуострова. Симферополь: Н. Оріанда, 2012. 232 с.
7. *Shatilova I., Mchedlishvili N., Rukhadze L., Kvavadze E.* The history of the flora and vegetation of Georgia (South Caucasus). Tbilisi: Georgian National Museum, Institute of Paleobiology, 2011. 200 p.
8. *Cordova C.E., Gerasimenko N.P., Lehman P.H., Kliukin A.A.* Late Pleistocene and Holocene paleoenvironments of Crimea: pollen, soils, geomorphology, and geoarchaeology // Geology and Geoarchaeology of the Black Sea Region: Beyond the Flood Hypothesis / Eds Buynevich I.V., Yanko-Hombach V., Gilbert A.S., Martin R.E. Book series: Geological Society of America Special Paper. 2011. V. 473. P. 133–164. https://doi.org/10.1130/2011.2473(09)
9. *Меницкий Ю.Л.* Дубы Азии. Л.: Наука, 1984. 315 с.
10. *Семериков Л.Ф.* Популяционная структура древесных растений (на примере видов дуба европейской части СССР и Кавказа). М.: Наука, 1986. 140 с.
11. *Dumolin-Lapegue S., Demesure B., Fineschi S. et al.* Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent // Genetics. 1997. V. 146. № 4. P. 1475–1487.
12. *Petit R.J., Csaikl U.M., Bordacs S. et al.* Chloroplast DNA variation in European white oaks – phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations // Forest Ecol. Management. 2002. V. 156. № 1–3. P. 5–26. https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00645-4
13. *Petit R.J., Brewer S., Bordacs S. et al.* Identification of refugia and postglacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence // Forest Ecol. Management. 2002. V. 156. P. 49–74. https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00634-X
14. *Bordacs S., Popescu F., Slade D. et al.* Chloroplast DNA variation of white oaks in northern Balkans and in the

Carpathian Basin // Forest Ecol. Management. 2002. V. 156. № 1–3. P. 197–209. https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00643-0

15. *Slade D., Skvorc Z., Ballian D. et al.* The chloroplast DNA polymorphisms of white oaks of section *Quercus* in the Central Balkans // Silvae Genetica. 2008. V. 57. № 4–5. P. 227–234. https://doi.org/10.1515/sg-2008-0035
16. *Curtu A.L., Softletea N., Toader A.V., Enescu M.C.* Leaf morphological and genetic differentiation between *Quercus robur* L. and its closest relative, the drought-tolerant *Quercus pedunculiflora* K. Koch. // Annals Forest Science. 2011. V. 68. № 7. P. 1163–1172. https://doi.org/10.1007/s13595-011-0105-z
17. *Moldovan I.C., Softletea N., Curtu A.L. et al.* Chloroplast DNA diversity of oak species in Eastern Romania // Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 2010. V. 38. Iss. 3. P. 302–307.
18. *Ekhvaia J., Simeone M.C., Silakadze N., Abdaladze O.* Morphological diversity and phylogeography of the Georgian durmast oak (*Q. petraea* subsp *iberica*) and related Caucasian oak species in Georgia (South Caucasus) // Tree Genet. Genom. 2018. V. 14. № 2. https://doi.org/10.1007/s11295-018-1232-6
19. *Tekpinar A.D., Aktas C., Kansu C. et al.* Phylogeography and phylogeny of genus *Quercus* L. (Fagaceae) in Turkey implied by variations of trnT((UGU))-L-(UAA)-F ((GAA)) chloroplast DNA region // Tree Genet. Genom. 2021. V. 17. Iss. 5. https://doi.org/10.1007/s11295-021-01522-x
20. *Семерикова С.А., Исаков И.Ю., Семериков В.Л.* Изменчивость хлоропластной ДНК и филогеография дуба черешчатого *Quercus robur* L. в восточной части ареала // Генетика. 2021. Т. 57. № 1. С. 56–71. https://doi.org/10.31857/S0016675821010136
21. *Degen B., Yanbaev Y., Mader M. et al.* Impact of gene flow and introgression on the range wide genetic structure of *Quercus robur* (L.) in Europe // FORESTS. 2021. V. 12. Iss. 10. https://doi.org/10.3390/f12101425
22. *Simeone M.C., Piredda R., Papini A. et al.* Application of plastid and nuclear markers to DNA barcoding of Euro-Mediterranean oaks (*Quercus*, Fagaceae): problems, prospects and phylogenetic implications // Bot. J. Linn. Soc. 2013. V. 172. Iss. 4. P. 478–499. https://doi.org/10.1111/boj.12059
23. *Piredda R., Simeone M.C., Attimonelli M. et al.* Prospects of barcoding the Italian wild dendroflora: oaks reveal severe limitations to tracking species identity // Mol. Ecol. Resources. 2011. V. 11. Iss. 1. P. 72–83. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02900.x
24. *Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.* Universal primers for amplification of 3 non-coding regions of chloroplast DNA // Plant Mol. Biology. 1991. V. 17. № 5. P. 1105–1109. https://doi.org/10.1007/BF00037152
25. *Demesure B., Sodzi N., Petit R.J.* A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants // Mol. Ecol. 1995. V. 4. № 1. P. 129–131. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00201.x
26. *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
27. *Hall T.A.* BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp. Series. 1999. V. 41. P. 95–98.
28. *Ronquist F., Huelsenbeck J.P.* MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. № 12. P. 1572–1574. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180
29. *Swofford D.L.* PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.0 beta10. Sunderland: Sinauer Associates, Massachusetts, 2002.
30. *Семерикова С.А., Исаков И.Ю., Семериков В.Л.* Изменчивость хлоропластной ДНК отражает историю *Tilia cordata* s. l. в восточной части ареала // Генетика. 2020. Т. 56. № 2. С. 188–200. https://doi.org/10.1134/S0016675820020113
31. https://quercusportal.pierroton.inra.fr/index.php?p=GENOMIC_SEQ
32. *Sork V.L., Fitz-Gibbon S.T., Puiu D. et al.* First draft assembly and annotation of the genome of a California endemic oak *Quercus lobata* Nee (Fagaceae) // G3: Genes Genomes Genetics. 2016. V. 6. № 11. P. 3485–3495. https://doi.org/10.1534/g3.116.030411
33. *Pham K.K., Hipp A.L., Manos P.S., Cronn R.C.* A time and a place for everything: Phylogenetic history and geography as joint predictors of oak plastome phylogeny // Genome. 2017. V. 60. № 9. P. 720–732. https://doi.org/10.1139/gen-2016-0191
34. *Librado P., Rozas J.* DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187
35. *Deguilloux M.F., Dumolin-Lapegue S., Gielly L. et al.* A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus* // Mol. Ecol. Notes. 2003. V. 3. № 1. P. 24–27. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00339.x
36. *Simeone M.C., Grimm G.W., Papini A. et al.* Plastome data reveal multiple geographic origins of *Quercus* Group Ilex // Peer. J. 2016. V. 4. Article number 40e1897. https://doi.org/10.7717/peerj.1897
37. *Curtu A.L., Gailing O., Finkeldey R.* Evidence for hybridization and introgression within a species-rich oak (*Quercus* spp.) community // BMC Evolutionary Biology. 2007. V. 7. Article number 218. https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-218
38. *Degen B., Blanc-Jolivet C., Bakhtina S. et al.* Applying targeted genotyping by sequencing with a new set of nuclear and plastid SNP and indel loci for *Quercus robur* and *Quercus petraea* // Conserv. Genet. Resour. 2021. V. 13. P. 345–347. https://doi.org/10.1007/s12686-021-01207-6

Chloroplast DNA Markers on the Phylogeography Study of Roburoid Oaks (*Quercus* L. sect. *Quercus*, Fagaceae) in the Crimean-Caucasian Region

S. A. Semerikova*

Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Science, Ekaterinburg, 620144 Russia
**e-mail: s.a.semerikova@ipae.uran.ru*

The variability of five fragments of chloroplast DNA (ASq, CDq, TFq, *trn*H-*psb*A and *trn*K-*mat*K) with a total length of more than 10,000 bp in three species of roburoid oaks of the Crimean-Caucasian region (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*) was studied. A total of 11 haplotypes were found in 290 individuals from 20 populations, 10 of which differed from the haplotypes of the main range. The obtained results show a pronounced structure of the geographical distribution of haplotypes of roburoid oaks in the Crimea and the Caucasus, and the chloroplast haplotypes of the region belong to several divergent phylogenetic lines. A comparison with data from other studies was carried out, with an assessment of the degree of effectiveness of the use of various chloroplast fragments and markers. The isolated phylogenetic position of the haplotypes of the Crimean-Caucasian populations and deep differences from the haplotypes of the main area allows us to conclude that robouroid oaks have historically been isolated for a long time in the Caucasus and Crimea. At the same time, the presence of common haplotypes indicates closer historical ties between the Crimean-Caucasian populations with Asia Minor and the Balkans. All haplotypes are identified by three fragments (ASq, CDq and TFq), with a sufficient level of variability and suitable for solving problems of oak phylogeography in the Crimean-Caucasian region. The *trn*H-*psb*A and *trn*K-*mat*K markers had a low level of variability and did not reveal additional haplotypes. Optimized genotyping options have been proposed, including both step by step sequencing, and a combination of analysis of chloroplast DNA microsatellite loci (cpSSR), restriction analysis (PCR-RFLP), and sequencing. To assess the variability of markers in a larger taxonomic range, representatives of other sections of the genus *Quercus* were included in the analysis. It was shown that the oak-specific primers proposed for ASq, CDq, and TFq fragments are suitable for species of other sections.

Keywords: *Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, Caucasus, Crimea, cpDNA variation, molecular markers, cpSSR, PCR-RFLP, phylogeography, population structure.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 65–79

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 633.111.1:575.167:631.412:631.523.4:575.116

ВЛИЯНИЕ ВНЕСЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ИЗВЕСТКОВОГО МЕЛИОРАНТА В ПОЧВУ НА КАРТИРОВАНИЕ QTL У ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.)

© 2023 г. Ю. В. Чесноков[1, *], М. А. Фесенко[1], А. И. Иванов[1], Д. В. Русаков[1], Н. В. Кочерина[1], У. Ловассер[2], А. Бёрнер[2]

[1]*Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, 195220 Россия*

[2]*Лейбниц-Институт генетики растений и исследования возделываемых культур, Гатерслебен, 06466 Германия*

**e-mail: yuv_chesnokov@agrophys.ru*

Поступила в редакцию 04.03.2022 г.
После доработки 01.04.2022 г.
Принята к публикации 12.04.2022 г.

В работе впервые проведено картирование локусов количественных признаков (QTL, quantitative trait loci) у яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при внесении в почву различных доз известкового мелиоранта – сыромолотого доломита в полевых условиях с целью выявления и идентификации генетических детерминант, определяющих эколого-генетическое взаимодействие "генотип–среда" у рекомбинантных инбредных линий этой культуры. В результате проведенных исследований было оценено 29 хозяйственно ценных признаков и в общей сложности картировано 150 QTL. Достоверность взаимосвязи между идентифицированными QTL и полиморфизмом по каждому изученному признаку устанавливали на основе пороговых значений отношения правдоподобия логарифма шансов LOD-score (logarithm of odds). Установлено, что при внесении в почву половинной и полной доз мелиоранта QTL, определяющие проявление 14 изученных признаков меняли свое местоположение на группах сцепления в зависимости от внесенной дозы сыромолотого доломита, а QTL 15 признаков оставались стабильными и не меняли установленную в экспериментах локализацию на хромосомах. Проведенные корреляционный и однофакторный дисперсионный анализы позволили установить характер сопряженности связи между признаками и дозой внесенного известкового мелиоранта. При проведении математических расчетов применяли критерий максимального правдоподобия и статистические критерии оценки значимости результатов. Полученные результаты представляют интерес для последующего изучения эколого-генетических механизмов реализации изученных признаков и управления ростом, развитием и продуктивностью у яровой мягкой пшеницы, и установления триггерных механизмов действия мелиоранта на физиологическое состояние растений.

Ключевые слова: Triticum aestivum L., различные дозы известкового мелиоранта, хозяйственно ценные признаки, картирование QTL, статистический анализ.

DOI: 10.31857/S0016675823010034, **EDN:** CLKKGN

Картирование локусов количественных признаков (**QTL**, quantitative trait loci) на сегодняшний день является одним из основных методов установления эколого-генетической активности генома растительных организмов в полевых условиях. Одними из первых в этом направлении были проведены работы американскими учеными, которые установили, что позиции QTL могут не оставаться стабильными, особенно в условиях эффекта воздействия окружающей среды. Так, с помощью картирующей популяции томата F_2, которую выращивали в трех различных экологических точках было выявлено 29 QTL. Необходимо отметить, что 15 из идентифицированных QTL были специфичны лишь для какой-то одной из трех экологических точек и лишь пять оказались идентичными для всех трех географических точек проведения экспериментов [1]. Аналогичный эффект взаимодействия "генотип-среда" был выявлен в опытах, проведенных на кукурузе, которую выращивали в шести различных экологических точках [2]. Выявленная пропорция картированных общих QTL в данном случае была несколько выше. Китайские ученые посредством 537 RFLP- и 54 SSR-маркеров смогли идентифицировать 150 генов, которые различались у двух сортов риса. В общей сложности ими было картировано 32 различных QTL. Однако всего лишь 12 локусов проявляли себя в оба года проведения экспериментов (1994–1995), а 20 локусов исследователи смогли выявить либо только в первый, либо только во второй год [3]. Несколько позже немецкие исследователи

провели серию экспериментов, направленных на выявление QTL в ростовых камерах, в теплицах и в различных эколого-географических регионах Германии в полевых условиях [4]. В результате было установлено, что один и тот же признак в различных условиях выращивания может детерминироваться различными локусами на разных хромосомах.

В наших экспериментах [5], проведенных в 2005 г. в двух различных эколого-географических точках Российской Федерации, с помощью рекомбинантных инбредных линий картирующей популяции яровой мягкой пшеницы было установлено, что в различных эколого-географических условиях выращивания меняется локализация QTL, определяющего проявление одного и того же количественного признака. Такое перераспределение QTL на группах сцепления показывает, что смена лим-фактора окружающей среды в различных условиях произрастания может влечь за собой смену спектра локусов хромосом, детерминирующих проявление генотипической изменчивости признака. Необходимо отметить, что полученные нами результаты хорошо согласовывались с данными, полученными немецкими коллегами, полученными ими в условиях Германии [4], а также с аналогичного рода экспериментальными данными американских исследователей [1, 2].

В последующем нами были проведены эксперименты по картированию QTL по идентификации и картированию QTL хозяйственно ценных признаков у яровой мягкой пшеницы (*T. aestivum*) в градиенте доз азотного питания в полевых [6] и строго контролируемых условиях агроэкобиополигона [7], а также у линий удвоенных гаплоидов картирующих популяций двудольных растений *Brassica rapa* L. в поле, в теплице [8] и в контролируемых условиях агроэкобиополигона [9]. Однако на сегодняшний день не было проведено ни одного эксперимента, в котором изучалось эколого-генетическое влияние известкования кислых дерново-подзолистых почв на рост и развитие растений и установление генетических детерминантов, определяющих проявление хозяйственно значимых признаков при внесении различных доз химических мелиорантов в условиях поля.

Цель настоящей модельной работы – определение возможности установления количества и выявления точной локализации локусов хромосом (QTL), вовлеченных в физиолого-генетический процесс реализации сложных агрономически значимых признаков у яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), проявляющих себя в полевых условиях в отсутствие и при внесении различных доз сыромолотого доломита в качестве известкового мелиоранта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований. В качестве материала исследований использовали 114 рекомбинантных инбредных линий картирующей популяции ITMI яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и их родительские формы. Подробности создания картирующей популяции ITMI описаны ранее [4, 6].

Анализ признаков. Во всех вариантах опыта высевали по 25 семян каждой линии в двух повторностях и анализировали 29 различных признаков на протяжении всего периода вегетации (табл. 1). Анализ признаков проводили по методикам [10] в трех повторностях. При проведении экспериментов рассматривали только те признаки, которые проявляли достаточную для проведения оценки экспрессивность.

Условия выращивания. Анализ признаков у линий картирующей популяции проводили на экспериментальных полях Меньковского филиала ФГБНУ “Агрофизический научно-исследовательский институт” (ФГБНУ АФИ) (д. Меньково, Гатчинский р-н, Ленинградская обл. 59.42° с.ш., 30.03° в.д.). Почва опыта дерново-слабоподзолистая легкосуглинистая (содержание физической глины 21.2%) на опесчаненном моренном суглинке, подстилаемом озерно-ледниковым песком.

Физико-химические и агрохимические свойства: pH_{KCl} – 4.30 ± 0.19, Нг. – 5.61 ± 0.14 смоль(экв)/кг, $S_{обм}$ – 3.13 ± 0.12 смоль(экв)/кг, $CaO_{обм}$ – 2.37 ± ± 0.11 смоль(экв)/кг, $MgO_{обм}$ – 0.65 ± 0.04 смоль(экв)/кг, содержание $C_{орг}$ – 1.91 ± 0.05%, $N_{лг}$ – 98 ± 6 мг/кг, $P_2O_{5подв}$ – 214 ± 8 мг/кг, $K_2O_{подв}$ – 72 ± 5 мг/кг. По комплексу физико- и агрохимических свойств почва слабоокультуренная, деградированная, сильнокислая, ненасыщенная основаниями (степень насыщенности основаниями 36%), слабообеспеченная подвижным калием, высоко – легкогидролизуемым азотом и подвижным фосфором.

Модельный эксперимент включал в себя три варианта опытов, проводившихся одновременно на одном участке поля, и различавшихся друг от друга дозой внесения известкового мелиоранта. Первый вариант – контроль, представлял собой опыт без внесения мелиоранта. Второй вариант – опыт, при котором вносилось 0.5 Нг. мелиоранта. Третий вариант – опыт, при котором вносилось 1 Нг. мелиоранта. В качестве известкового мелиоранта использовался сыромолотый доломит производства ООО “Торговый дом “Доломит” (г. Гатчина, Ленинградская обл.). Он обладал влажностью 1.8%, содержанием действующего вещества 94%, нейтрализующей способностью 86%. Его доза в физическом весе в вариантах 0.5 и 1 Нг. составляла 5 и 10 т/га. При закладке опыта известковый мелиорант (по указанным вариантам опыта) вносился под вспашку (глубина 22 см). Дополнительно, для оптимизации питания расте-

Таблица 1. QTL, выявленные у картирующей популяции ITMI в условиях д. Меньково Ленинградской обл. при внесении различных доз мелиоранта (М)

Признак	Символ	Опыт**									Всего*
		0 М	LOD	R^2	1/2 М	LOD	R^2	1 М	LOD	R^2	
Продолжительность посев–всходы	*PSS****	7D (*151.9*)	2.34	18.43	3B (171.9)	2.45	17.43	3B (171.9)	2.69	18.94	**0** + 6 + 0
		1A (38.0)	2.22	14.54	2B (*216.9*)	2.26	17.21	2B (*216.9*)	2.18	16.68	
Продолжительность всходы–кущение	*VST****	1A (158.5)	1.95	12.72	6D (30.5)	2.82	11.55	6D (30.5)	2.38	9.83	**0** + 2 + 1
Продолжительность всходы–колошение	*VSH****	3D (*170.8*)	2.28	13.96	7B (341.3)	2.99	18.59	5D (130.8)	2.40	9.32	**0** + 7 + 0
		7B (341.3)	2.19	13.98	3D (*111.0*)	2.68	16.36	7B (377.0)	2.29	14.36	
								3D (*170.8*)	2.28	13.92	
Форма куста	*TS*	1A (205.7)	2.14	17.29	1A (205.7)	2.14	17.29	1A (205.7)	2.14	17.29	**0** + 9 + 0
		3A (56.3)	2.14	17.29	3A (56.3)	2.14	17.29	3A (56.3)	2.14	17.29	
		5A (*89.0*)	2.13	8.45	5A (*89.0*)	2.13	8.45	5A (*89.0*)	2.13	8.45	
Высота растения	*PH****	4A (*63.2*)	2.69	19.85	4A (*90.5*)	3.01	12.06	4A (*63.2*)	3.53	25.18	**3** + 3 + 0
		4A (*120.7*)	2.49	9.57	4A (*120.7*)	3.06	11.64	6A (101.9)	2.91	11.19	
Длина верхнего (колосоносного) междоузлия	*StLuI****	5A (230.9)	2.34	14.49	6A (101.9)	3.57	13.52	2A (*7.4*)	2.16	26.00	**1** + 5 + 0
		2D (*190.3*)	2.23	9.75	3D (*9.7*)	2.40	15.03	3A (*6.7*)	2.22	8.94	
Стеблевой узел – размер	*StNS****	7D (151.9)	2.23	17.62	3B (*171.9*)	2.69	18.93	7A (*158.5*)	2.26	14.80	**0** + 6 + 0
		3D (*213.5*)	2.09	16.92	6A (88.8)	2.00	15.17	7A (6.6)	2.19	9.43	

Таблица 1. Продолжение

Признак	Символ	Опыт**									Всего*
		0 M	LOD	R^2	1/2 M	LOD	R^2	1 M	LOD	R^2	
Положение флагового листа в начале колошения	*LFP*	7A (84.7)	2.08	15.95	7A (84.7)	2.08	15.95	7A (84.7)	2.08	15.95	**0** + 3 + 0
Ширина флагового листа	*LFW****	1D (*128.7*)	2.52	10.94	5D (130.8)	3.09	11.83	7D (95.1)	3.47	20.66	**2** + 5 + 0
		7D (283.1)	2.33	14.38	1B (*202.1*)	2.60	10.69	1B (*229.3*)	2.66	17.94	
								1D (*128.7*)	2.49	10.83	
Лист – окраска лигулы	*LLC*	7A (*317.2*)	3.33	19.66	7A (*317.2*)	3.33	19.66	7A (*317.2*)	3.33	19.66	**6** + 0 + 0
		7D (*279.3*)	3.18	20.74	7D (*279.3*)	3.18	20.74	7D (*279.3*)	3.18	20.74	
Характер цветения	*ChF*	6B (175.2)	2.74	16.71	6B (175.2)	2.74	16.71	6B (175.2)	2.74	16.71	**0** + 3 + 0
Устойчивость к мучнистой росе, баллы	*PMRb*	6A (*32.3*)	3.30	12.67	6A (*32.3*)	3.30	12.67	6A (*32.3*)	3.30	12.67	**3** + 3 + 0
		2B (197.5)	2.65	16.00	2B (197.5)	2.65	16.00	2B (197.5)	2.65	16.00	
Восковой налет на внутренней стороне листа	*LWBi*	7B (*250.5*)	3.02	21.67	7B (*250.5*)	3.02	21.67	7B (*250.5*)	3.02	21.67	**3** + 0 + 0
Восковой налет на внешней стороне листа	*LWBo*	2D (*300.0*)	2.53	10.04	2D (*300.0*)	2.53	10.04	2D (*300.0*)	2.53	10.04	**0** + 3 + 0
Восковой налет на стебле	*StWB*	2D (*300.0*)	16.01	48.85	2D (*300.0*)	16.01	48.85	2D (*300.0*)	16.01	48.85	**3** + 0 + 0

Таблица 1. Продолжение

Признак	Символ	Опыт**									Всего*
		0 M	LOD	R^2	1/2 M	LOD	R^2	1 M	LOD	R^2	
Текстура колоса	*SpT****	5D (266.2)	3.51	26.70	5A (63.8)	3.70	21.60	3B (*160.2*)	2.43	14.80	**2** + 5 + 0
		4B (17.3)	2.98	27.85	4B (17.3)	2.09	20.51	5D (266.2)	2.14	17.23	
								5A (63.8)	2.12	13.01	
Восковой налет на колосе	*SpWB*	1D (*238.4*)	4.83	17.87	1D (*238.4*)	4.83	17.87	1D (*238.4*)	4.83	17.87	**9** + 0 + 0
		2D (*300.0*)	3.72	14.43	2D (*300.0*)	3.72	14.43	2D (*300.0*)	3.72	14.43	
		7D (*151.9*)	3.25	24.63	7D (*151.9*)	3.25	24.63	7D (*151.9*)	3.25	24.63	
Форма колоса	*SpS****	2D (104.0)	2.12	15.99	2D (0.0)	2.33	14.24	2D (0.0)	2.33	14.24	**0** + 4 + 2
		4B (129.3)	1.64	6.57	2A (10.6)	2.12	14.39	7B (341.3)	1.56	10.04	
Ломкость колоса	*SpBR*	3D (*111.0*)	3.00	19.17	3D (*106.0*)	4.73	18.57	3D (*145.6*)	3.69	15.08	**3** + 0 + 0
Длина колоса	*SpL*	4A (*120.7*)	5.54	20.05	4A (*87.5*)	4.66	17.45	4A (*124.4*)	4.78	18.76	**3** + 2 + 0
					5D (209.5)	2.96	11.37	5D (209.5)	2.96	11.35	
Форма колосковой/ цветковой чешуи	*GS****	7D (267.3)	2.59	16.55	1A (176.6)	2.17	10.00	1A (192.8)	1.97	8.45	**0** + 2 + 1
Окончание зубца колосковой чешуи	*GBS*	3A (66.5)	1.58	8.61	3A (66.5)	1.67	9.05	3A (66.5)	1.55	8.52	**0** + 0 + 3
Окраска зерновки	*KC*	3D (*88.2*)	7.45	27.43	3D (*88.2*)	8.65	30.85	3D (*84.9*)	6.57	35.91	**5** + 1 + 0
		3B (52.2)	3.32	20.94	3B (52.2)	3.65	22.17	3B (52.2)	2.99	18.57	

Таблица 1. Окончание

Признак	Символ	Опыт**									Всего*
		0 M	LOD	R^2	1/2 M	LOD	R^2	1 M	LOD	R^2	
Число колосьев	*NStS****	5A (*74.4*)	2.15	8.46	7D (273.0)	2.24	13.88	4A (206.5)	2.89	12.95	**0** + 3 + 0
Число колосков в колосе	*NSpt****	4A (*120.7*)	4.84	17.77	4A (*90.5*)	2.85	11.43	4A (*120.7*)	4.32	16.02	**2** + 4 + 1
		7A (*69.5*)	2.98	19.27	5A (*37.4*)	1.97	13.23	7D (75.7)	2.18	13.54	
								5A (*28.8*)	2.16	13.79	
Число зерен в колосе	*NSeSp****	3B (*146.5*)	2.30	9.41	3B (*146.5*)	2.69	10.94	3B (*146.5*)	2.52	10.29	**0** + 6 + 0
		5A (154.6)	2.06	8.72	5A (*28.8*)	2.77	17.34	2D (271.3)	2.09	25.30	
Масса 1000 зерен	*TGW****	6A (27.1)	2.43	17.27	6A (101.9)	3.88	14.64	6A (101.9)	2.63	10.17	**1** + 4 + 1
		5A (47.3)	1.92	7.74	2A (*239.2*)	2.41	18.58	2A (*25.7*)	2.62	16.06	
Стекловидность зерна	*GrT*	5D (319.6)	4.94	29.17	5D (319.6)	4.00	23.73	5D (319.6)	4.55	26.52	**3** + 3 + 0
		6A (32.3)	2.77	11.32	7B (*270.8*)	2.17	8.93	7B (*270.8*)	2.46	10.15	
Трудность обмолота	*DifThC*	2D (250.3)	3.61	22.59	2D (255.1)	8.19	43.06	2D (255.1)	6.94	37.92	**3** + 0 + 0
Всего			**16** + 28 + 4			**20** + 27 + 2			**16** + 34 + 3		**52** + 89 + 9 = 150

Примечание. * – полужирный шрифт – основные QTL (LOD ≥ 3), с подчеркиванием – сильные QTL (3 > LOD ≥ 2), нормальный шрифт – минорные QTL (2 > LOD ≥ 1); ** – в круглых скобках под номером хромосомы (приведены с соответствующим буквенным обозначением) указана дистанция на данной хромосоме (курсивом – QTL привнесен материнской формой Opata 85, обычным шрифтом – QTL привнесен отцовской формой Synthetic); R^2 – процент фенотипической изменчивости, определяемый данным QTL; референтные карты приведены в [13]; *** – признаки, не проявляющие стабильность в идентификации их локализации на группах сцепления.

ний пшеницы в начале вегетации, вносили полное фоновое минеральное удобрение в дозе $N_{66}P_{48}K_{48}$, которое под предпосевную обработку почвы вносили дисковым лущильником ЛДГ-3 (глубина 11 см). Для этого использовалось комплексное удобрение экофоска с содержанием NPK 14 : 12 : 12 производства ООО "ПГ "Фосфорит" (Кингисеппский р-н, Ленинградская обл.).

Статистический анализ. QTL-анализ выполняли с помощью компьютерной программы QGENE [11] как это было описано ранее [4, 6]. При локализации QTL были использованы только те маркеры, которые соответствовали функции картирования по D.D. Kosambi [12]. Полученные данные по фенотипическому анализу интегрировали в существующую базовую карту, созданную для популяции ITMI [11, 13]. Достоверность взаимосвязи между выявленными локусами и полиморфизмом по тому или иному признаку оценивали на основе порогового значения логарифма шансов LOD-score (logarithm of odds) [14–16]. Для каждого признака проводился отдельный QTL-анализ. Во внимание принимались только локусы с LOD ≥ 3.0 ($p < 0.001$), 3.0 > LOD ≥ 2.0 ($p < 0.01$); и 2.0 > LOD ≥ ≥ 1.0 ($p < 0.05$) [17].

Для установления степени связи между каждым из количественных признаков растений и содержанием известкового мелиоранта в структуре почве, а также попарно между каждым из количественных признаков растений по каждому опыту высчитывали коэффициенты корреляции r, критерием проверки значимости которых являлось отношение r к своей ошибке с помощью t-критерия Стьюдента. При этом значения коэффициентов корреляции $r < 0.3$ считали слабыми, в промежутке от 0.3 до 0.69 – умеренными, а при $r \geq$ ≥ 0.7 – сильными [18]. Для нахождения влияния регулируемого фактора – градации внесения мелиоранта в структуру почвы, на результативные количественные признаки растений проводили дисперсионный анализ – комплексную оценку сравниваемых средних значений признаков с расчетом показателей варьирования, в частности дисперсии, их отношения F, а также значимости результатов [19]. Достоверность результатов ($p <$ < 0.05) определялась допустимой границей статистической значимости, т. к. этот уровень включает в себя вероятность ошибки 5%. Все расчеты проводились с использованием программы STATISTICA v.12.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных экспериментов было установлено, что каждый из таких признаков как продолжительность периодов посев–всходы, всходы–кущение и всходы–колошение контролировали различные локусы хромосом в зависимости от того вносился или нет мелиорант (табл. 1). Так, например продолжительность периода посев–всходы в опыте без внесения мелиоранта контролировалась локусами на 7D- и 1A-группах сцепления, а при внесении половинной и полной дозы мелиоранта – локусами на хромосомах 3B и 2B. Следует заметить, что для вариантов и с половинной, и с полной дозой мелиоранта месторасположение локусов, определяющих проявление данного признака, оставалось стабильным. Процент фенотипической изменчивости проявления данного признака, определяемый выявленными локусами, варьировал от 14.54% в случае хромосомы 1A до 18.94% в случае хромосомы 3B. Такая же тенденция наблюдалась и в случае признаков продолжительности периодов всходы-кущение и всходы-колошение (табл. 1). Обращает на себя внимание тот факт, что для признака продолжительность периода всходы-колошение наблюдалось некоторое увеличение количества выявленных локусов хромосом, определяющих данный признак в случае внесения полной дозы мелиоранта. Добавлялся локус на группе сцепления 5D, месторасположение локуса на хромосоме 3D было таким же, как и в случае отсутствия внесения мелиоранта. Процент фенотипической изменчивости для признака продолжительность периода всходы-кущение варьировал от 9.93 до 12.72%, а для признака продолжительность периода всходы-колошение – от 9.32 до 18.99%.

Еще четыре признака, обусловливающие продуктивность зеленой массы, – высота растения, длина верхнего (колосоносного) междоузлия, размер стеблевого узла и ширина флагового листа – также проявили нестабильность локализации выявленных на группах сцепления QTL, определяющих проявление этих признаков. Так, например проявление признака высоты растения, хотя и определяется практически во всех вариантах опыта локусами 4A хромосомы, однако локализация на данной группе сцепления для него различается в зависимости от уровня известкования. И это несмотря на то, что гены, определяющие данный признак на 4A хромосоме, образуют кластер, а их пенетрантность зависит от уровня внесения мелиоранта. Процент фенотипической изменчивости проявления признака высоты растений варьировал от 9.57 до 25.18%, а значение LOD – от 2.49 до 3.53.

Проявление признака "ширина флагового листа" также зависела от внесения мелиоранта и определялась QTL, идентифицированных на 1D, 1B, 5D и 7D группах сцепления. Интересно то, что локализация выявленных QTL для данного признака без внесения и внесения полной дозы мелиоранта были практически одинаковыми, за исключением QTL на 1B хромосоме. Локус, выявленный на 1B хромосоме, был установлен для данного признака и в случае внесения половинной дозы мелиоранта, что на наш взгляд говорит

о некотором переходном варианте проявления признака “ширины флагового листа” при внесении различных доз мелиоранта. Значения LOD варьировали от 2.33 до 3.47, а процент фенотипической изменчивости – от 10.69 до 20.66%.

Признаки “длина верхнего (колосоносного) междоузлия” и “размер стеблевого узла” не проявляли подобного рода вариации. Во всех вариантах эксперимента они имели разную локализацию QTL, выявленных на различных группах сцепления. Показатели LOD-оценки и значения процентов фенотипической изменчивости как для длины верхнего (колосоносного) междоузлия, так и размера стеблевого узла также варьировали. Причем для признака длины верхнего (колосоносного) междоузлия максимуму LOD (3.57) соответствовало не самое высокое значение фенотипической изменчивости (13.52%). Такое же явление наблюдалось и для признака размера стеблевого узла, где минимальное значение процента фенотипической изменчивости (9.43%) соответствовало не самой низкой LOD-оценке (2.19).

Три признака, определяющих структурное состояние колоса, – текстура и форма колоса, а также форма колосковой/цветковой чешуи – также проявляли нестабильность локализации QTL, отвечающих за проявление этих признаков. Характер проявления текстуры колоса был схож с таковым у признаков: продолжительность периода всходы–колошение и ширина флагового листа. При этом самый высокий показатель LOD-оценки (3.70) QTL текстуры колоса коррелировал не с самым высоким значением фенотипического проявления данного признака (21.20%). И наоборот, самое низкое значение показателя LOD-оценки (2.09) соответствовало проценту фенотипического проявления данного признака равному 20.51%. Признаки форма колоса и форма колосковой/цветковой чешуи продемонстрировали более определенное проявление, которое выразилось в более стабильной смене расположения на группах сцепления локусов, определяющих проявление этих признаков как в вариантах с внесением, так и без внесения мелиоранта (табл. 1).

Группа признаков, отвечающих за структуру урожая, – число колосьев, число колосков в колосе, число зерен в колосе и масса 1000 зерен – также проявляли нестабильность месторасположения определяющих их QTL на группах сцепления во всех вариантах опыта. Так, например для признака число колосьев было выявлено три локуса на трех различных группах сцепления (5A, 7D и 4A), по одному для каждого варианта опыта. А для признака число колосков в колосе в дополнение к выявленным для числа колосьев локусов на трех различных группах сцепления (5A, 7D и 4A) в случае варианта опыта без внесения мелиоранта был выявлен еще один QTL на 7A группе сцепления. При этом QTL на 7A группе сцепления соответствовало максимальное значение процента фенотипической изменчивости для данного признака (19.27%) при LOD-оценке равной 2.98. Максимальная LOD-оценка для QTL-признака число колосков в колосе также соответствовала варианту опыта без внесения мелиоранта и была равна 4.82, что соответствовало 17.77% процентам фенотипической изменчивости.

Для признака число зерен в колосе были идентифицированы QTL на 3B, а также 5A и 2D хромосомах. QTL на группе сцепления 3B проявлял себя во всех трех вариантах опыта и позиция его оставалась стабильной, в то время как локус на 5A хромосоме был идентифицирован только в вариантах опыта без внесения и с внесением половинной дозы мелиоранта, причем месторасположения на самой 5A хромосоме в случае варианта без внесения (154.6 cM) отличалась от варианта с внесением половинной дозы мелиоранта (28.8 cM). Кроме того, каждый из этих локусов был привнесен различными родительскими формами (см. табл. 1). В случае варианта опыта с внесением полной дозы мелиоранта проявление признака числа зерен в колосе контролировалось QTL, идентифицированном на 2D хромосоме, и данный локус, также как и в случае варианта без внесения мелиоранта, был привнесен отцовской формой. Фенотипическая изменчивость данного признака варьировала от 8.72 до 25.30%, а LOD-оценка – от 2.06 до 2.77.

Проявление признака масса 1000 зерен было идентичным по своему характеру проявления признака число зерен в колосе. Для этого признака также было выявлено три QTL для трех вариантов опыта. Но если локус на 6A хромосоме был идентифицирован для всех трех вариантов эксперимента, то локус на 5A хромосоме был определен только в случае варианта без внесения мелиоранта, а локус на 2A хромосоме – в случае внесения как половинной, так и полной дозы мелиоранта. Следует отметить, что QTL на группе сцепления 2A различались по своему месторасположению. Так, в случае внесения половинной дозы мелиоранта местоположение идентифицированного QTL было 239.2 cM, а в случае внесения полной дозы – 25.7 cM. Оба QTL привнесены материнской формой. Все остальные локусы, определявшие проявление признака масса 1000 зерен были привнесены отцовским родителем. Обращает на себя также внимание то, что местоположение QTL на 6A хромосоме в случае варианта опыта без внесения мелиоранта (27.1 cM) отличается от вариантов с внесением как половинной, так и полной дозы (101.9 cM). Максимальная LOD-оценка для данного признака была равна 3.88, а максимальное значение процента фенотипической изменчивости, определяемое выявленными QTL – 18.58%.

Остальные 15 изученных нами признаков проявили стабильность локализации на хромосомах, идентифицированных для каждого из этих признаков локусов хромосом, определяющих пенетрантность данных признаков вне зависимости от внесения в почву мелиоранта. Стабильность для этих признаков отмечалась не только по количеству выявленных для каждого признака QTL, но и их распределения по группам сцепления. Исключение составляет только признак стекловидности зерна. Для этого признака помимо стабильного QTL на группе сцепления 5D были выявлены QTL на 6A хромосоме в случае варианта опыта без внесения мелиоранта, и на группе сцепления 7B в вариантах с внесением как половинной, так и полной дозы мелиоранта. Причем различия в месторасположении QTL, идентифицированного на группе сцепления 7B в вариантах опыта с внесением мелиоранта не наблюдалось.

Для определения статистической достоверности полученных результатов, а также для установления степени связи между каждым из количественных признаков растений и уровнем известкования проводили корреляционный анализ, который позволил установить признаки, проявление которых варьировало в зависимости от содержания известкового мелиоранта в почве (табл. 2). Однако все значимые корреляционные зависимости оказались в статистическом значении слабыми ($r < 0.3$). Как следует из данных в табл. 2, из 29 признаков всего три достоверно и положительно коррелировали с повышением дозы внесения мелиоранта в почву: признак высоты растения с коэффициентом корреляции $r = 0.21$, а также признаки ширины флагового листа и числа колосьев с $r = 0.11$. Такие признаки как продолжительность периода посев-всходы и масса 1000 зерен показали достоверную отрицательную связь с уровнем применения мелиоранта, характеризующуюся коэффициентом корреляции $r = -0.11$ и $r = -0.19$ соответственно.

Наши предположения достоверно подкрепляются и результатами однофакторного дисперсионного анализа о влиянии внесения в почву мелиоранта на проявление того или иного признака, кроме признака период продолжительности посев-всходы, который не показал достоверный результат в этом анализе (табл. 3). По итогам проведенных математических расчетов было выяснено, что из 29 признаков только четыре статистически значимо варьировали в зависимости от изменения физико-химического состояния почвы известковым мелиорантом. Как установлено ранее [19], значимость на уровне $p < 0.05$ указывает на то, что признаки с такими значениями p показывают изменчивость. Оставшиеся 25 изученных и рассмотренных нами признаков, у которых получившиеся уровни значимости (p) дисперсионного отношения (F) больше или равны 0.05, обладали постоянством, что указывает на физиолого-генетическую независимость проявления этих признаков от уровня известкования кислой дерново-подзолистой почвы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основным результатом проведенного нами модельного эксперимента явился тот факт, что изменение условий влияния или воздействия факторов внешней среды на такие физиолого-генетические показатели как рост и развитие растений, неизбежно приводит к изменению локализации идентифицированных на группах сцепления ряда QTL, определяющих проявление изучаемых хозяйственно ценных признаков. По нашему мнению, это говорит о влиянии условий выращивания на физиологическое состояние, а также рост и развитие растений, определяемых пулом QTL, детерминирующих проявление изучаемых признаков во взаимодействии “генотип–среда”.

Наряду с механизацией и химизацией мелиорация является важным фактором интенсификации сельскохозяйственного производства, способствуя оптимизации водного, воздушного, теплового, окислительно-восстановительного, кислотно-осно́вного и питательного режима почвы. Она снижает токсичность различных полютантов, поступающих в почву, формирует благоприятный микроклимат и, в конечном итоге, повышает эффективность взаимодействия “генотип–среда” [20].

Одна из самых распространенных – химическая мелиорация, основанная на физико-химическом воздействии на почву химических мелиорантов с целью формирования заданных параметров эффективного плодородия почвы [21], включает окультуривающие приемы известкования, фосфоритования, мелиоративного применения органических удобрений, способствующие оптимизации агрофизического, физико-химического и агрохимического состояний почвы [22]. Однако длительный отказ от необходимой химической мелиорации и появление негативных агроклиматических трансформаций окружающей среды существенно обострили проблемы деградации сельскохозяйственных земель [23, 24]. В результате более половины почв мирового пахотного фонда, в том числе и в Нечерноземной зоне России, остро нуждается в известковании, особенно, при возделывании требовательных к реакции почвенной среды культур, таких, например, как яровая пшеница [24, 25]. Характер детерминации потенциала продуктивности яровой пшеницы при известковании почв указывает на наличие целой серии требующих детального изучения особенностей [26, 27] эколого-генетических механизмов реализации взаимодействия “генотип–среда”, например установления молекулярно-физиологических

Таблица 2. Результаты корреляционного анализа

Символ признака*	r – коэф. корреляции	t-критерий	p – значимость
*PSS***	–0.11	–2.08	0.038
VST	0.04	0.73	0.468
VSH	0.03	0.52	0.604
TS	0.00	0.00	1.000
*PH***	0.21	3.88	0.000
StLuI	0.09	1.63	0.105
StNS	0.04	0.70	0.486
LFP	0.00	0.00	1.000
*LFW***	0.14	2.67	0.008
LLC	0.00	0.00	1.000
ChF	0.00	0.00	1.000
PMRb	0.00	0.00	1.000
SpL	0.08	1.42	0.157
*NStS***	0.14	2.55	0.011
NSpt	0.09	1.75	0.081
NSeSp	0.05	0.96	0.337
*TGW***	–0.19	–3.52	0.000
LWBi	0.00	0.00	1.000
LWBo	0.00	0.00	1.000
StWB	0.00	0.00	1.000
SpT	–0.04	–0.67	0.500
SpWB	0.00	0.00	1.000
SpS	0.01	0.24	0.813
SpBR	0.07	1.22	0.222
GS	0.01	0.17	0.866
GBS	0.00	0.00	1.000
KC	–0.04	–0.65	0.518
GrT	–0.03	–0.45	0.650
DifThC	0.07	1.27	0.204

* – расшифровка обозначений признаков дана в табл. 1.
** – признаки, проявляющие статистически значимое варьирование, в зависимости от условий выращивания в эксперименте (в отсутствии и при внесении половинной либо полной дозы мелиоранта в почву).

механизмов алюмотолерантности [28–30], устойчивости к кислотности почв [31, 32] и к другим неблагоприятным факторам окружающей среды с целью управления ростом, развитием и продуктивностью этой культуры в полевых условиях различных эколого-географических зон и регионов.

Взаимодействие “генотип–среда” является ключевым фактором в реализации эколого-генетического потенциала сельскохозяйственных растений. Эдафические факторы – это одно из составляющих такого взаимодействия. В нашей работе впервые был проведен модельный эксперимент

Таблица 3. Результаты однофакторного дисперсионного анализа по градиенту внесения известкового мелиоранта в почву

Символ признака*	Число степени свободы *d.f.*	Средний квадрат отклонений (дисперсия) *MS*	*F* – дисперсионное отношение	*p* – значимость	Остаточная вариация (ошибка)	
					d.f.	*MS*
PSS	2	10.70	2.95	0.054	339	3.63
VST	2	7.39	0.62	0.540	339	11.98
VSH	2	13.02	0.33	0.717	339	39.06
TS	2	0	0	1.000	339	0.66
*PH***	2	710.81	7.57	0.001	339	93.89
StLuI	2	46.50	1.86	0.158	339	25.07
StNS	2	0.00	0.32	0.724	339	0.00
LFP	2	0	0	1.000	339	1.94
*LFW***	2	0.22	3.74	0.025	339	0.06
LLC	2	0	0	1.000	339	1.01
ChF	2	0	0	1.000	339	3.66
PMRb	2	0	0	1.000	339	1.77
SpL	2	1.61	1.01	0.366	339	1.59
*NStS***	2	7.83	3.57	0.029	339	2.19
NSpt	2	11.97	2.40	0.092	339	4.99
NSeSp	2	42.25	0.48	0.619	339	88.06
*TGW***	2	388.41	6.42	0.002	339	60.49
LWBi	2	0	0	1.000	339	1.69
LWBo	2	0	0	1.000	339	1.48
StWB	2	0	0	1.000	339	8.04
SpT	2	0.54	0.30	0.739	337	1.80
SpWB	2	0	0	1.000	339	2.21
SpS	2	0.01	0.03	0.973	337	0.27
SpBR	2	4.26	0.77	0.463	319	5.51
GS	2	0.04	0.23	0.796	319	0.16
GBS	2	0.01	0.04	0.964	319	0.29
KC	2	0.09	0.43	0.648	320	0.20
GrT	2	0.13	0.23	0.796	319	0.57
DifThC	2	3.52	0.90	0.407	337	3.90

Примечание. * – расшифровка обозначений признаков дана в табл. 1; ** – признаки, проявляющие статистически значимое варьирование в зависимости от условий выращивания в эксперименте (в отсутствии и при внесении половинной либо полной дозы мелиоранта в почву).

по идентификации и установлению локализации на группах сцепления QTL, определяющих целый ряд хозяйственно ценных признаков, в условиях внесения половинной и полной дозы мелиоранта – сыромолотого доломита. Контролем служил опыт в котором в почву мелиорант не вносили. В результате проведенных анализов было установлено, что из 29 оцененных признаков только 14 выявленных и идентифицированных QTL меняли свои месторасположение и локализацию на группах сцепления при их выявлении. Остальные 15 оставались стабильными и не меняли свое месторасположение на группах сцепления вне зависимости от того вносилось или нет какое-либо количество мелиоранта в почву.

Ранее в наших экспериментах по установлению влияния факторов внешней среды на проявление хозяйственно ценных признаков у яровой мягкой пшеницы в контролируемых условиях агроэкосистемы было установлено, что изменение всего лишь одного или нескольких (но не всех) факторов физического воздействия экзогенного характера приводит к изменению месторасположения на группах сцепления некоторых изученных нами QTL в зависимости от изменения режима того или иного фактора экзогенного воздействия, что указывало на зависимость проявления изучаемых признаков и определяющих их проявление локусов хромосом от изменения данных режимов [7, 33]. Схожие результаты наблюдались и в других наших экспериментах [6, 8] или экспериментах зарубежных ученых [1, 2, 4], которые проводились в полевых условиях и/или условиях теплицы на одно- и двудольных растениях. Во всех этих экспериментах изменение условий внешней среды приводило к изменению месторасположения на группах сцепления QTL, определяющих проявление хозяйственно ценных признаков у различных сельскохозяйственных видов растений. В этой связи, как это вытекает из представленных в настоящем исследовании и литературных данных, спектр генов, определяющий среднюю величину и генетическую дисперсию того или иного хозяйственно ценного признака, как правило определяется лимитирующим фактором внешней среды. Смена определенного лимитирующего фактора неизбежно влечет за собой смену спектра локусов хромосом, обусловливающих проявление того или иного признака [5]. Следует заметить, что это правило не зависит от того, в каких условиях проявляет себя лимитирующий фактор – полевые, тепличные или строго контролируемые условия выращивания растений. Данный вывод позволяет подойти к установлению генетических механизмов управления ростом, развитием и продуктивностью растений, в том числе в практической селекции [34–36]. Картирование же QTL диффузного отражения листовой пластинки, определяющих содержание хлорофилла, отношение каротиноидов к хлорофиллу, фотохимическую активность фотосинтетического аппарата, содержание антоцианов, меру рассеяния света листом, а также площади листовой ассимилирующей поверхности и показателей продуктивности сельскохозяйственных культур [37] позволяет перейти посредством цифровизации показателей физиолого-генетических свойств и признаков к показателям цифрового съема и обработки информации физиологического состояния растений и посевов в on-line или off-line режиме как в полевых, так и в лабораторных условиях [34–36].

Основным эколого-генетическим выводом из полученных результатов можно считать не только установление наличия эффекта взаимодействия “генотип–среда”, но и выявление в геноме яровой мягкой пшеницы блоков коадаптированных генов и, вероятно, коадаптированных блоков генов, их взаимозависимой экспрессии и пенетрантности в ответ на изменение таких эдафических факторов среды как кислотность почв, что следует из полученных нами данных по месторасположению на группах сцепления некоторых локусов хромосом, определяющих проявление ряда изученных признаков, экспрессия которых зависит от внесения в почву мелиоранта. К таким признакам относятся например: продолжительность периода всходы-колошение (контролируется физиологической активностью блочных кластеров на 3D и 7B хромосомах), высота растения (4A), ширина флагового листа (1B, 1D, 7D), число колосков в колосе (4A, 5A), масса 100 зерен (2A, 6A) и некоторые другие.

Проведенные нами корреляционный и дисперсионный анализы позволили установить характер генетической изменчивости проявления признаков по вариантам опыта (табл. 2 и 3), т. е. влияние эффекта внесения известкового мелиоранта в почву, что подтверждает наши выводы о воздействии этого фактора изменчивости, включая его лимитирующий характер, на выраженность анализируемых нами признаков, проявивших склонность к смене своего месторасположения на группах сцепления при картировании QTL того или иного признака в зависимости от дозы внесения мелиоранта в почву.

Обращает на себя внимание и статистически относительно низкая для некоторых выявленных QTL LOD-оценка. Этот вопрос уже рассматривался нами в ряде наших работ [6, 16], и мы здесь останавливаться на нем не будем. Укажем только, что с биологической точки зрения наличие или отсутствие того или иного локуса/гена на хромосоме, в физическом смысле слова, является величиной постоянной, если только это не подвижный мобильный элемент или не произошла в процессе проведения эксперимента рекомбинация. Это означает, что с физико-биологической

точки зрения ген/локус хромосомы никуда деться не может, и как показывают полученные нами и другими исследователями данные [1, 2, 4–6, 8], как основные, так и минорные QTL располагались и располагаются в тех же позициях, в которых они находились и находятся вне зависимости какого-либо влияния на них каких-то экзогенных факторов воздействия. Относительно невысокая статистическая оценка любого рода может определяться либо недостаточностью полученных исходных данных для получения высокой статистической оценки первичных данных, либо иной статистической погрешностью, что никак не влияло и не влияет на физическое месторасположение изучаемых генов/локусов на группах сцепления, а только на статистическое математическое действие их выявления [6, 16].

Таким образом, нами впервые в рамках модельного эксперимента установлено и продемонстрировано влияние различных доз известкового мелиоранта на проявление целого ряда хозяйственно ценных признаков у яровой мягкой пшеницы. Проявление идентифицированных QTL может зависеть или не зависеть от того вносился или нет мелиорант в почву. Однако все изученные нами признаки взаимодействовали и с определенной статистической достоверностью коррелировали друг с другом. Отмечено, что картированные QTL могут на группах сцепления образовывать коадаптированные блоки, в которых могут находиться несколько локусов хромосом, определяющих проявление некоторых из изученных нами признаков. Полученные в настоящем исследовании результаты могут быть использованы для установления физиолого-генетических механизмов реализации изучаемых признаков с целью управления ростом, развитием и продуктивностью растений, в том числе сельскохозяйственной. Последующие полномасштабные эксперименты, как мы полагаем, позволят не только более полно установить этапы эколого-генетических механизмов взаимодействия “генотип–эдафические факторы среды”, но и триггерных механизмов действия мелиоранта на физиологическое состояние растений.

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. *Paterson A.H., Damon S., Hewitt J.D. et al.* Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments // Genetics. 1991. V. 127. P. 181–197. https://doi.org/10.1093/genetics/127.1.181
2. *Stuber C.W., Lincoln S.E., Wolff D.W. et al.* Identification of genetic factors contributing to heterosis in hybrid from two elite maize inbred using molecular marker // Genetics. 1992. V. 132. P. 823–839. https://doi.org/10.1093/genetics/132.3.823
3. *Allard R.W.* History of plant population genetics // Ann. Rev. Genet. 1999. V. 33. P. 1–27.
4. *Börner A., Schumann E., Furste A. et al.* Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 105. P. 921–936. https://doi.org/10.1007/s00122-002-0994-1
5. *Чесноков Ю.В., Почепня Н.В., Бёрнер А. и др.* Эколого-генетическая организация количественных признаков растений и картирование локусов, определяющих агрономически важные признаки у мягкой пшеницы // Доклады Академии наук. 2008. Т. 418. № 5. С. 693–696.
6. *Чесноков Ю.В., Гончарова Э.А., Почепня Н.В. и др.* Идентификация и картирование QTL физиолого-агрономических признаков яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в градиенте доз азотного питания // Сельскохозяйственная биология. 2012. № 3. С. 47–60.
7. *Чесноков Ю.В., Мирская Г.В., Канаш Е.В. и др.* Идентификация и картирование QTL у яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в контролируемых условиях агроэкобиополигона в отсутствии и при внесении азотного удобрения // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 1. С. 52–65. https://doi.org/10.7868/S0015330318010062
8. *Артемьева А.М., Соловьева А.Е., Кочерина Н.В. и др.* ДНК-маркированные линии двойных гаплоидов *Brassica rapa* L. и идентифицированные QTL, контролирующие хозяйственно ценные признаки для использования в селекции листовых капустных культур // Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 810. СПб: ВИР, 2012. 174 с.
9. *Egorova K.V., Sinyavina N.G., Artemyeva A.M. et al.* QTL analysis of the content of some bioactive compounds in *Brassica rapa* L. grown under light culture conditions // Horticulturae. 2021. V. 7(12). P. 583. https://doi.org/10.3390/horticulturae7120583
10. *Филатенко А.А., Шитова И.П.* Широкий унифицированный классификатор СЭВ рода *Triticum* L. Л.: ВИР, 1989. 44 с.
11. *Nelson J.C.* QGENE: Software for mapping–based genomic analysis and breeding // Mol. Bred. 1997. V. 3. P. 239–245. https://doi.org/10.1023/A:1009604312050
12. *Kosambi D.D.* The estimation of map distances from recombination values // Ann. Eugen. 1944. V. 12. P. 172–175. https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1943

13. *Ganal M.D., Röder M.S.* Microsattelite and SNP markers in wheat breeding // Genomics Assisted Crop Improvement: Genomics Applications in Crops / Eds Varshney R.K., Tuberosa R. Dordrecht, Germany: Springer, 2007. V. 2. P. 1–24.

14. *Morton N.E.* Sequential test for the detection of linkage // Am. J. Hum. Genet. 1955. V. 7. P. 277–318.

15. *Liu B.H.* Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis. London, New York, Washington: CRC Press, 1998. 611 p.

16. *Кочерина Н.В., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В.* Использование лод-оценки в картировании локусов количественных признаков у растений // Докл. РАСХН. 2011. № 3. С. 14–17.

17. *Lander E.S., Botstein D.* Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps // Genetics. 1989. V. 129. P. 185–199. https://doi.org/10.1093/genetics/121.1.185

18. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: "Высшая школа", 1990. 352 с.

19. *Фишер Р.Э.* Статистические методы для исследователей. М.: Госстатиздат, 1958. 267 с.

20. *Дубенок Н.Н.* Состояние и перспективы развития мелиорации земель в Российской Федерации // Мелиорация и водное хозяйство. 2017. № 2. Р. 27–31.

21. *Сычев В.Г., Аканова Н.И.* Современные проблемы и перспективы химической мелиорации кислых почв // Плодородие. 2019. № 1(106). Р. 3–7. https://doi.org/10.25680/S19948603.2019.106.01

22. *Иванов И.А., Иванов А.И., Цыганова Н.А.* Изменение свойств подзолистых и дерново-подзолистых почв на песчаных породах при окультуривании // Почвоведение. 2004. № 4. С. 489–499.

23. *Иванов А.И., Иванова Ж.А., Воробьёв В.А., Цыганова Н.А.* Агроэкологические последствия длительного применения дефицитных систем удобрения на хорошо окультуренных дерново-подзолистых почвах // Агрохимия. 2016. № 4. С. 10–17.

24. *Иванов А.И., Янко Ю.Г.* Мелиорация как необходимое средство развития сельского хозяйства нечерноземной зоны России // Агрофизика. 2019. № 1. С. 67–78. https://doi.org/10.25695/AGRPH.2019.01.09

25. *Сычев В.Г., Шафран С.А., Виноградова С.Б.* Плодородие почв России и пути его регулирования // Агрохимия. 2020. № 6. С. 3–13. https://doi.org/10.31857/S0002188120060125

26. *Литвинович А.В., Ковлева А.О., Хомяков Ю.В. и др.* Сортовая реакция яровой пшеницы на известкование при различных уровнях азотного питания // Агрохимия. 2017. № 5. С. 78–85.

27. *Litvinovich A., Pavlova O., Lavrishchev A. et al.* Dynamics of soil pH after utilization of by-products of industrial rock processing as a calcareous material in acid soils // Com. Soil Sci. Plant Anal. 2021. V. 52. P. 93–101. https://doi.org/10.1080/00103624.2020.1849267

28. *Abate E., Hussien S., Laing M., Mengistu F.* Aluminium toxicity tolerance in cereals: Mechanisms, genetic control and breeding methods // African J. Agricul. Res. 2013. V. 8(9). P. 711–722. https://doi.org/10.5897/AJARx12.003

29. *Gupta N., Gaurav S.S., Kumar A.* Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review // Am. J. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 21–37. https://doi.org/10.4236/ajps.2013.412A3004

30. *Ryan P.R.* Assessing the role of genetics for improving the yield of Australia's major grain crops on acid soils // Crop Past. Sci. 2018. V. 69. P. 242–264. https://doi.org/10.1071/cp17310

31. *Kochian L.V., Piñeros M.A., Liu J., Magalhaes J.V.* Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance // Ann. Rev. Plant Biol. 2015. V. 66. P. 571–598. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114822

32. *Li Q., Li A., Yu X., Dai T. et al.* Soil acidification of the soil profile across Chengdu Plain of China from the 1980s to 2010s // Sci. Total Env. 2020. V. 698. 134320. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134320

33. *Чесноков Ю.В., Мирская Г.В., Канаш Е.В. и др.* Картирование QTL у яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в контролируемых условиях агроэкобиополигона // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 1. С. 55–68. https://doi.org/10.7868/S0015330316060026

34. *Усков И.Б., Якушев В.П., Чесноков Ю.В.* Управление агробиологическими системами – физико-агрономические и генетико-селекционные аспекты (к 85-летию Агрофизического научно-исследовательского института) // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 3. С. 429–436. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.3.429rus

35. *Чесноков Ю.В.* Управление продукционным процессом посредством агрофизических, физиологических и молекулярно-генетических методов в системе точного земледелия // Матер. II Междунар. науч. конф. "Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего", посвященной памяти академика Е.И. Ермакова. СПб, 2–4 октября 2019. СПб: ФГБНУ АФИ. 2019. С. 8–19.

36. *Чесноков Ю.В.* QTL-анализ и управление продуктивностью растений в системе точного земледелия // Овощи России. 2020. № 4. С. 12–19. https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-4-12-19

37. *Чесноков Ю.В., Канаш Е.В., Мирская Г.В. и др.* Картирование QTL-индексов диффузного отражения листьев яровой гексаплоидной пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 1. С. 46–57 https://doi.org/10.1134/S0015330319010044

Influence of Application of Various Doses of Lime Immeliorant into the Soil on QTL Mapping in Spring Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.)

Yu. V. Chesnokov[a, *], M. A. Fesenko[a], A. I. Ivanov[a], D. V. Rusakov[a], N. V. Kocherina[a], U. Lohwasser[b], and A. Börner[b]

[a] *Agrophysical Research Institute, Saint-Petersburg, 195220 Russia*

[b] *Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Seeland, OT Gatersleben, 06466 Germany*

**e-mail: yuv_chesnokov@agrophys.ru*

In this work, quantitative trait loci (QTL) were mapped for the first time in spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) when various doses of a lime ameliorant, raw-milled dolomite, were introduced into the soil in order to reveal and identify genetic determinants that determine the ecological genetic interaction "genotype–environment" in recombinant inbred lines of this crop. As a result of the research, 29 economically valuable traits were evaluated and a total of 150 QTLs were mapped. The significance of the relationship between the identified QTLs and polymorphism for each studied trait was established based on the threshold values of the likelihood ratio of the logarithm of odds (LOD-score). It was found that when half and full doses of the ameliorant were applied to the soil, the QTLs that determine the manifestation of 14 studied traits changed their location on the linkage groups depending on the applied dose of raw ground dolomite, and the QTL of 15 traits remained stable and did not change the localization on the chromosomes established in the experiments. Conducted correlation and one-way analysis of variance made it possible to establish the nature of the conjugation of the relationship between the traits and the dose of the introduced lime ameliorant. When performing mathematical calculations, the maximum likelihood criterion and statistical criteria for assessing the significance of the results were used. The results obtained are of interest for the subsequent study of the ecological and genetic mechanisms of the realization of the studied traits and the control of growth, development and productivity in spring soft wheat, and the establishment of trigger mechanisms for the action of the ameliorant on the physiological state of plants.

Keywords: *Triticum aestivum* L., various doses of lime ameliorant, economically valuable traits, QTL mapping, statistical analysis.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 80–88

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 639.227.2

ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ АФРИКАНСКОЙ СКУМБРИИ *Scomber colias* Gmelin, 1789 (Scombridae) В ЦЕНТРАЛЬНО-ВОСТОЧНОЙ АТЛАНТИКЕ

© 2023 г. А. Н. Строганов[1], *, А. И. Никитенко[2], Т. А. Ракицкая[3], В. А. Беляев[4]

[1]*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра ихтиологии, Москва, 119234 Россия*

[2]*Филиал по пресноводному рыбному хозяйству Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) Московская обл., пос. Рыбное, 141821 Россия*

[3]*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*

[4]*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), Москва, 107140 Россия*

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

Поступила в редакцию 09.02.2022 г.
После доработки 01.04.2022 г.
Принята к публикации 12.04.2022 г.

Проведено исследование генетического разнообразия в группировках африканской скумбрии из акваторий Центрально-Восточной Атлантики на основании семи микросателлитных локусов. Все локусы были полиморфны, оценки ожидаемой гетерозиготности варьировали от 0.021 до 0.914. Для всех исследовавшихся выборок выявлен дефицит гетерозиготности, связанный с присутствием нуль-аллелей в четырех из семи исследовавшихся микросателлитных локусов. Получено низкое, но достоверное значение генетической дифференциации, рассчитанное по всем локусам ($\theta = 0.0052$), что предположительно, в том числе, может быть связано с нарушением панмиксии за счет формирования отдельных субпопуляций в результате неравномерного воздействия промысла в различных локальностях.

Ключевые слова: африканская скумбрия, Центрально-Восточная Атлантика, микросателлиты, генетический полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0016675823010113, **EDN:** CNJWFH

Африканская скумбрия *Scomber colias* Gmelin, 1789 [1] – пелагическая стайная рыба, широко распространенная в прибрежных акваториях Атлантического океана от Бискайского залива на севере до юга Африки (включая Черное и Средиземное моря), являющаяся традиционным объектом тралового и кошелькового лова. Как хозяйственно ценный объект, представляющий собой важную составляющую пелагической экосистемы, африканская скумбрия является объектом различного рода исследовательских работ, направленных как на развитие общебиологического фундаментального знания, так и мониторинговые сырьевые исследования, в цели которых входит создание условий для рационального, "предосторожного" использования рыбных ресурсов. Важный материал как для фундаментальных, так и прикладных работ дают результаты популяционных исследований, проводимых с применением спектра морфо-биологических, поведенческих, физиологических, генетических методологий. Так, с использованием анализа морфометрических характеристик и формы отолита выявлена популяционная структурированность африканской скумбрии прибрежных вод Португалии и островных акваторий Центрально-Восточной Атлантики (**ЦВА**) [2]. По результатам определения биологических характеристик (пол, длина, общая масса, масса порки и др.) выявлена изменчивость скумбрии из акваторий центральной части Средиземного моря [3]. На основе анализа морфометрических и меристических признаков выявлена определенная структурированность группировки африканской скумбрии из прибрежных вод Туниса [4]. На основе анализа полиморфизма ядерной и митохондриальной ДНК проводили анализ видового состава рода *Scomber* [5, 6]. На основе анализа изменчивости контрольного региона митохондриальной ДНК рассматривали генетическую структурированность скумбрии прибрежных вод Португалии и северных акваторий средиземноморского региона. Если скумбрия атлантических вод характеризовалась как панмиктическая группировка, то в средиземноморье выявлен определенный

Таблица 1. Характеристика анализируемого в работе материала

Индекс выборки	Место и время взятия выборок	Координаты		Число рыб, экз.
		широта	долгота	
Mar1	ЦВА, Зап. Африка 21.09.2017	21°15′ N	17°24′ W	50
Mar2	ЦВА, Зап. Африка 29.09.2017	22°34′ N	17°30′ W	50
Mar3	ЦВА, Зап. Африка 14.10.2017	23°0′ N	16°38′ W	50
Mar4	ЦВА, Зап. Африка 20.10.2017	23°39′ N	16°38′ W	50
Mar5	ЦВА, Зап. Африка 22.10.2017	23°39′ N	16°38′ W	50
Mar6	ЦВА, Зап. Африка 23.09.2017	23°36′ N	16°40′ W	50
Mavr	ЦВА, Зап. Африка 27.09.2016	18°2′ N	16°26′ W	50

уровень генетической структурированности [7]. На основе анализа изменчивости SNP-маркеров анализировали популяционно-генетическую структуру скумбрии прибрежных вод Канады, Бискайского залива и Средиземного моря [8].

Из вышеизложенного следует, что при значительном объеме проведенных популяционных исследований для представителей рода *Scomber* районов Индо-Пацифики и Атлантики, практически отсутствуют популяционно-генетические исследования африканской скумбрии из акваторий ЦВА.

Цель данной работы – исследование популяционно-генетической структуры африканской скумбрии акваторий ЦВА на основе изучения полиморфизма микросателлитных локусов ядерной ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для выполнения данной работы послужили сборы африканской скумбрии, полученные в рамках программы мониторинга комплексных исследований мелких пелагических рыб на рыболовных судах в марокканско-мавританских экономических водах (табл. 1, рис. 1).

В качестве маркеров использовали секвенированные для восточной скумбрии микросателлитные локусы *SJT5*, *SJT25*, *SJT36*, *SJNT66*, *SJT205*, *SJT142*, *SJT175* [9]. Для ПЦР-амплификации использовали наборы Gene Pak PCR Core (ООО “ИзоГен”, Россия), к которым добавляли 5 мкл смеси праймеров (конечная концентрация 0.5 мкМ) и 5 мкл исследуемой ДНК (100 нг). Амплификацию микросателлитных локусов проводили в термоциклере “MJ Research PTC 100” при следующем режиме: сначала 4 мин разрушение ДНК при температуре 95°C, затем 35 циклов дальнейшей денатурации ДНК матрицы, отжиг праймеров и синтез новых цепей. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6%-ном неденатурирующем полиакриламидном геле в ТБЕ-буфере [10] при 300 В в течение 2–3 ч, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете. Размеры аллелей по каждому локусу определяли с использованием программы “1D Image Analysis Software Version 3.5” (“Kodak”).

Частоты аллелей, равновесие Харди–Вайнберга, гетерозиготности ожидаемая (H_e) и наблюдаемая (H_o), коэффициент дифференциации популяций θ (аналог F_{ST}-статистики) [11] и другие показатели определяли с использованием программного пакета GDA [12]. Генетическую идентичность (I) рассчитывали по методу Нея [13] в GDA. Достоверность отличий H_e и H_o оценивали с помощью F-критерия Фишера [14]. Для снижения эффекта множественных сравнений проводили процедуру внесения поправки Бонферрони [15]. Программный пакет GENEPOP 4.2 [16] использовали при оценке частот неамплифицирующихся нуль-аллелей и определении показателя интенсивности генных потоков (N_m). Для оценки возможного влияния демографических изменений (снижения эффективной численности, так называемое “горлышко бутылки”) на генетическое разнообразие в популяциях скумбрии использовали программу BOTTLENECK ver. 1.2.02 [17] со стандартными параметрами. Для проверки качества данных и наличия неамплифицируемых нуль-аллелей использовали программу Micro-Checker 2.2.3 [18]. Для оценки степени влияния предполагаемых ноль-аллелей на показатели генетической дифференциации F_{ST} проводили корректировку их значений с использованием программы FreeNA [19]. Представление графической проекции выборок на основе многомерного шкалирования матрицы генетических дистанций Кавалли–Сфорца проводили в программе STATISTICA 10.

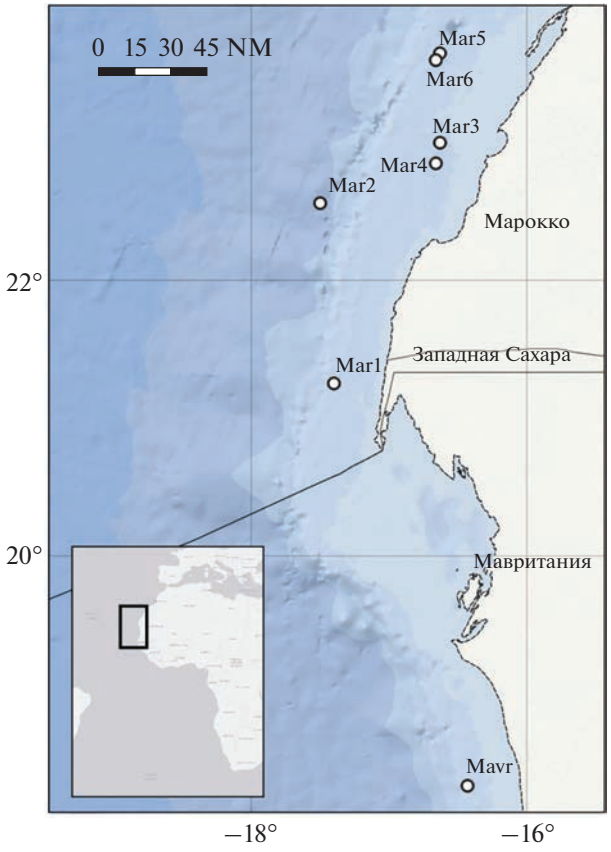


Рис. 1. Карта-схема локализации выборок африканской скумбрии (обозначения как в табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовавшиеся микросателлитные локусы демонстрировали полиморфизм различного уровня с некоторыми отличиями в выборках африканской скумбрии. Локус *SJT36* был наименее полиморфен (от 2 до 3 аллелей в интервале размеров 122–128 пн). Наибольший уровень полиморфизма выявлен в локусах *SJNT66* (от 13 до 19 аллелей в интервале размеров 104–146 пн), *SJT25* (от 7 до 12 аллелей в интервале размеров 105–156 пн), *SJT5* (от 13 до 19 аллелей в интервале размеров 80–126 пн). Средний уровень полиморфизма демонстрировали локусы *SJT205* (от 6 до 9 аллелей в интервале размеров 152–168 пн), *SJT142* (от 3 до 6 аллелей в интервале размеров 126–136 пн), *SJT175* (от 5 до 8 аллелей в интервале размеров 144–158 пн) (табл. 2).

В семи выборках скумбрии рассчитаны оценки внутрипопуляционного генетического разнообразия (табл. 2). Значения H_e изменялись в вы-

Таблица 2. Частоты неамплифицирующихся нуль-аллелей в исследованных выборках африканской скумбрии

Локус	Выборки						
	Mar1	Mar2	Mar3	Mar4	Mar5	Mar6	Mavr
SJT5	0.0781	0.0424	0.1056	0.1239	0.1470	0.0550	0.0075
SJT25	0.0000	0.0458	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
SJT36	0.0000	0.0121	0.0000	0.0000	0.0168	0.0444	0.0000
SJNT66	0.0132	0.0292	0.0433	0.0351	0.0328	0.0380	0.0000
SJT205	0.1225	0.0992	0.0552	0.0965	0.0000	0.0964	0.0596
SJT142	0.1462	0.0773	0.1136	0.1273	0.1043	0.1280	0.1412
SJT175	0.1572	0.1444	0.1783	0.1437	0.1332	0.1264	0.1245

борках скумбрии от 0.021 до 0.914. Максимальные значения H_e, как и наибольшее число аллелей, показаны в локусе *SJT5*. Средние оценки H_e во всех изученных выборках варьировали от 0.625 до 0.662. После проведения тестирования на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (HWE), порядка половины тестов продемонстрировали отклонение от ожидаемой величины ($P < 0.05$). Проведение процедуры введения поправки Бонферрони для множественных сравнений снизило объем отклонений от HWE до 35%. Несоответствие около третьей части выполненных тестов распределению Харди–Вайнберга не позволяют отнести это обстоятельство к области случайных. Проведенное (в рамках определения причин масштабного отклонения от HWE) тестирование на возможное сокращение группировки скумбрии в недалеком прошлом не выявило ситуации с прохождением "горлышка бутылки" группировкой африканской скумбрии ЦВА, в том числе на фоне дефицита гетерозиготности.

Из результатов ранее проведенных исследований известно, что достаточно часто тестируемое в популяционных исследованиях отклонение от равновесия Харди–Вайнберга [20] при использовании считающихся селективно нейтральными микросателлитных локусов формируется в условиях присутствия нуль-аллелей в исследуемых локусах [21–24].

Применение нами программы Micro-Checker выявило присутствие нуль-аллелей в четырех из семи исследовавшихся микросателлитных локусов. Практически сходные результаты дала оценка частот неамплифицирующихся нуль-аллелей в исследованных выборках африканской скумбрии с применением программного пакета GENEPOP 4.2. Частоты нуль-аллелей в выборках скумбрии варьировали в довольно широких пределах: от 0.0075 до 0.1783 (табл. 2). Высокая доля локусов с нуль-аллелями в выборках беспозвоночных и рыб отмечалась и в ранее проводившихся популяционных исследованиях как российских, так и зарубежных авторов. Так, при изучении популяций японского гребешка (*Chlamys farreri*) выявлено 56% локусов с нуль-аллелями [25]. В работах с минтаем (*Theragra chlalcogramma*) Берингова и Охотского морей в четырех микросателлитных локусах из десяти исследовавшихся предполагалось наличие нуль-аллеля [26]. В исследованиях выборок тихоокеанских лососей также были обнаружены нулевые аллели [27]. Что касается частоты нуль-аллелей, то значение ее для динуклеотидных повторов может достигать 0.30 [28].

Присутствие нуль-аллелей может быть связано с ошибками генотипирования в связи с накоплением мутаций в последовательностях, комплементарных праймерным, у анализируемого вида по сравнению с видом/популяцией для которого/которой эти праймеры были разработаны, что, например, было показано при исследованиях выборки голомянки [29]. Применения праймера атлантической трески *Gmo3* в популяционных исследованиях минтая сопровождалось обнаружением нуль-аллелей в 44% локус-тестов [22]. В нашем случае для исследования популяционной структуры скумбрии из акваторий ЦВА были использованы микросателлитные локусы, секвенированные для скумбрии из центрально-западной части Тихого океана. Если более ранние работы относили эти группировки к одному виду с подвидами, то в современных работах эти подвиды получили видовой статус [1, 30, 31]. Таким образом, дивергенция фланкирующих микросателлитный повтор последовательностей на видовом уровне могла стать причиной проблем с отжигом праймеров при амплификации ДНК.

Выполнена оценка с применением критерия Фишера значимости различий ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготностей в выборках скумбрии. Показано достоверное отличие средних значений H_e и H_o во всех исследовавшихся выборках африканской скумбрии (табл. 3). Полученные результаты продемонстрировали наличие дефицита гетерозиготности, что может быть связано с присутствием нуль-аллелей, провоцирующих ошибки детекции гомо- и гетерозигот [32]. Проверка влияния возможных нуль-аллелей на оценки генетической дифференциации продемонстрировала изменения F_{ST} по исследовавшимся микросателлитным локусам в среднем на 17.9%.

Диаграмма рассеяния была построена на основе процедуры многомерного шкалирования в пространстве двух координат в соответствии со скорректированными с точки зрения влияния нуль-аллелей генетическими дистанциями Кавалли–Сфорца. Полученные значения показателя Юнга (0.08) и коэффициента отчуждения (0.14) свидетельствуют о хорошем соответствии модели исходным данным [33]. Соответствующие проанализированным выборкам точки формировали на диаграмме – общее облако, при этом наиболее близко были расположены две пары выборок: Mar4-Mavr и Mar1-Mar5 (рис. 2). Можно предположить, что образование пар с аналогичными генетическими характеристиками могло быть связано со взятием материала из сходных (несмотря на пространственную разобщенность), но активно перемещающихся группировок африканской

Таблица 3. Показатели генетического разнообразия в выборках скумбрии

Локус	Показатель	Выборки						
		Mar1 $N = 47$	Mar2 $N = 48$	Mar3 $N = 48$	Mar4 $N = 48$	Mar5 $N = 48$	Mar6 $N = 48$	Mavr $N = 48$
SJT5	*A*/*Ap*	13/13	15/15	16/16	16/16	19/19	15/15	14/14
	H_e/H_o	0.859/0.723	0.858/0.770	0.872/0.666	0.884/0.625	0.914/0.625	0.860/0.750	0.854/0.791
SJT25	*A*/*Ap*	10/10	12/12	9/9	10/10	7/7	10/10	8/8
	H_e/H_o	0.731/0.829	0.776/0.687	0.763/0.895	0.802/0.812	0.730/0.770	0.753/0.812	0.667/0.791
SJT36	*A*/*Ap*	2/2	3/3	2/2	2/2	2/2	3/3	2/2
	H_e/H_o	0.021/0.021	0.225/0.208	0.061/0.062	0.099/0.104	0.188/0.166	0.155/0.083	0.205/0.229
SJNT66	*A*/*Ap*	16/16	19/19	17/17	17/17	13/13	13/13	16/16
	H_e/H_o	0.907/0.872	0.875/0.791	0.882/0.791	0.909/0.833	0.861/0.791	0.849/0.770	0.858/0.895
SJT205	*A*/*Ap*	6/6	9/9	7/7	8/8	8/8	7/7	7/7
	H_e/H_o	0.582/0.382	0.646/0.458	0.679/0.541	0.620/0.458	0.624/0.666	0.620/0.458	0.646/0.541
SJT142	*A*/*Ap*	4/4	5/5	5/5	3/3	6/6	5/5	5/5
	H_e/H_o	0.550/0.319	0.541/0.416	0.557/0.375	0.388/0.208	0.540/0.375	0.579/0.354	0.484/0.270
SJT175	*A*/*Ap*	8/8	8/8	6/6	7/7	5/5	7/7	7/7
	H_e/H_o	0.724/0.446	0.711/0.458	0.680/0.375	0.685/0.437	0.641/0.416	0.700/0.479	0.741/0.500
Среднее значение	*A*/*Ap*	8.42/8.42	10.14/10.14	8.85/8.85	9.00/9.00	8.57/8.57	8.57/8.57	8.42/8.42
	H_e/H_o	0.625/0.513	0.662/0.541	0.642/0.529	0.627/0.497	0.643/0.544	0.645/0.529	0.636/0.574

Примечание. *A* – число аллелей, *Ap* – среднее число аллелей на полиморфный локус, H_e – ожидаемая гетерозиготность, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, *N* – объем выборки.

скумбрии. Также необходимо отметить, что коррекция значений генетических дистанций с точки зрения влияния нуль-аллелей не оказывала кардинального влияния на характер диаграммы рассеяния. Наряду с влиянием нуль-аллелей пониженный уровень гетерозигот может быть также связан и с нарушением панмиксии за счет присутствия и смешения отдельных субпопуляций [25, 34]. Если в популяции существуют определенные группы, между которыми обмен генами происходит с меньшей интенсивностью (чем в пределах самих этих групп), может иметь место разделение популяции на субпопуляции и, в определенной степени, изоляция.

При оценке генетической подразделенности группировки африканской скумбрии получены демонстрировавшие высокую степень сходства исследовавшихся выборок попарные значения показателя генетической идентичности Нея ($I = 0.975$–1.003). При этом при глобальной оценке генетической дифференциации, рассчитанной по всем локусам, получены низкие, но достоверные значения θ (0.0052 с 95%-ным бутстреп-интервалом 0.0015–0.0091). Наибольший вклад в оценку θ вносят локусы *SJT36* (θ = 0.0146), *SJT5* (θ = 0.0118), *SJNT66* (θ = 0.0072), *SJT25* (θ = 0.0058). Понимая, что на формирование значения θ могут оказывать связанные с нуль-аллелями погрешности, все же возможно допущение и того, что полученные оценки в определенной степени могут свидетельствовать в пользу структуры со слабой генетической подразделенностью [35, 36] в анализируемой группировке африканской скумбрии ЦВА.

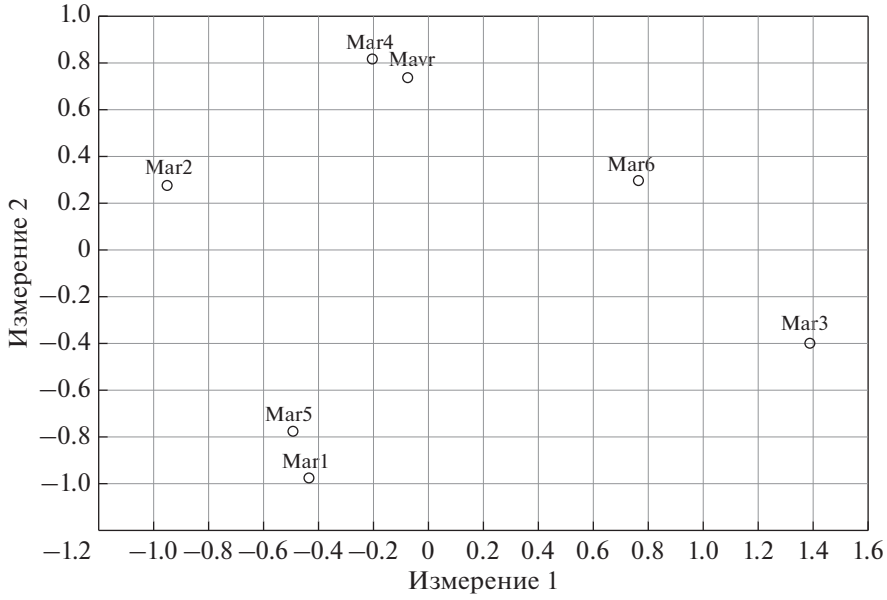


Рис. 2. Расположение точек, соответствующих выборкам африканской скумбрии из акваторий ЦВА, в пространстве двух координат в соответствии со скорректированными (с точки зрения влияния нуль-аллелей) генетическими дистанциями Кавалли–Сфорца (обозначения как в табл. 1).

Показатель интенсивности генных потоков (N_m) [37] может характеризовать особенности структурированности исследуемой группировки. Так, например, для атлантической трески показано, что, если в рамках акваторий Северо-Восточной Атлантики интенсивность генных потоков высокая ($N_m = 37.06$), то между Северо-Восточной Атлантикой и Северо-Западной Атлантикой, в силу особенностей гидрологических характеристик, интенсивность генных потоков падает ($N_m = 8.27$), что способствует формированию определенного уровня генной подразделенности [38]. Сходная ситуация показана для европейского анчоуса Азово-Черноморского бассейна, демонстрирующего слабую генетическую подразделенность на фоне высокой интенсивности генных потоков ($N_m = 86.58$).

Что касается анализируемой в нашей работе группировки африканской скумбрии ЦВА, то оценка этого показателя в программе GENEPOP 4.2 дала усредненное довольно низкое значение $N_m = 13.20$, что, соответственно, сопровождается отклонением от гомогенной структуры с панмиксией. Учитывая относительно небольшую протяженность района сбора используемого в нашей работе экспериментального материала африканской скумбрии (в пределах 500 км), ее пелагический образ жизни, значительный период времени денатантных миграций в раннем развитии, высокую мигрантность половозрелых особей скумбрии, следовало бы ожидать гораздо более высокий показатель интенсивности генных потоков. Не забывая о возможном определенном отклонении значения N_m из-за смещения аллельных частот, мы также можем допустить и влияние антропогенного фактора на ограничение интенсивности генных потоков и формирование определенного (невысокого) уровня структурированности в анализируемой группировке африканской скумбрии.

Дело в том, что как хозяйственно ценный объект африканская скумбрия находится под прессом рыболовного промысла. При этом, несмотря на существующие ограничения невозможно обеспечить равномерное распределение промыслового усилия по всей акватории. Неминуемо, рыболовные суда концентрируются в участок ареала с максимальной плотностью объекта вылова. В результате этого одни субпопуляции перелавливаются, другие недолавливаются. В связи с этим происходит нарушение естественно сложившихся каналов миграционной связи между элементами системы, в некоторой степени нарушается сложившаяся генетическая структура популяции [39, 40]. Предположить в нашем случае другие возможные механизмы дифференциации в группировках морских рыб (как то: океанические фронты, зоны апвеллинга, течения и др.) довольно сложно в связи с ограниченностью акваторий взятия выборок и биологическими характеристиками африканской скумбрии.

Исходя из вышеизложенного можно отметить, что впервые с помощью селективно нейтральных генетических маркеров – микросателлитных локусов ядерной ДНК проведен анализ уровня популяционно-генетической структурированности группировки африканской скумбрии акваторий ЦВА. Выявлено устойчивое отклонение от HWE, одной из основных причин которого может быть присутствие нуль-аллелей почти в половине исследовавшихся микросателлитных локусов. Это может быть связано в том числе с применением праймеров, секвенированных ранее для сестринского вида из рода *Scomber* [9]. Выявлена слабая структурированность группировки африканской скумбрии на акваториях ЦВА, где был собран исследуемый материал. Поводом к этому может быть интенсивный (с неравномерным распределением нагрузки) промысел запасов пелагических рыб в марокканско-мавританских экономических водах.

Полученные в настоящем исследовании первичные данные предполагают полезность и необходимость развития популяционно-генетических исследовательских работ для дальнейшего изучения и мониторинга группировки африканской скумбрии ЦВА. Одним из направлений исследовательских работ является совершенствование методической исследовательской базы, направленное на обнаружение альтернативных праймеров для выявления нуль-аллелей. Практическая составляющая развития исследований состоит в отработке методологий применения получаемых результатов для мониторинга и совершенствования промысла, направленных на восстановление нативной популяционной структуры африканской скумбрии акваторий ЦВА.

Авторы выражают благодарность за консультации и помощь при подготовке материалов статьи: К.И. Афанасьеву, (ИОГен РАН), А.М. Хрусталевой (ИБГ РАН), А.В. Семеновой, И.М. Полушкиной (каф. ихтиологии МГУ).

Сбор материала осуществлялся в экспедициях ВНИРО, а обработка и анализ проводились в рамках плановых исследований по основным гостемам без привлечения финансирования по грантам.

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. *Парин Н.В., Евсеенко С.А., Васильева Е.Д.* Рыбы морей России: аннотированный каталог. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2014. 733 с.
2. *Muniz A.A., Moura A., Triay-Portella R. et al.* Population structure of the chub mackerel (*Scomber colias*) in the North-east Atlantic inferred from otolith shape and body morphometrics // Marine and Freshwater Res. 2020. V. 72. № 3. P. 341–352. https://doi.org/10.1071/MF19389
3. *Allaya H., Hattour A., Hajjej G., Trabelsi M.* Biologic characteristics of *Scomber japonicus* (Houttuyn, 1782) in Tunisian waters (central Mediterranean Sea) // African J. Biotechnol. 2013. V. 12. P. 3040–3048. https://doi.org/10.5897/AJB12.2723
4. *Allaya H., Ben Faleh A., Rebaya M. et al.* Identification of Atlantic chub mackerel *Scomber colias* population through the analysis of body shape in Tunisian waters // Cah. Biol. Mar. 2016. V. 57. P. 195–207.
5. *Scoles D.R., Collette B.C., Graves J.E.* Global phylogeography of mackerels of the genus *Scomber* // Fisheries Bulletin. 1998. V. 96. P. 823–842.
6. *Catanese G., Manchado M., Infante C.* Evolutionary relatedness of mackerels of the genus *Scomber* based on complete mitochondrial genomes: Strong support to the recognition of Atlantic *Scomber colias* and Pacific *Scomber japonicus* as distinct species // Gene. 2010. V. 452. P. 35–43. https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.12.004
7. *Zardoya R., Castilho R., Grande C. et al.* Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea // Mol. Ecol. 2004. V. 13. P. 1785–1798.
8. *Rodríguez-Ezpeleta N., Bradbury I.R., Mendibil I. et al.* Population structure of Atlantic mackerel inferred from RAD-seq-derived SNP markers: Effects of sequence clustering parameters and hierarchical SNP selection // Mol. Ecol. Resources. 2016. V. 16. I. 4. P. 991–1001. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12518
9. *Zeng L., Cheng Q.* Thirty novel microsatellite markers for the coastal pelagic fish, *Scomber japonicus* (Scombridae) // J. Genet. 2012. V. 91. P. e64–e68.
10. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
11. *Weir B.S.* Genetic Data Analysis II. Methods for Discrete Population Genetic Data. Massachusets: Sinauer Ass. Sunderland, 1996. 445 p.
12. *Lewis P.O., Zaykin D.* Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d 16c). 2001. Free program distributed by the authors over the internet from. http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html
13. *Nei M.* Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. V. 89(3). P. 583–590.

14. *Ивантер Э.В., Коросов А.В.* Введение в количественную биологию. Петрозаводск: Петр. ГУ, 2003. 304 с.

15. *Rice W.R.* Analyzing tables of statistical tests // Evolution. 1989. V. 43. P. 223–225.

16. *Rousset F.* Genepop 007: A complete reimplementation of the genepop software for Windows and Linux // Mol. Ecol. Res. 2008. V. 8. P. 103–106. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x

17. *Piry S., Luikart G., Conuet J.M.* Bottleneck: A computer program for detecting recent reduction in the effective population size using allele frequency data // J. Hered. 1999. V. 90. P. 502–503.

18. *Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P.* MICROCHECKER: 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

19. *Chapuis M.P., Estoup A.* Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 621–631. https://doi.org/10.1093/molbev/msl191

20. *Кордичева С.Ю., Рубцова Г.А., Шитова М.В. и др.* Выявление нуль-аллелей в микросателлитном локусе кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) // Генетика. 2010. Т. 46. № 8. С. 1143–1147.

21. *Смирнова М.А., Орлова С.Ю., Калчугин П.В. и др.* Особенности популяционной структуры тихоокеанской трески *Gadus macrocephalus* южной части ареала на основе микросателлитного анализа // Генетика. 2018. Т. 54. № 6. С. 661–670.

22. *Савенков В.В., Шпигальская Н.Ю., Варкентин А.И. и др.* Дифференциация минтая (*Theragra chalcogramma*) Охотского моря по микросателлитным локусам // Исследов. водных биол. ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. 2018. Вып. 48. С. 5–18.

23. *Семенова А.В., Строганов А.Н., Афанасьев К.И. и др.* Микросателлитная изменчивость тихоокеанской сельди *Clupea pallasii* Valenciennes 1847 Охотского и Берингова морей // Генетика. 2018. Т. 54. № 3. С. 349–360.

24. *Семенова А.В., Строганов А.Н., Бугаев А.В. и др.* Анализ изменчивости микросателлитных локусов в популяциях азиатской зубастой корюшки *Osmerus dentex* Восточной и Западной Камчатки // Генетика. 2019. Т. 55. № 1. С. 70–80. https://doi.org/10.1134/S0016675819010041

25. *Zhan A., Hu J., Hu X. et al.* Construction of microsatellite-based linkage maps and identification of size-related quantitative trait loci for Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) // Animal Genet. 2009. № 40. P. 821–831. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01920.x

26. *Шубина Е.А., Пономарева Е.В., Глубоков А.И.* Популяционно-генетический анализ минтая *Theragra chalcogramma* (Teleostei, Gadidae) из Беренгового и Охотского морей // Мол. биология. 2009. Т. 43. № 5. С. 918–930. https://doi.org/10.1134/S0026898409050164

27. *Кордичева С.Ю.* Нуль-аллели в микросателлитных локусах кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum). Дис. ... канд. биол. наук. М.: ИОГен РАН. 2011. 120 с.

28. *Ellegren H.* Microsatellites: Simple sequences with complex evolution // Nature Rev. Genet. 2004. V. 5. P. 435–445.

29. *Тетерина В.И., Суханова Л.В., Кирильчик С.В.* Полиморфизм микросателлитной ДНК эндемичного рода рыб оз. Байкал – голомянок (*Comephorus lacepede*, 1801) // Экол. генетика. 2007. Т. 5. № 2. С. 50–57.

30. *Collette B.B., Nauen C.E.* FAO Species Catalogue. Scombrids of the World. An Annotated and Illustrated Catalogue of Tunas, Mackerels, Bonitos and Related Species Known to Date. FAO Fish. Synop. № 125. Italy, Rome: FAO, 1983. V. 2. 137 p.

31. *Collette B.B.* Family Scombridae Rafinesque 1815 – Mackerels, Tunas, and Bonitos. Calif. Acad. Sci. Annotated Check lists of Fishes. № 19. USA, San Francisco: California Acad. of Sci., 2003. 28 p.

32. *Галинская Т.В., Щепетов Д.М., Лысенков С.Н.* Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять // Генетика. 2019. Т. 55. № 6. С. 617–632. https://doi.org/10.1134/S0016675819060043

33. *Толстова Ю.Н.* Основы многомерного шкалирования: учебное пособие. М.: КДУ, 2006. 157 с.

34. *Хрусталева А.М., Кловач Н.В.* О морфологической и генетической гетерогенности нерки *Oncorhynchus nerka* (Salmonidae) крупных озерно-речных систем Восточной и Западной Камчатки // Вопр. ихтиологии. 2019. Т. 59. № 6. С. 640–650. https://doi.org/10.1134/S0042875219060055

35. *Животовский Л.А.* Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 276 с.

36. *Кузнецов В.М.* F-статистики Райта: оценка и интерпретация // Пробл. биол. продуктивных животных. 2014. Т. 4. С. 80–104.

37. *Slatkin M.* Gene flow in natural populations // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1985. V. 16. P. 393–430.

38. *Строганов А.Н., Орлов А.М., Семенова А.В., Орлова С.Ю.* Формирование популяционной структуры атлантической трески *Gadus morhua* Linnaeus, 1758 в четвертичном периоде // Биология моря. 2019. Т. 45. № 1. С. 17–24. https://doi.org/10.1134/S0134347519010091

39. *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1989. 328 с.

40. *Алтухов Ю.П.* Динамика генофондов при антропогенных воздействиях // Вестник ВОГиС. 2004. Т. 8. № 2. С. 40–59.

Study of Population Genetic Structure of Atlantic Chub Mackerel *Scomber colias* Gmelin, 1789 (Scombridae) in the Central-East Atlantic

A. N. Stroganov[a], *, A. I. Nikitenko[b], T. A. Rakitskaya[c], and V. A. Belyaev[d]

[a] *Moscow State University, Department of Ichthyology, Moscow, 119234 Russia*

[b] *Branch for Freshwater Fisheries of the All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), Moscow oblast, pos. Rybnoe, 141821 Russia*

[c] *Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

[d] *All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), Moscow, 107140 Russia*

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

A study of genetic diversity in groups of Atlantic Chub mackerel from the waters of the Central-East Atlantic was carried out on the basis of seven microsatellite loci. All loci were polymorphic, the estimates of expected heterozygosity varied from 0.021 to 0.914. For all studied samples of Atlantic Chub mackerel, a heterozygosity deficiency was identified, associated with the presence of null alleles in four of the seven studied microsatellite loci. A low but significant value of genetic differentiation was obtained, calculated for all loci ($\theta = 0.0052$), which, presumably, may also be associated with the violation of panmixia due to the formation of individual subpopulations as a result of the uneven impact of fishing in different localities.

Keywords: Atlantic Chub Mackerel, Central-East Atlantic, microsatellites, genetic polymorphism.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 89–96

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 636.1.082:575(571.56)

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ПОПУЛЯЦИИ КЫРГЫЗСКОГО ГОРНОГО МЕРИНОСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

© 2023 г. Ж. Т. Исакова[1, *], А. Б. Бектуров[2], Т. Д. Чортонбаев[2], В. Н. Кипень[3], С. Б. Мукеева[1], У. А. Шергазиев[2], К. А. Айтбаев[1]

[1]Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и медицины, Бишкек, 720040 Кыргызская Республика

[2]Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, Бишкек, 720005 Кыргызская Республика

[3]Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

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

Поступила в редакцию 22.02.2022 г.
После доработки 08.06.2022 г.
Принята к публикации 20.07.2022 г.

Проведена оценка генетической структуры и генетического разнообразия кыргызского горного мериноса с использованием микросателлитных локусов ДНК. В исследование включены 109 овец данной породы, разводимых в трех государственных племенных заводах (ГПЗ): ГПЗ “Оргочор” (Иссык-Кульская обл.), ГПЗ “Катта-Талдык” (Ошская обл.) и ГПЗ им. М.Н. Лущихина (Таласская обл.). В 12-ти исследованных локусах (McM042, INRA006, McM527, ETH152, CSRD247, OarFCB20, INRA172, INRA063, MAF065, MAF214, INRA005, INRA023) было идентифицировано 126 аллелей. Число аллелей в каждом локусе варьировало от 6 до 16, при среднем значении 10.500 ± 0.957 аллелей на локус. Определены 67 редких аллелей (с частотой встречаемости менее 5.0%), что составляет 53.2% от общего количества выявленных аллелей. Наибольшее число аллелей наблюдалось в аутосомных локусах: INRA023 (12 аллелей), INRA005 (13 аллелей), OarFCB20 и INRA063 (по 14 аллелей), CSRD247 (16 аллелей). Результаты оценки популяционных параметров, включая эффективное число аллелей (N_e = 4.556 ± 0.394), уровень наблюдаемой (H_o = 0.731 ± 0.023) и ожидаемой (H_e = = 0.761 ± 0.021) гетерозиготности позволяют сделать заключение о высоких значениях генетического разнообразия исследуемой выборки овец породы кыргызский горный меринос и ее значительном генетическом потенциале.

Ключевые слова: кыргызский горный меринос, ДНК, микросателлитные локусы, генотипирование.

DOI: 10.31857/S001667582301006X, **EDN:** CMMVBJ

В Кыргызской Республике 65% коренного населения проживает в сельской местности в условиях средне- и высокогорья и в силу климатических условий занимается животноводством, в основном – разведением овец. По последним статистическим данным, поголовье овец и коз в республике составляет более 6.1 млн голов, или 42.5% от всех видов поголовья скота и домашней птицы, и занимает первое место по количеству поголовья среди домашних сельскохозяйственных животных [1]. Среди различных пород овец по направлению продуктивности, поголовье тонкорунных овец составляет более 110 тыс. голов. В стадах племенных хозяйств по республике насчитывается более 16 тыс. племенных особей породы кыргызский горный меринос (**КГМ**). Сохранившийся генофонд представляет собой уникальную ценность и является государственным достоянием Кыргызской Республики. Кыргызский горный меринос уникален тем, что является продолжением кыргызской тонкорунной породы, которая была создана в 1956 г. и за все последующие годы проходила этапы своего дальнейшего совершенствования (рис. 1).

Завоз в республику из Австралии баранов-производителей и ярок породы австралийский меринос и их использование в стадах фермерских племенных заводов в 2005 г. позволило создать стадо нового качественного уровня, которое и получило название кыргызский горный меринос. В селекционном процессе применялись методы чистопородного разведения, поглотительного и реципрокного скрещивания. Разведение овец желательного типа в племенных стадах велось с применением не только традиционного генеалогического метода, но и за счет отбора по фенотипическим свойствам. В результате, через селекционный отбор прошло более 16 тыс. овец, сохранились только те особи, кото-

Рис. 1. Баран-производитель из Государственного племенного завода им. М.Н. Лущихина (сверху); оценка руна тонкорунной шерсти (внизу, слева); белый цвет жиропота у баранчика (внизу, справа).

рые соответствовали требуемым показателям по своим адаптивным свойствам, настригу шерсти, качеству шерстного покрова и по живой массе [2]. Овцы данной породы производят тонкорунную шерсть и мясо высочайшего качественного уровня, оставаясь почти полностью на круглогодовом пастбищном содержании благодаря адаптивной приспособленности к высокогорным экстремальным условиям [2].

Высокое качество шерсти и ее ценность достигаются в первую очередь благодаря правильно выстроенной селекционной программе, а также использованию в этих целях новейших эффективных технологий. В Кыргызстане же селекция сельскохозяйственных животных проводится, в основном, старыми традиционными методами. При этом современный и высокоэффективный методы – оценка генотипа животных с использованием ДНК-маркеров – начал применяться относительно недавно и до сих пор не является широко распространенной практикой [3]. Обобщение и анализ данных научной литературы показывают, что в настоящее время для решения селекционно-племенных задач, связанных с определением породной принадлежности, происхождения потомков, их генетического полиморфизма и ассоциации с продуктивностью животных активно используются микросателлитные локусы STR (Short Tandem Repeat) [3–8].

В этой связи, оценка внутрипопуляционного генетического разнообразия кыргызского горного мериноса на основании анализа STR будет способствовать определению основ самобытности данной породы овец, т. к. ранее подобные исследования не проводились. Кроме того использование в селекции современных молекулярно-генетических методов может предоставить важную информацию, которая ляжет в основу алгоритмов и схем для поддержания внутрипородного генетического разнообразия, а также сохранения генетической идентичности данной породы и корректировки в селекционно-племенных программах. В этих целях в перспективе планируется проведение ряда мероприятий по совершенствованию племенных качеств овец породы кыргызский горный меринос. Поэтому работа по оценке внутрипопуляционного

генетического разнообразия кыргызского горного мериноса характеризуется высоким уровнем оригинальности и является передовой.

Таким образом, цель данного исследования – оценка генетической структуры и генетического разнообразия кыргызского горного мериноса с использованием микросателлитных локусов ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологическим материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы крови овец породы КГМ, взятые у взрослого поголовья – 109 животных, разводимых в трех государственных племенных заводах (**ГПЗ**): "Оргочор" (село Оргочор, Джеты-Огузский р-н, Иссык-Кульская обл.) – 29 животных, "Катта-Талдык" (село Баш-Булак, Карасуйский р-н, Ошская обл.) – 35 животных, ГПЗ им. М.Н. Лущихина (село Джоон-Тюбе, Кара-Буринский р-н, Таласская обл.) – 45 животных.

Выделение ДНК проводилось методом фенол-хлороформной экстракции [9]. Образцы были генотипированы по 12-ти микросателлитным локусам, рекомендованным Международным обществом генетики животных (ISAG, International Society for Animal Genetics): McM042, INRA006, McM527, ETH152, CSRD247, OarFCB20, INRA172, INRA063, MAF065, MAF214, INRA005, INRA023, – и полспецифичному локусу AMEL.

Генотипирование проводилось с использованием набора реагентов для мультиплексного анализа COrDIS Sheep (ООО "ГОРДИЗ", РФ) согласно рекомендациям производителя. Для корректного определения генотипа у исследуемых животных (физического размера ампликона в пн) был использован образец с контрольным генотипом, включенным в набор COrDIS Sheep. Анализ результатов ПЦР проводился методом капиллярного высокоразрешающего электрофореза с использованием автоматического генетического анализатора 3500 Applied Biosystems (ThermoFisher, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GenAIEx v.6.503 [10]. Были рассчитаны следующие показатели: среднее число аллелей на локус (N_a), эффективное число аллелей (N_e), уровни ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности, коэффициент F_{IS} [11]. Коэффициенты информационного полиморфизма PIC (polymorphism information content) были рассчитаны с использованием веб-приложения Gene-Calc [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Современная порода овец КГМ обнаруживает высокий уровень внутрипородной генетической вариабельности – в 12-ти исследованных микросателлитных локусах, расположенных на аутосомах, было идентифицировано 126 аллелей. Число аллелей в каждом локусе варьировало от 6 до 16, при среднем значении 10.500 ± 0.957 аллелей на локус. Наибольшее число аллелей наблюдалось в аутосомных локусах: INRA023 (12 аллелей), INRA005 (13 аллелей), OarFCB20 и INRA063 (по 14 аллелей), CSRD247 (16 аллелей), табл. 1.

Определены 67 редких аллелей (с частотой встречаемости менее 5.0%), что составляет 53.2% от общего количества выявленных аллелей, табл. 1. Наибольшее количество редких аллелей выявлено для STR: CSRD247 (10 аллелей, суммарный процент распространенности – 18.3%), INRA023 (8 аллелей, 12.8%), INRA005 (7 аллелей, 21.1%), INRA006 (7 аллелей, 12.8%), MAF214 (7 аллелей, 12.8%) и OarFCB20 (7 аллелей, 11.9%).

Установлено, что для некоторых STR-локусов с большим числом наблюдаемых аллелей характерны относительно невысокие значения такого показателя, как число эффективных аллелей (N_e), табл. 2. Данное явление объясняется наличием в локусах редких аллелей с частотой встречаемости менее 5.0%. В частности, более половины всех идентифицированных аллелей относилось к данному типу. Число эффективных аллелей значительно варьировало – от 2.831 (INRA172) до 6.673 (INRA023), при среднем значении 4.556 ± 0.394 аллелей на локус.

Показатель наблюдаемой гетерозиготности H_o находился в диапазоне от 0.606 (MAF214) до 0.853 (OarFCB20), при среднем значении 0.731 ± 0.023. Для локусов ETH152, INRA172 и OarFCB20 показатель H_o был выше предполагаемого H_e (табл. 2).

Распределение показателя *H*-ind, характеризующего совокупный процент (частоту) гетерозиготных генотипов для особей по исследуемым 12-ти STR представлено на рис. 2. Значение показателя *H*-ind, которое составило в среднем 0.731 ± 0.130, позволяет заключить, что исследуемые локусы являются высокополиморфными для данной выборки животных. Нарушение генетического равновесия выявлено по микросателлитным локусам INRA006 (ChiSq = 72.00, DF = 45, $p < 0.01$) и MAF214 (ChiSq = 67.90, DF = 45, $p < 0.05$). Однако при введении поправки на множественные сравнения данные различия нивелировались. Для остальных STR статистически значимых отклонений от равновесия Харди–Вайнберга (HWE) не выявлено ($p > 0.05$).

Величина PIC определяется способностью STR-локуса устанавливать полиморфизм в популяции в зависимости от числа обнаруживаемых аллелей и распределения их частот [13]. Таким образом, PIC зависит от числа известных аллелей, а также распределения их частот и, тем самым, эквивалентен генетическому разнообразию. Результаты расчетов показали, что для всех локусов показа-

Таблица 1. Аллели, идентифицированные в экспериментальной выборке овец породы КГМ

STR	Локализация[#] (хромосома)	Аллели
CSRD247	14	209*/211*/213/215*/217*/223/225* 227**/229/231/233*/235*/237*/239 241*/243*
ETH152	3	186**/188/190/192/198*/200*
INRA005	10	113*125/127/129*/131/133*/135/ 137*/139*/141/143*/145/147*
INRA006	1	110**/112*/114*/116/118*/120*/ 124*/126*/132/134*
INRA023	3	192*/198/200/202/204/206/208*/ 210*/212*/214*/216/218*
INRA063	14	167*/169/171/173*/175**/177/179*/ 183/187*/189/195*/197*/199*/201*
INRA172	22	126/144*/154**/156*/158*/160/162*/ 164/166*/168*
MAF065	15	123*/125**/127**/129/131*/135/137*
MAF214	16	183*/187/189**/191/221*/223*/225*/ 255*/261*/269*
McM042	9	81/87**/89/95/97*/99/103*
McM527	5	158*/164/166**/168/170/172/176*
OarFCB20	2	77*/83*/87/89**/91/93/95*/99/101/ 103*/105/107*/111*/113*

Примечание. # – RefSeq: GCF_016772045.1 (*Ovis aries*, Rambouillet), * – отмечены редкие аллели с частотой встречаемости <5.0%, ** – отмечены аллели с частотой встречаемости ≥30.0%.

Таблица 2. Генетическая характеристика овец породы КГМ по 12-ти STR-локусам

STR	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC	F_{IS}
CSRD247	16	5.690	0.807	0.824	0.806	0.021
ETH152	6	3.375	0.706	0.704	0.654	–0.004
INRA005	13	6.384	0.835	0.843	0.828	0.010
INRA006	10	3.236	0.661	0.691	0.650	0.044
INRA023	12	6.673	0.752	0.850	0.835	0.115
INRA063	14	5.322	0.807	0.812	0.799	0.006
INRA172	10	2.831	0.661	0.647	0.624	–0.021
MAF065	7	3.443	0.679	0.710	0.656	0.043
MAF214	10	3.100	0.606	0.677	0.638	0.106
McM042	7	4.420	0.697	0.774	0.742	0.099
McM527	7	4.489	0.706	0.777	0.746	0.091
OarFCB20	14	5.708	0.853	0.825	0.809	–0.034
Среднее значение:		*4.556*	*0.731*	*0.761*	*0.732*	*0.040*

Примечание. N_a – количество выявленных аллелей, N_e – количество эффективных аллелей, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, PIC – величина информационного полиморфизма, F_{IS} – индивидуальный индекс фиксации.

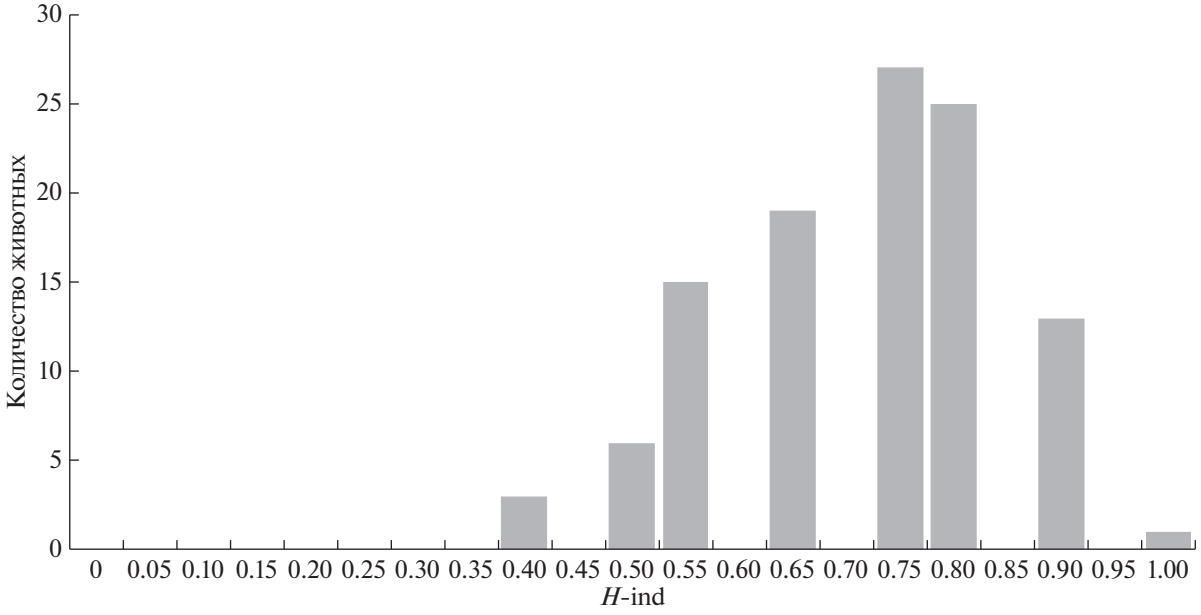


Рис. 2. Информация о совокупности гетерозиготных генотипов по 12-ти STR-локусам для каждой особи.

тель PIC превышает значение 0.5, что свидетельствует об их высокой информативной ценности для выявления генетических различий между животными. Наибольшие показатели PIC имели STR: CSRD247 (0.806), OarFCB20 (0.809), INRA005 (0.828) и INRA023 (0.835). Наименьшие значения показателя информативности отмечались у локусов INRA172 (0.624) и MAF214 (0.638).

F_{IS} – индивидуальный индекс фиксации, который указывает на редукцию гетерозиготности из-за неслучайного спаривания и означает меру отклонения генотипических частот от таковых при HWE внутри субпопуляций с точки зрения недостатка или избытка гетерозигот. При $F_{IS} > 0$ имеет место дефицит гетерозиготных особей (родственное спаривание) – показано для 9 из 12 STR-локусов – CSRD247, INRA005, INRA006, INRA023, INRA063, MAF065, MAF214, McM042 и McM527, а при $F_{IS} < 0$ – избыток гетерозигот (неродственное спаривание) – показано для ETH152, INRA172 и OarFCB20. Наибольшие рассчитанные значения коэффициента F_{IS} были показаны для STR McM527 (0.091), McM042 (0.099), MAF214 (0.106) и INRA023 (0.115), при среднем значении 0.040 ± ± 0.015. Среднее значение F_{IS} позволяет сделать заключение о наличии незначительного сдвига в сторону процессов инбридинга.

Нами проведен сравнительный анализ параметров N_a и H_e для КГМ и овец тонкорунных пород, разводимых в Казахстане [14], России [15], Пакистане [16] и Польше [17], табл. 3.

Установлено, что для КГМ среднее значение параметра N_a (в контексте исследуемых в данной работе STR-локусов) было максимальным в сравнении с результатами других исследователей. Данный факт может свидетельствовать как о значительной полиморфности анализируемых нами локусов, так и о существенно высоком генетическом разнообразии изучаемой выборки КГМ. Высокие показатели генетического разнообразия КГМ напрямую связаны с многоступенчатыми селекционными процессами, которым подверглась данная порода на протяжении конца XX в.–начала XIX в. Предположительно, существенный качественный вклад в совершенствование овец КГМ внес процесс углубленной внутрипородной селекции и скрещивания кыргызской тонкорунной овцы с импортными австралийскими мериносами. На данный момент порода КГМ включает пять заводских типов и 23 заводские линии, различающихся по некоторым хозяйственно полезным признакам (живая масса, мясные свойства, технологические свойства шерсти, длина волокон, густота волокон), а также на основании комплексного сочетания признаков [2]. Таким образом, значительное генетическое разнообразие КГМ – следствие грамотных селекционных процессов на протяжении длительного времени.

Рассчитанный показатель H_o также оказался одним из самых больших и был сопоставим со значениями, полученными для пород Великопольская (Польша), Олкуска (Польша), Каил (Пакистан) и Казахская тонкошерстная (Казахстан) [14, 16, 17]. В то же время порода овец КГМ не стала исключением в контексте среднего значения F_{IS} – для 12 из 15 тонкорунных пород овец (не включая КГМ) показан сдвиг в сторону про-

Таблица 3. Генетическая характеристика выборок овец тонкорунных пород по результатам генотипирования STR-локусов

Порода (*n*)	STR	N_a	H_o	Ссылка
Казахстан				
казахский архарский меринос* (15)	12	7.08 ± 0.64	0.678 ± 0.051	[14]
казахская тонкошерстная* (15)		7.92 ± 0.56	0.744 ± 0.048	
Россия				
грозненская* (30)	11	9.00 ± 1.14	0.540 ± 0.089	[15]
ставропольская* (32)		9.20 ± 0.92	0.575 ± 0.061	
манычский меринос* (30)		8.20 ± 0.90	0.647 ± 0.055	
советский меринос* (23)		8.00 ± 0.75	0.651 ± 0.060	
сальская* (30)		8.50 ± 0.92	0.512 ± 0.089	
волгоградская* (30)		8.90 ± 1.22	0.525 ± 0.082	
дагестанская горная* (30)		9.00 ± 1.07	0.560 ± 0.079	
забайкальская тонкорунная** (30)		8.90 ± 0.77	0.891 ± 0.018	
кулундинская* (30)		7.20 ± 0.98	0.489 ± 0.095	
Пакистан				
каил* (47)	11	5.27 ± 1.49	0.766 ± 0.248	[16]
Польша				
старопольский меринос* (93)	11	7.18 ± 1.94	0.663 ± 0.167	[17]
олкуска** (88)		5.64 ± 1.29	0.689 ± 0.138	
великопольская* (100)		7.82 ± 2.23	0.710 ± 0.065	
Кыргызстан				
кыргызский горный меринос* (109)	12	10.50 ± 0.96	0.731 ± 0.023	–

Примечание. * – среднее значение $F_{IS} > 0$ (в совокупности по всем STR-локусам), ** – среднее значение $F_{IS} < 0$ (в совокупности по всем STR-локусам).

цессов инбридинга. Однако для КГМ это смещение не носит такого серьезного характера как, например, для пород Кулундинская и Сальская (Россия) [15].

Проблема сохранения генетических ресурсов домашних животных – одна из самых актуальных в мире. Для сохранения и поддержания на высоком уровне генетического разнообразия и эффективного использования малочисленных стад предложены различные алгоритмы. Установлено, что при разделении крупной популяции на субпопуляции, среди которых сохраняется обмен единичными особями (например баранами-производителями или ремонтными баранами), устойчивость системы в целом повышается, и потери аллелей не происходит [18]. В контексте проводимых исследований важным и актуальным их продолжением должен стать анализ субпопуляционной подразделенности данной выборки КГМ, т. к. своевременный обмен биологическим материалом между племенными заводами и специлистами, профессионально занимающимися разведением данной породы овец, будет способствовать поддержанию генетического разнообразия породы в целом.

Таким образом, по результатам оценки среднего числа аллелей на локус ($N_a = 10.500 \pm 0.957$), эффективного числа аллелей ($N_e = 4.556 \pm 0.394$), уровней наблюдаемой ($H_o = 0.731 \pm 0.023$) и ожидаемой ($H_e = 0.761 \pm 0.021$) гетерозиготностей можно сделать вывод о высоких значениях генетического разнообразия исследуемой выборки овец породы кыргызский горный меринос и ее значительном генетическом потенциале. Однако положительные значения индекса фиксации F_{IS} для девяти из 12-ти STR-локусов указывают на незначительное смещение генетического равновесия в сторону процессов инбридинга ($F_{IS} = 0.040 \pm 0.021$), не имеющего на данный момент критического значения. В то же время коэффициенты информационного полиморфизма (PIC = 0.732 ± 0.082) для всех локусов имели высокие значения, более 70% всех генотипов по анализируемым локусам находились в гетерозиготном состоянии.

Сравнительный анализ результатов молекулярно-генетического исследования кыргызского горного мериноса, разводимого в государственных племенных заводах Кыргызстан, с данными аналогичных исследований других тонкорунных

пород овец, позволяют сделать заключение о его значительном генетическом разнообразии.

По результатам проведенного исследования очевидно, что для сохранения кыргызского горного мериноса и поддержания оптимального уровня генетического разнообразия должен быть проведен контроль параметров генетической структуры субпопуляций. Данные исследования будут проведены в ближайшей перспективе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Кыргызской Республики в рамках Научного проекта “Использование молекулярно-генетических методов исследований и создание информационных ресурсов для интенсификации селекции овец в Кыргызской Республике”.

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. Об итогах единовременного пересчета скота и домашней птицы в Кыргызской Республике. http://www.stat.kg/ru/news/ob-itogah-edinovremennogo-perescheta-skota-i-domashnej-pticy-v-kyrgyzskoj-respublike/
2. *Лущихина Е.М., Чебодаев Д.В.* Кыргызский горный меринос // НАН КР-Б., 2014. 204 с.
3. *Исакова Ж.Т., Исаев М.А., Кипень В.Н и др.* Оценка генетического разнообразия кыргызской породы лошадей с использованием микросателлитных маркеров – расширенное геногеографическое исследование // Генетика. 2021. Т. 57. № 4. С. 420–428. https://doi.org/10.31857/S0016675821040032
4. *Денискова Т.Е., Доцев А.В., Охлопков И.М. и др.* Характеристика генетической структуры снежного барана (*Ovis nivicola lydekkeri*) Верхоянской горной страны // Генетика. 2018. Т. 54. № 3. С. 342–348. https://doi.org/10.7868/S0016675818030074
5. *Kharzinova V.R., Zinovieva N.A.* Pattern of genetic diversity in local and commercial pig breeds based on microsatellite analysis // Vavilov J. Genet. and Breeding. 2020. V. 24(7). P. 747–754. https://doi.org/10.18699/VJ20.669
6. *Lemesh V.A., Ageets V.Yu., Nosonova A.Yu. et al.* Genetic structure of the carp (*Cyprinus carpio carpio*) population grown in aquaculture in the Republic of Belarus // Rep. Natl Acad. Sci. of Belarus. 2021. V. 65. № 1. P. 68–75. https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-1-68-75
7. *Носова А.Ю., Кипень В.Н., Царь А.И., Лемеш В.А.* Дифференциация гибридного потомства белого (*Hypophthalmichthys molitrix* val.) и пестрого (*H. nobilis* rich.) толстолобиков на основании полиморфизма микросателлитных локусов // Генетика. 2020. Т. 56. № 3. С. 313–320. https://doi.org/10.31857/S0016675820030121
8. *Исакова Ж.Т., Тонкосунов Б.И., Кипень В.Н. и др.* Филогенетический анализ для кыргызской породы лошадей по 17 микросателлитным маркерам // Генетика. 2019. Т. 55. № 1. С. 94–99. https://doi.org/10.1134/S0016675819010077
9. *Sambrook J., Russell D.W.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.
10. *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(19). P. 2537–2539. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460
11. *Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M.* Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. 1992. V. 131(2). P. 479–491. https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479
12. Polymorphic information content & Heterozygosity [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.gene-calc.pl/pic. Дата доступа: 10.02.2021.
13. *Botstein D., White R.L., Skalnick M.H., Davies R.W.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. P. 314–331.
14. *Dossybayev K., Orazymbetova Z., Mussayeva A. et al.* Genetic diversity of different breeds of Kazakh sheep using microsatellite analysis // Arch. Anim. Breed. 2019. V. 62(1). P. 305–312. https://doi.org/10.5194/aab-62-305-2019
15. *Денискова Т.Е., Селионова М.И., Гладырь Е.А. и др.* Изменчивость микросателлитов в породах овец, разводимых в России // С.-хоз. биология. 2016. Т. 51. № 6. С. 801–810. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.6.801rus
16. *Ahmed Z., Babar M.E., Hussain T. et al.* Genetic diversity analysis of Kail Sheep by using microsatellite markers // J. Anim. Plant Sci. 2014. V. 24(5). P 1329–1333.
17. *Szumiec A., Radko A., Koseniuk A. et al.* Application of 11 STR markers for the evaluation of genetic variation in sheep. The global standard for livestock date // ICAR Technical Series. 2018. V. 23. P. 141–145.
18. *Столповский Ю.А., Захаров-Гезехус И.А.* Проблема сохранения генофондов доместицированных животных // Вавиловский журн. генет. селекции. 2017. Т. 21. № 4. С. 477–486. https://doi.org/10.18699/VJ17.266

Genetic Diversity Research in the Population of the Kyrgyz Mountain Merino Using Microsatellite Loci

Zh. T. Isakova[a], *, A. B. Bekturov[b], T. D. Chortonbaeb[b], V. N. Kipen[c], S. B. Mukeeva[a], U. A. Shergaziev[b], and K. A. Aitbaev[a]

[a] *Institute of Molecular Biology and Medicine, Bishkek, 720040 Kyrgyzstan*

[b] *Skryabin Kyrgyz National Agrarian University, Bishkek, 720005 Kyrgyzstan*

[c] *Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus*

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

The aim was to ascertain genetic structure and diversity of Kyrgyz mountainous merino via microsatellite DNA markers. We analyzed DNA samples of 109 Kyrgyz mountaneous merino specimens, bred in three state breeding factories (STB), including "Orgochor" in the Issykul Province, "Katta-Taldyk" in the Osh Province and STB named after Luschikhin in the Talas Province. We identified 126 alleles in 12 microsatellite loci (McM042, INRA006, McM527, ETH152, CSRD247, OarFCB20, INRA172, INRA063, MAF065, MAF214, INRA005, INRA023). There were 6 to 16 alleles in each locus (mean 10.500 ± 0.957 alleles per locus). We identified 67 rare alleles (prevalence less than 5.0%), which made 53.2% of all alleles found. The greatest number of alleles were found in INRA023 (12 alleles), INRA005 (13 alleles), OarFCB20 and INRA063 (14 in each) and CSRD247 (16 alleles) autosomal loci. Based on the mean number per locus (N_a = = 10.500 ± 0.957), number of efficient alleles (N_e = 4.556 ± 0.394), the observed (H_o = 0.731 ± 0.023) an expected (H_e = 0.761 ± 0.021) heterozygosity, we conclude high genetic diversity of the selected sheep sample attributed to Kyrgyz mountainous merino and its significant genetic potential.

Keywords: Kyrgyz mountain merino, DNA, microsatellite markers, genotyping.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 97–105

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.174.015.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ СПАРИВАНИЯ У ЖИВОРОДЯЩЕГО МОРСКОГО ОКУНЯ *Sebastes taczanowskii* Steindachner, 1880

© 2023 г. Н. М. Батищева[1], *, В. Д. Ягодина[1], В. А. Брыков[1]

[1]Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690041 Россия

**e-mail: batishchevanata@gmail.com*

Поступила в редакцию 02.03.2022 г.
После доработки 13.04.2022 г.
Принята к публикации 11.05.2022 г.

Внутреннее оплодотворение и живорождение характерно для некоторых видов рода *Sebastes*. У некоторых видов этого рода показано наличие полиандрии. Мы использовали пять микросателлитных маркеров и три основных статистических подхода для оценки уровня полиандрии в дикой популяции восточного морского окуня (*Sebastes taczanowskii*). В некоторых кладках нами обнаружено множественное отцовство. Настоящая работа – первое доказательство множественного отцовства у дальневосточного морского окуня. Вероятно, полиандрия является весьма распространенной стратегией у этого вида, обитающего в дальневосточных морях, а также важным фактором в регулировании генетического разнообразия и продуктивности.

Ключевые слова: репродуктивная стратегия, микросателлиты, полиандрия, скорпенообразные, *Sebastes*.

DOI: 10.31857/S0016675823010022, **EDN:** CLDIBU

Для рыб характерно большое разнообразие репродуктивных стратегий. Можно выделить несколько основных характеристик, связанных с ними: число скрещивающихся особей, типы размножения, системы спаривания, соотношение полов, вторичные половые признаки, место и время размножения, способ оплодотворения, эмбриональное развитие и забота о потомстве [1].

Системы спаривания у рыб чрезвычайно разнообразны: от самооплодотворения и социальной моногамии до группового нереста [2–8]. В целом существует четыре типа генетических систем спаривания: а) моногамия (в истинной моногамной системе спаривания у каждой особи есть один партнер и все потомство является полными братьями и сестрами); б) полигиния (полигамия – у самцов есть несколько успешных спариваний, а у самок – одно); в) полиандрия (полигамия самок – это когда у самок есть несколько успешных спариваний, а у самцов – только одно); г) промискуитет (полигамия обоих полов, оба пола спариваются с несколькими партнерами [2, 3, 5–8].

Анализ генетических систем спаривания, основанных на наблюдениях и молекулярных данных, дает фундаментальные понимания о поведении, экологии и эволюции репродуктивных стратегий животных [6, 9]. Активное применение молекулярно-биологических методов в последние два десятилетия во многом изменило представление о тех или иных системах спаривания у рыб.

Цель нашего исследования состояла в определении генетической системы спаривания у одного из видов семейства Scorpaenidae, в котором лишь для представителей подсемейства Sebastinae характерно живорождение. Входящий в это подсемейство род *Sebastes*, насчитывающий более 110 видов, примечателен большим разнообразием. Представителей этого рода можно встретить от приливной зоны до глубин более 1000 м [10, 11]. Часть из них живородящие, с внутренним оплодотворением и развитием личинок [11]. Некоторые способны удерживать сперму после спаривания для более позднего оплодотворения [12, 13]. В отличие от большинства костистых рыб морские окуни оплодотворяют икру внутри особей и выпускают живых примитивно развитых (по сравнению с другими живородящими (например, большинство акул)) [14] плавающих личинок. Личинки высвобождаются на стадии желточного мешка, что поз-

воляет им избежать высокой смертности, связанной с ранними личиночными стадиями [15, 16]. Морские окуни очень плодовиты, с выводками, содержащими от тысяч до миллионов личинок на самку [10, 11, 17]. Генетические исследования выявили множественное отцовство у 15 видов рода *Sebastes*: *S. schlegeli* [18], *S. atrovirens*, *S. brevispinis*, *S. diploproa*, *S. elongates*, *S. goodie*, *S. jordani*, *S. proriger*, *S. ruberrimus*, *S. rufus* [14], *S. inermis* [19], *S. alutus* [20], *S. melanops* [21], *S. maliger* [10, 12], *S. caurinus* [10].

Восточный морской окунь (*Sebastes taczanowskii* Steindachner, 1880), как и другие виды рода *Sebastes*, является живородящим [22]. Биология *S. taczanowskii* относительно хорошо изучена [23–27], но исследований о репродуктивном поведении на основе молекулярных данных не проводилось. В рамках настоящего исследования на внутрипопуляционном уровне мы проверили гипотезу множественного отцовства и дали оценку уровню полиандрии у восточного морского окуня, используя генотипические данные, чтобы восполнить этот пробел в знаниях. Основываясь на предыдущих оценках множественного отцовства у рода *Sebastes*, пойманных в дикой природе, и наличии полигамных самок у близкородственного вида *S. schlegeli*, мы предположили, что полиандрия возможна и у данного вида. Для анализа мы использовали микросателлитные локусы. На сегодняшний день наиболее эффективным инструментом для изучения полиандрии в природе является микросателлитный анализ [28]; использование данного типа маркеров для анализа генетического происхождения и родства было проверено на многих видах [29–35].

Микросателлиты – фрагменты ДНК с большим количеством тандемно повторенных коротких последовательностей, имеющих длину от 1 до 6 пар нуклеотидов [36]. Основными преимуществами микросателлитных маркеров являются: кодоминантный тип наследования, высокий уровень полиморфизма и гипервариабельность, высокая скорость мутаций, легкая пробоподготовка [37].

Микросателлитные маркеры также имеют некоторые недостатки, такие как: видоспецифичность (пара микросателлитных праймеров редко работает для широкого круга таксономических групп в связи с большой мутационной скоростью, поэтому праймеры обычно разрабатываются заново для каждого вида [38]), скрытое аллельное разнообразие (на практике можно столкнуться с явлением гомоплазии), проблемы с амплификацией, приводящие к ошибкам генотипирования (к примеру, из-за мутаций в сайтах отжига праймеров возможно появление нулевых аллелей – без амплификации целевого продукта ПЦР). Нулевые аллели могут приводить к смещенной оценке аллельных и генотипических частот и недооценке гетерозиготности [38].

Несмотря на вышеперечисленные изъяны [39–43], анализ микросателлитных локусов остается незаменимым инструментом для исследований родословных и семейного анализа благодаря их полиморфизму, разработке подходящих статистических методов и большого количества данных генотипирования. Как правило, требуется всего несколько микросателлитных маркеров для получения высокой статистической значимости обнаружения множественных спариваний [32].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мы проверили наличие или отсутствие множественного отцовства у особей из естественной популяции *S. taczanowskii* путем генотипического отнесения самок к их выводкам с использованием микросателлитных локусов. Материалом для исследования послужили 48 самок восточного морского окуня, пойманных при помощи удочки в одной локальности зал. Восток в мае–июне 2013 г. (зал. Петра Великого Японского моря).

Самок восточного окуня вскрывали. Ячейки гонад, состоящих из икринок с эмбрионами и предличинок, оценивали как возможность нескольких последовательных оплодотворений (брудеры). При микроскопическом исследовании было видно, что в некоторых случаях эмбриональное развитие икринок находится на разных стадиях онтогенеза, что противоречит ранее полученным данным на основе наблюдений [44].

Чтобы гарантировать обнаружение производителей, яичники вскрывали и отбирали эмбрионы из передней, средней и задней частей каждого яичника для получения репрезентативного образца генотипического пула потомства. Объединенную пробу потомства от каждой отдельной самки тщательно перемешивали и образец объемом примерно 1–2 мл фиксировали в 95%-ном этаноле.

Геномную ДНК экстрагировали из образцов мышечной ткани самок с использованием стандартного фенол/хлороформного метода [45]. Аналогичным образом выделяли ДНК из эмбрионов. Подробное описание условий проведения амплификации микросателлитной ДНК можно найти в опубликованной ранее статье [46].

ПЦР-продукт проверяли с помощью гель-электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. 1 мкл ПЦР-смеси, содержащую формамид, добавляли в

смесь для генотипирования. Электрофоретическое разделение полученных продуктов осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI3130 (Applied Biosystems Inc., США) с применением размерного стандарта (S450) (COrDIS). Определение размера аллелей проводили с помощью программного пакета GeneMapper ver. 5.0 (Applied Biosystems).

Предварительные данные по оценке качества амплификации микросателлитных маркеров, уровень их полиморфизма, частоты аллелей, гетерозиготность, наличие нуль-аллелей и соответствие частот генотипов уравнению Харди–Вайнберга (HWP) для *S. taczanowskii* опубликованы ранее [46]. Пять высокополиморфных локусов SR 7-2, SR 7-7, SR 7-25 [47] и Sma3, Sma10 [48] были выбраны для генотипирования всех образцов, чтобы определить количество производителей для каждого выводка в этом исследовании.

Для анализа и установления отцовства существуют шесть основных статистических подходов. Подробную информацию о каждом методе можно найти в обзорах [9, 49–51].

В настоящей работе мы использовали три метода и соответствующие программные пакеты: метод исключения, применяемый в программе VITASSIGN V8-5.1.xlsm [52]; GERUD 2.0 [53] для метода реконструкции отцовства; COLONY 2.0 [54] для реконструкции родства.

Программное обеспечение VITASSIGN, GERUD и COLONY для определения отцовства было использовано в соответствии с рекомендациями разработчиков. Реконструкция отсутствующих генотипов принималась, когда апостериорные вероятности генотипов, выведенных COLONY, были близки к 1.

Основной принцип в методике генетического определения биологического родства заключается в поиске и анализе совпадающих аллелей у предполагаемых родителей и потомков. На первом этапе мы вручную проверили все генотипы потомства на наличие и соответствие у них материнских аллелей, определив генотип матери и сравнив аллели по пяти локусам, где один из аллелей каждого локуса должен быть представлен у потомства. Генотипы у одного или нескольких потомков, в которых аллель матери не найден, были исключены из анализа. Такое событие означает, что произошла мутация в праймерных сайтах.

Так как вид живородящий, материнство каждого потомства идентифицировалось априори. Сопоставление генотипов потомства и матерей позволило провести идентификацию происхождения и оценить количество предполагаемых отцов. На основании генотипов потомков и матерей удалось смоделировать генотипы самцов, сравнив полученные данные из разных программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для реконструкции родства и определения уровня полиандрии во всех выбранных для анализа программных пакетах использовали один и тот же набор данных. Используя коэффициент ошибки 0.02, были получены идентичные результаты для метода исключения и реконструкции родства. По результатам, полученным методом реконструкции родительства (GERUD), уровень репродукции (количество самцов, принимающих участие в оплодотворении) оказался меньше. В результате исключения образцов с высоким процентом ошибок генотипирования, которые приводят к несовпадению материнских аллелей с аллелями у потомства, были использованы только 12 самок из 48. Сравнение аллелей у материнских особей и потомков проводилось по пяти полиморфным локусам.

Мы нашли доказательства множественного отцовства во всех 12 исследованных выводках. В частности, выводки двух самок имели двух производителей, шесть от трех производителей, три самки от четырех и одна самка от шести производителей (табл. 1). Реконструированные генотипы самцов показали, что в нашей выборке 21 самец спаривался с 12 самками, или семь самцов оплодотворили по одной самке, шесть – двух, пять спаривались с тремя, оставшиеся три самых производительных самца спарились с четырьмя, пятью и шестью самками соответственно (табл. 2).

Результаты моделирования каждого ряда потомков в программах COLONY и VITASSIGN показали, что мы правильно определили минимальное количество производителей, оплодотворяющих каждый выводок, с вероятностью 0.95. Эффективное количество самцов, участвовавших в оплодотворении одной самки, варьировало от одного до шести.

Еще одним генетическим доказательством высокого показателя множественных спариваний у самок восточного морского окуня является то, что выводки всех категорий рыб состоят из групп потомства-полусибсов по данным программы COLONY.

ОБСУЖДЕНИЕ

Множественное отцовство может быть стратегией выживания потомства в неблагоприятных условиях для морских окуней, позволяя самке увеличить генетическое разнообразие личинок, тем самым повышая вероятность выживания [10,

Таблица 1. Уровень полиандрии у *S. taczanowskii*

Самки*	Число генотипированного потомства	Присвоенные самцы-отцы**	Число предполагаемых отцов по результатам программы VITASSIGN	Число предполагаемых отцов по результатам программы GERUD	Число предполагаемых отцов по результатам программы COLONY
MM15	4	F1, F2	2	2	2
MM19	4	F3, F4	2	2	2
MM20	4	F1, F5, F6	3	2	3
MM51	3	F9, F10, F11	3	2	3
MM55	4	F9, F11, F12, F13	4	2	4
MM58	6	F8, F11, F14, F15, F16, F17	6	3	6
MM74	5	F13, F14, F18	3	2	3
MM81	4	F1, F16, F17, F20	4	2	4
MM86	3	F1, F7, F21	3	2	3
MM88	5	F7, F12, F21, F22	4	2	4
MM94	3	F7, F10, F21	3	2	3
M100	4	F2, F9, F10	3	2	3

* – генотипированные матери. ** – генотипы предполагаемых отцов по результатам программы COLONY.

Таблица 2. Уровень полигинии у *S. taczanowskii*

Самцы*	VITASSIGN	COLONY	Самцы*	VITASSIGN	COLONY	Самцы*	VITASSIGN	COLONY
F1	4	4	F8	1	1	F15	1	1
F2	2	2	F9	3	3	F16	2	2
F3	1	1	F10	3	3	F17	2	2
F4	1	1	F11	3	3	F18	1	1
F5	5	5	F12	2	2	F20	1	1
F6	6	6	F13	2	2	F21	3	3
F7	3	3	F14	2	2	F22	1	1

Примечание. Цифры обозначают число самок, спарившихся с данным самцом. * – нумерация предполагаемых отцов по результатам программы COLONY.

14, 20]. Еще одно потенциальное преимущество многократного спаривания для отдельных самок – потенциальное снижение вероятности неполного оплодотворения яиц в выводке [13]. Как следствие – получение преимуществ для них. На уровне популяции – выигрыш от снижения инбредной депрессии и увеличения эффективного размера популяции [14]. Было показано, что множественное отцовство обеспечивает генетические преимущества [55], улучшает количество и качество потомства [56], увеличивает индивидуальную приспособленность [57] и количество жизнеспособного потомства в выводке [58].

Множественное отцовство может иметь фундаментальное влияние на генетическое разнообразие популяции. Высокое генетическое разнообразие у *S. taczanowskii* [46] сходно с таковым для других морских окуней: *S. thompsoni* [59], *S. pinniger* [60], *S. schlegeli* [61], *S. atrovirens* [13] и *S. inermis* [19].

В настоящем исследовании мы использовали высокополиморфные микросателлитные локусы для скрининга отцовства, учитывая данные, полученные на других исследованиях видов рода *Sebastes* [10, 12–14, 18–20, 62, 63]. У исследованных 15 видов этого рода в основном использовали пять–шесть локусов и метод реконструкции родительства. Метод категориального распределения и реконструкции родительства использовали Согард с соавт. [13].

Мы использовали три основных подхода, в которых применяются различные статистические алгоритмы. Лишь совокупный результат полученных данных может помочь с высокой апостериорной вероятностью (выше 0.95) адекватно оценить репродуктивную стратегию данного вида с помощью микросателлитного анализа, так как в каждом подходе имеются свои ограничения:

COLONY [50, 54] – маркеры должны быть в равновесии по сцеплению, высокополиморфны; реконструкция родителей гораздо более эффективна на больших массивах потомства. Точность быстро повышается за счет увеличения количества маркерной информации, что не всегда возможно.

GERUD 2.0 [64] – не может учитывать мутации, нулевые аллели или отсутствующие данные. GERUD чрезвычайно требователен к вычислительным ресурсам с более чем четырьмя или пятью локусами. Также программа не будет включать данные, которые отсутствуют у общего родителя.

VITASSIGN [52] – ошибки генотипирования или мутации являются основной причиной низкой мощности метода, а также отсутствие данных хотя бы об одном из родителей.

Доля установления отцовства совпала на 100% в программах VITASSIGN и COLONY, продемонстрировав силу сочетания метода исключения и метода реконструкции родства при наличии хотя бы одного реального родительского генотипа. Такой подход стал возможным благодаря использованию успешно реконструированных отсутствующих генотипов самцов, исправлений ошибок генотипирования, рассчитанных с помощью COLONY, и возможного “неисключения” отцовства конкретного индивидуума в отношении данного потомства с помощью VITASSIGN [65]. Методы правдоподобия обычно дают более высокие показатели назначения, чем исключения с наборами маркеров низкой мощности. В нашем случае эти показатели полностью совпали. Хотя есть работы, где отцовство оставалось ниже, чем ожидалось с помощью моделирования VITASSIGN [66].

Уровень репродукции с помощью программного пакета GERUD оказался ниже, так как в данной программе просчитывается минимальное количество возможных отцов. Использовать генотипы, выведенные GERUD, оказалось проблематичным из-за их большого числа комбинаций.

Результаты данного исследования ясно продемонстрировали наличие полиандрии в природной популяции морского окуня во всех 12 проанализированных массивах потомства (100% потомков). Применение мультилокусного генотипирования [67] предполагает вероятность недооценки числа самцов из-за выборочности взятия тканей в гонадах самки [10, 11].

Половина самок во всех исследованных выводках спаривались с тремя самцами. Двадцать один самец принял участие в оплодотворении 12 множеств полиандрических потомков. Частота спаривания с самками самцов F1, F5, F6 на порядок выше, чем у остальных восемнадцати, что может свидетельствовать о перекосе репродуктивного успеха самцов. Мы смогли определить успех каждого отца в общем массиве, но, к сожалению, установить успех самца для каждого потомка невозможно, так как для этого необходимо генотипировать гораздо больший массив потомства от каждой самки.

Полученные результаты и выводы хорошо согласуются с предыдущими работами по живородящим окуням. На сегодняшний день у 27 видов морских окуней исследована система спаривания. Из них у 15 было описано множественное отцовство; число самцов, успешно участвующих в оплодотворении одной самки у *S. schlegeli*, – 6; у

S. ruberrimus, *S. alutus*, *S. melanops*, *S. elongates* – 4; у *S. atrovirens*, *S. brevispinis*, *S. diploproa*, *S. goodie*, *S. jordani*, *S. proriger*, *S. rufus*, *S. maliger* – 3; у *S. inermis*, *S. caurinus* – 2. Уровень генетического разнообразия и полиандрии сопоставим с данными работ [10, 12, 14, 18–21]. Также можно предположить наличие полигамии обоих полов при определении генетической системы спаривания данного вида.

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. *Murua H., Saborido-Rey F.* Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic // J. Northwest Atlantic Fish. Sci. 2003. V. 33. P. 23–31.
2. *DeWoody J.A., Avise J.C.* Genetic perspectives on the natural history of fish mating systems // J. Heredity. 2001. V. 92(2). P. 167–172. https://doi.org/10.1093/jhered/92.2.167
3. *Haddeland P.J., Junge C., Serbezov D., Vøllestad L.A.* Genetic parentage analysis confirms a polygynandrous breeding system in the European grayling (*Thymallus thymallus*) // PLoS One. 2015. V. 10(3). e0122032. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122032
4. *Ribolli J., Mino C.I., Zaniboni-Filho E. et al.* Preliminary insights into the genetic mating system of Neotropical *Salminus brasiliensis*: Kinship assignment and parental reconstruction reveal polygynandry // Ichthyol. Research. 2016. V. 63(1). P. 187–191. https://doi.org/10.1007/s10228-015-0487-2
5. *Smith C., Wootton R.J.* The remarkable reproductive diversity of teleost fishes // Fish and Fisheries. 2016. V. 17(4). P. 1208–1215. https://doi.org/10.1111/faf.12116
6. *Avise J.C., Jones A.G., Walker D. et al.* Genetic mating systems and reproductive natural histories of fishes: Lessons for ecology and evolution // Annual Review Genet. 2002. V. 36(1). P. 19–45. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.030602.090831
7. *Karageorge K.W.* Microsatellite DNA Assessment of the Genetic Mating System of the Viviparous Black Rockfish, *Sebastes melanops*. California State Univ., Long Beach, 2009.
8. *Nunney L.* The influence of mating system and overlapping generations on effective population size // Evolution. 1993. V. 47(5). P.1329–1341. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb02158.x
9. *Jones A.G., Ardren W.R.* Methods of parentage analysis in natural populations // Mol. Ecol. 2003. V. 12(10). P. 2511–2523. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01928.x
10. *Johansson M.L., Clifford K., Fodness B. et al.* Mate selection in captive-breeding rockfishes *Sebastes* spp.: Inference from parentage analysis and the major histocompatibility complex (MHC) // Marine Ecol. Progress Series. 2012. V. 460. P. 195–206. https://doi.org/10.3354/meps09803
11. *Love M.S., Yoklavich M., Thorsteinson L.K.* The Rockfishes of the Northeast Pacific. Univ. California Press, 2002.
12. *Gray A.K., Rodgveller C.J., Lunsford C.R.* Evidence of multiple paternity in quillback rockfish (*Sebastes maliger*) // U.S. Dep Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-AFSC-303. 2015. P. 25. https://doi.org/10.7289/V5PZ56T3
13. *Sogard S.M., Gilbert-Horvath E., Anderson E.C. et al.* Multiple paternity in viviparous kelp rockfish, *Sebastes atrovirens* // Environ. Biol. Fishes. 2008. V. 81(1). P. 7–13. https://doi.org/10.1007/s10641-006-9170-9
14. *Hyde J.R., Kimbrell C., Robertson L. et al.* Multiple paternity and maintenance of genetic diversity in the livebearing rockfishes *Sebastes* spp. // Marine Ecol. Progress Series. 2008. V. 357. P. 245–253. https://doi.org/10.3354/meps07296
15. *Boehlert G.W., Yamada J.* In Rockfishes of the genus *Sebastes*: Their reproduction and early life history // Introduction to the Symposium on Rockfishes. Springer. 1991. P. 9–14.
16. *Boehlert G.W., Yoklavich M.M.* Reproduction, embryonic energetics, and the maternal-fetal relationship in the viviparous genus *Sebastes* (Pisces: Scorpaenidae) // Biol. Bulletin. 1984. V. 167(2). P. 354–370.
17. *Маркевич А.И.* Состав группировок, экология и поведение морских окуней рода *Sebastes* Дальневосточного морского заповедника (залив Петра Великого, Японское море): Дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: ИБМ ДВО РАН, 1998. С. 149.
18. *Gao T., Ding K., Song N. et al.* Comparative analysis of multiple paternity in different populations of viviparous black rockfish, *Sebastes schlegelii*, a fish with long-term female sperm storage // Marine Biodiversity. 2018. V. 48(4). P. 2017–2024. https://doi.org/10.1007/s12526-017-0713-4
19. *Gonzalez E.B., Murakami T., Teshima Y. et al.* Paternity testing of wild black rockfish *Sebastes inermis* (brownish type) from the Seto Inland Sea of Japan // Ichthyol. Research. 2009. V. 56(1). P. 87–91. https://doi.org/10.1007/s10228-008-0055-0
20. *Van Doornik D.M., Parker S.J., Millard S.R. et al.* Multiple paternity is prevalent in Pacific ocean perch (*Sebastes alutus*) off the Oregon coast, and is correlated with female size and age // Environmental Biol. Fishes. 2008. V. 83(3). P. 269–275. https://doi.org/10.1007/s10641-008-9331-0
21. *Karageorge K.W., Wilson R.R., Jr.* An integrative mating system assessment of a nonmodel, economically important Pacific rockfish (*Sebastes melanops*) reveals nonterritorial polygamy and conservation implications

for a large species flock // Ecol. Evol. 2017. V. 7(24). P. 11277–11291. https://doi.org/10.1002/ece3.3579

22. *Wourms J.P.* Reproduction and development of Sebastes in the context of the evolution of piscine viviparity // Environ. Biol. Fishes. 1991. V. 30(1). P. 111–126. https://doi.org/10.1007/BF02296882
23. *Колпаков Н.В.* О биологии малого *Sebastes minor* и восточного *S. taczanowskii* (Sebastidae) морских окуней прибрежных вод северного Приморья // Вопр. ихтиологии. 2006. Т. 46. № 3. С. 334–344.
24. *Haldorson L., Love M.* Maturity and fecundity in the rockfishes, *Sebastes* spp. // Mar. Fish. Rev. 1991. V. 53. № 2. P. 25–31.
25. *Hayakawa Y., Munehara H.* Comparison of ovarian functions for keeping embryos by measurement of dissolved oxygen concentrations in ovaries of copulatory and noncopulatory oviparous fishes and viviparous fishes // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2003. V. 295. № 2. P. 245–255. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00297-1
26. *Nagasawa T., Ishida R., Sasaki M.* Development of *Sebastes taczanowskii* (Scorpaenidae) in the Sea of Japan off Hokkaido with a key to species of larvae // Ichthyol. Res. 2008. V. 55. № 2. P. 124–132. https://doi.org/10.1007/s10228-007-0016-z
27. *Takahashi H., Takano K., Takemura A.* Reproductive cycles of *Sebastes taczanowskii*, compared with those of other rockfishes of the genus *Sebastes* // Environ. Biol. Fishes. 1991. V. 30. № 1–2. P. 23–30. https://doi.org/10.1007/BF02296873
28. *Taylor M.L., Price T.A.R., Wedell N.* Polyandry in nature: A global analysis // Trends Ecol. Evol. 2014. V. 29 (7). P. 376–383. https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.005
29. *Borrell Y.J., Pineda H., McCarthy I. et al.* Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. // Heredity. 2004. V. 92(6). P. 585–593. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.021
30. *Gomes M.L., Hatanaka T., de Campos W.N., Wasko A.P.* Assessing paternity in Japanese quails (*Coturnix japonica*) using microsatellite markers-inferences for its mating system and reproductive success // Brazil. J. Poultry Science. 2013. V. 15(4). P. 329–338.
31. *Liu J.-X., Tatarenkov A., O'Rear T.A. et al.* Molecular evidence for multiple paternity in a population of the viviparous tule perch *Hysterocarpus traski* // J. Heredity. 2013. V. 104(2). P. 217–222. https://doi.org/10.1093/jhered/ess105
32. *Neff B.D., Pitcher T.E.* Assessing the statistical power of genetic analyses to detect multiple mating in fishes // J. Fish Biology. 2002. V. 61(3). P. 739–750. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb00908.x
33. *Norris A.T., Bradley D.G., Cunningham E.P.* Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers // Aquaculture. 2000. V. 182(1–2). P. 73–83. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00247-1
34. *Porta J., Porta J.M., Martínez-Rodríguez G., Alvarez M.C.* Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites // Aquaculture. 2006. V. 251(1). P. 46–55. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.019
35. *Sekino M., Sugaya T., Hara M., Taniguchi N.* Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* // Aquaculture. 2004. V. 233(1–4). P. 163–172. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.008
36. *Powell W., Machray G.C., Provan J.* Polymorphism revealed by simple sequence repeats // Trends in Plant Sci. 1996. V. 1. P. 215–222. https://doi.org/10.1016/1360-1385(96)86898-1
37. *Abdul-Muneer P.M.* Application of microsatellite markers in conservation and fisheries management: Recent advances in population structure analysis and conservation strategies // Genet. Research Intern. 2014. V. 2014. P. e691759. https://doi.org/10.1155/2014/691759
38. *Selkoe K.A., Toonen R.J.* Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers // Ecol. Letters. 2006. V. 9(5). P. 615–629. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x
39. *Bonin A., Bellemain E., Bronken Eidesen P. et al.* How to track and assess genotyping errors in population genetics studies // Mol. Ecol. 2004. V. 13(11). P. 3261–3273. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02346.x
40. *Guichoux E., Lagache L., Wagner S. et al.* Current trends in microsatellite genotyping // Mol. Ecol. Resources. 2011. V. 11(4). P. 591–611. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x
41. *Hoffman J.I., Amos W.* Microsatellite genotyping errors: Detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion // Mol. Ecol. 2005. V. 14(2). P. 599–612. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02419.x
42. *Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Taberlet P.* Genotyping errors: causes, consequences and solutions // Nature Rev. Genet. 2005. V. 6(11). P. 847–859. https://doi.org/10.1038/nrg1707
43. *Галинская Т.В., Щепетов Д.М., Лысенков С.Н.* Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять // Генетика. 2019. Т. 55. № 6. С. 617–632.
44. *Маркевич А.И., Гнюбкина В.П.* Особенности позднего эмбрионального развития и предличинок восточного *Sebastes taczanowskii* и малого *S. minor* морских окуней (Sebastidae) в заливе Петра Великого Японского моря // Изв. ТИНРО. 2015. С. 183. https://doi.org/10.26428/1606-9919-2015-183-112-119
45. *Asahida T., Kobayashi T., Saitoh K., Nakayama I.* Tissue preservation and total DNA extraction form fish

stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea // Fish. Science. 1996. V. 62(5). P. 727–730. https://doi.org/10.2331/fishsci.62.727

46. *Batishcheva N.M., Brykov V.A.* The search of polymorphic microsatellite loci for *Sebastes taczanowskii* Steindachner, 1880 (Sebastidae) // Rus. J. Marine Biol. 2021. V. 47(4). P. 322–324. https://doi.org/10.1134/S1063074021040027

47. *Westerman M.E., Buonaccorsi V.P., Stannard J.A. et al.* Cloning and characterization of novel microsatellite DNA markers for the grass rockfish, *Sebastes rastrelliger*, and cross-species amplification in 10 related Sebastes spp. // Mol. Ecol. Notes. 2005. V. 5(1). P. 74–76. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00837.x

48. *Wimberger P., Burr J., Gray A. et al.* Isolation and characterization of twelve microsatellite loci for rockfish (*Sebastes*) // Marine Biotechnol. 1999. V. 1(3). P. 311–315.

49. *Flanagan S.P., Jones A.G.* The future of parentage analysis: From microsatellites to SNPs and beyond // Mol. Ecol. 2019. V. 28(3). P. 544–567. https://doi.org/10.1111/mec.14988

50. *Jones A.G., Small C.M., Paczolt K.A., Ratterman N.L.* A practical guide to methods of parentage analysis // Mol. Ecol. Resources. 2010. V. 10(1). P. 6–30. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02778.x

51. *Yue G.H., Xia J.H.* Practical considerations of molecular parentage analysis in fish // J. World Aquaculture Society. 2014. V. 45(2). P. 89–103. https://doi.org/10.1111/jwas.12107

52. *Vandeputte M., Mauger S., Dupont-Nivet M.* An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6(1). P. 265–267. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01167.x

53. *Jones A.G.* GERUD 2.0: A computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents // Mol. Ecol. Notes. 2005. V. 5(3). P. 708–711. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01029.x

54. *Jones O.R., Wang J.* COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data // Mol. Ecol. Resources. 2010. V. 10(3). P. 551–555. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x

55. *Jennions M.D., Petrie M.* Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits // Biol. Reviews. 2000. V. 75(1). P. 21–64. https://doi.org/10.1017/S0006323199005423

56. *Evans J.P., Magurran A.E.* Multiple benefits of multiple mating in guppies // Proc. Natl Acad. Sci. 2000. V. 97(18). P. 10074–10076. https://doi.org/10.1073/pnas.180207297

57. *Neff Bryan D., Pitcher T.E.* Genetic quality and sexual selection: An integrated framework for good genes and compatible genes // Mol. Ecol. 2005. V. 14(1). P. 19–38. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02395.x

58. *Konior M., Radwan J., Kolodziejczyk M.* Polyandry increases offspring fecundity in the bulb mite // Evolution. 2001. V. 55(9). 1893–1896. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00838.x

59. *Sekino M., Takagi N., Hara M., Takahashi H.* Analysis of microsatellite DNA polymorphisms in rockfish *Sebastes* thompsoni and application to population genetics studies // Marine Biotechnol. 2001. V. 3(1). P. 45–52. https://doi.org/10.1007/s101260000046

60. *Gomez-Uchida D., Hoffman E.A., Ardren W.R., Banks M.A.* Microsatellite markers for the heavily exploited canary (*Sebastes pinniger*) and other rockfish species // Mol. Ecol. Notes. 2003. V. 3(3). P. 387–389. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00458.x

61. *Yoshida K., Nakagawa M., Wada S.* Multiplex PCR system applied for analysing microsatellite loci of Schlegel's black rockfish, *Sebastes schlegeli* // Mol. Ecol. Notes. 2005. V. 5(2). P. 416–418. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00945.x

62. *Karageorge K.W., Wilson R.R., Jr.* An integrative mating system assessment of a nonmodel, economically important Pacific rockfish (*Sebastes melanops*) reveals nonterritorial polygamy and conservation implications for a large species flock // Ecol. Evol. 2017. V. 7(24). P. 11277–11291. https://doi.org/10.1002/ece3.3579

63. *Ng W.-C., Sadovy Y., Leung F.C.C.* Mating system of the rockfish, *Sebastiscus marmoratus* as revealed by DNA fingerprinting // Ichthyol. Research. 2003. V. 50(4). P. 339–348. https://doi.org/10.1007/s10228-003-0178-2

64. *Croshaw D.A., Peters M.B., Glenn T.C.* Comparing the performance of analytical techniques for genetic parentage of half-sib progeny arrays // Genet. Res., Camb. 2009. V. 91. P. 313–325. https://doi.org/10.1017/S0016672309990231

65. *Doan Q.K., Vandeputte M., Chatain B. et al.* Combining VITASSIGN and COLONY: An efficient practical procedure for parental assignment with missing parents // ISGA XII. 2015. Santiago de Compostela, Spain. hal-01535335

66. *Allal F., Doan Q.K., Chatain B. et al.* Combining vitassign and colony for pedigree reconstruction in a case of factorial mating with missing parental genotypes // Aquaculture. Cutting Edge Science in Aquaculture. 2015. August 23–26. Montpellier. France.

67. *Bos D.H., Gopurenko D., Williams R.N., DeWoody J.A.* Inferring population history and demography using microsatellites, mitochondrial DNA, and major histocompatibility complex (MHC) genes // Evolution: Intern. J. Organic Evolution. 2008. V. 62(6). P. 1458–1468. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00364.x

Evidence of the Genetic Mating System in Viviparity White-Edged Rockfish, *Sebastes taczanowskii* Steindachner, 1880

N. M. Batishcheva[a], *, V. D. Yagodina[a], and V. A. Brykov[a]

[a]*Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia*

**e-mail: batishchevanata@gmail.com*

Internal fertilization and viviparity are characteristic of some species of the genus *Sebastes*. Polyandry has also been reported for some species of this genus. We used five microsatellite markers and three main statistical approaches to estimate the level of polyandry in a wild population of white-edged rockfish (*Sebastes taczanowskii*). In some clutches, we detected multiple paternity. This study is the first record of multiple paternity in white-edged rockfish from the Far East. Polyandry is probably quite a widespread strategy in this species inhabiting the Far Eastern seas, and also an important factor in the regulation of genetic diversity and productivity.

Keywords: reproductive strategy, microsatellites, polyandry, scorpaeniformes, *Sebastes*.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 106–114

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

УДК 575.174:599.9

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОФОНД УКРАИНЦЕВ В КОНТЕКСТЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ ЦЕЛЫХ МИТОГЕНОМОВ У СЛАВЯНСКИХ НАРОДОВ[1]

© 2023 г. Б. А. Малярчук[1], *, М. В. Деренко[1]

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

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

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.
После доработки 24.04.2022 г.
Принята к публикации 23.06.2022 г.

Проанализированы данные об изменчивости нуклеотидных последовательностей целых митохондриальных геномов у украинцев. Сравнительный анализ параметров генетического разнообразия показал, что украинцы, как и другие европейские народы, характеризуются высоким уровнем разнообразия мтДНК. Однако межпопуляционные различия в Европе очень низки ($F_{ST} = 0.36\%$, $p < 0.00001$). По результатам F_{ST}-анализа украинцы проявляют наибольшее сходство со словаками, русскими, поляками, сербами и эстонцами. На графике многомерного шкалирования F_{ST}-дистанций украинцы располагаются вместе с западными и восточными славянами, занимая среди них центральное положение. Результаты анализа динамики эффективной численности (N_e) популяций показали различия по долговременной динамике N_e между севером и югом Восточной Европы. Для украинцев и юго-западного русского населения период резкого роста численности зарегистрирован в неолитическое время (примерно 8.2 тыс. лет назад), в то время как у эстонцев и северо-западных русских рост численности популяций наблюдается значительно позже – в эпоху бронзового века (примерно 4.3 тыс. лет назад). Анализ данных об изменчивости мтДНК в славянских популяциях показал, что частота этноспецифичных гаплотипов мтДНК достаточно широко изменяется в различных этнических группах – от 1.3 у словаков до 10.3% у поляков. Доля славяно-специфичных гаплотипов мтДНК также варьирует: меньше всего такого рода гаплотипов обнаружено у чехов и сербов (менее 10%), а больше всего – у украинцев (23.6%).

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, молекулярная филогеография, популяционная специфичность гаплотипов мтДНК, украинцы.

DOI: 10.31857/S0016675823010083, **EDN:** CMXSQZ

В последние десятилетия существенно увеличилось число научных исследований, посвященных анализу изменчивости нуклеотидных последовательностей целых митохондриальных геномов (митогеномов) в популяциях человека. Это позволяет на значительно более детальном уровне реконструировать филогенетические связи между материнскими линиями митохондриальной ДНК (гаплотипами мтДНК) в сравнении с более ранними исследованиями, базировавшимися на анализе полиморфизма отдельных гипервариабельных участков мтДНК (ГВС1 и ГВС2). Результаты исследований изменчивости целых митогеномов способствуют дальнейшему развитию целого ряда направлений, таких как генетика популяций человека, криминалистика и судебная генетика, палеогеномика и этнология. Высокая информативность анализа полиморфизма целых молекул мтДНК находит применение в реконструкции генетической истории народов [1–3]. В последние годы довольно интенсивно развиваются в данном направлении исследования разнообразия митохондриальных генофондов славян. Уже получены популяционные данные об изменчивости митогеномов в различных группах славян: у русских, поляков, сербов, чехов, словаков и болгар [4–7]. Однако некоторые (важные в плане исследования этногенеза славян) этнические группы – например, украинцы – очень мало задействованы в исследованиях генетической истории славян.

Целью настоящей работы, таким образом, является исследование структуры и разнообразия митохондриального генофонда украинцев, основываясь на данных об изменчивости целых моле-

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823010083 для авторизованных пользователей.

Таблица 1. Генетическое разнообразие в популяциях Европы по данным об изменчивости целых митохондриальных геномов

Популяция	*N*	*k*	*Hd* (s.e.)	π (s.e.)	mpd	*D* (*p*)
Украинцы	144	141	0.999 (0.001)	0.0018 (0.0001)	30.15	–2.42 ($p < 0.01$)
Русские	376	361	0.999 (0.000)	0.0018 (0.0001)	29.03	–2.57 ($p < 0.001$)
Чехи	150	140	0.999 (0.001)	0.0017 (0.0001)	28.52	–2.48 ($p < 0.001$)
Словаки	139	133	0.999 (0.001)	0.0017 (0.0001)	27.93	–2.45 ($p < 0.01$)
Татары поволжские	73	68	0.998 (0.003)	0.0021 (0.0001)	35.2	–2.33 ($p < 0.01$)
Эстонцы	114	106	0.999 (0.0014)	0.0017 (0.0001)	27.93	–2.33 ($p < 0.01$)
Сардинцы	63	50	0.992 (0.004)	0.0015 (0.0001)	24.31	–1.8 ($p < 0.05$)
Тосканцы	110	109	0.999 (0.0013)	0.0019 (0.0001)	30.68	–2.58 ($p < 0.001$)
Венгры	80	78	0.999 (0.002)	0.0018 (0.0001)	29.82	–2.36 ($p < 0.01$)
Сербы	228	207	0.999 (0.0005)	0.0017 (0.0001)	27.57	–2.53 ($p < 0.001$)
Поляки	300	287	0.999 (0.0003)	0.0019 (0.0001)	30.85	–2.56 ($p < 0.001$)
Болгары	126	119	0.999 (0.0011)	0.0018 (0.0001)	28.99	–2.42 ($p < 0.01$)
Датчане	175	167	0.999 (0.0007)	0.0017 (0.0001)	28.39	–2.4 ($p < 0.01$)
Суммарно	2073	1841	0.999 (0.0001)	0.0017 (0.0001)	27.8	–2.62 ($p < 0.001$)

Примечание. *N* – размер выборки; *k* – количество гаплотипов; *Hd* (s.e.) – генное разнообразие (стандартная ошибка); π (s.e.) – нуклеотидное разнообразие (стандартное значение); mpd – среднее число попарных нуклеотидных различий; *D* (*p*) – значение *D* для теста на нейтральность Таджимы (*p*-критерий).

кул мтДНК. Необходимо отметить, что ранее исследования полиморфизма мтДНК у украинцев проводились, главным образом, с помощью анализа нуклеотидных последовательностей ГВС1 (иногда с дополнительным включением ГВС2), а также анализа распределения частот гаплогрупп мтДНК в популяциях [8–13]. Результаты генокартографических исследований показали, что по распределению вариантов полиморфизма мтДНК восточнославянские популяции проявляют наибольшую степень сходства между собой; при этом генофонд украинцев более всего сходен с населением Польши, Беларуси и юга России [10, 12]. Также получены данные о возможном некотором своеобразии западных популяций украинцев [9] и их большем генетическом сходстве с западными славянами [13]. Данные об изменчивости нуклеотидных последовательностей целых митогеномов украинцев использовались лишь в филогеографических исследованиях некоторых гаплогрупп мтДНК [11, 14–17] и поэтому анализ структуры и разнообразия митохондриального генофонда украинцев, основанный на данных об изменчивости целых митогеномов, представляется вполне актуальным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе проанализированы нуклеотидные последовательности целых митохондриальных геномов 144 индивидуумов украинского происхождения, опубликованных в работах [11, 14–21], а также базах данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), mtDNA Community (www.mtdnacommunity.org), Family Tree DNA project (https://www.familytreedna.com) и Logan DNA Project (http://www.ianlogan.co.uk) (табл. 1 дополнительных материалов). Этническая принадлежность исследованных образцов установлена на основании сведений, представленных в базах данных. Кроме этого, определены нуклеотидные последовательности целых митогеномов у трех индивидуумов украинского происхождения. Для этого использованы методы и подходы, подробно описанные нами ранее [2]. Нуклеотидные последовательности мтДНК депонированы в GenBank под номерами OM802873, OM802874 и OM802875.

Филогенетические взаимоотношения между нуклеотидными последовательностями мтДНК реконструировали с помощью метода максимальной экономии, реализованного в пакете компьютерных программ mtPhyl v4.015 (http://eltsov.org). Полиморфизм длины в повторяющихся участках мтДНК 16180–16193, 309–315 и 514–524, а также замены в гипервариабельной нуклеотидной позиции 16519 при построении деревьев не учитывали. Для определения эволюционного возраста монофилетических кластеров мтДНК использовали заложенные в программе mtPhyl молекулярные часы, основанные на коррекции долговременной филогенетической скорости мтДНК человека (одна нуклеотидная замена в целом митогеноме за 3624 года, или 1.665×10^{-8} замен на сайт в год) с учетом действия отрицательного отбора [22].

За основу в работе использована филогенетическая классификация гаплогрупп мтДНК, пред-

ложенная разработчиками ресурса PhyloTree (www.phylotree.org). Для филогеографического анализа гаплотипов мтДНК, включая анализ популяционной специфичности кластеров мтДНК, применяли информацию об изменчивости целых митогеномов у представителей различных популяций человека, согласно данным GenBank, PhyloTree, mtDNA Community, Logan DNA Project, проекта 1000 Genomes (http://www.internationalgenome.org), Family Tree DNA project. По состоянию на конец 2021 г. в GenBank содержится более 52000 митохондриальных геномов от представителей различных этнических групп мира (https://www.mitomap.org). Монофилетические кластеры мтДНК учитывались нами как этноспецифичные, если не менее 75% гаплотипов мтДНК в кластере были характерны только для представителей определенной этнической группы (украинцы) или этнической общности (славяне).

Для исследования демографической истории украинцев использовали байесовский анализ эффективной численности популяций (N_e), основанный на данных об изменчивости целых митохондриальных геномов. Для данного анализа применяли пакет программ BEAST 1.10.2 [23]. Наиболее оптимальная модель нуклеотидных замен (HKY + G + I) была выбрана с помощью пакета программ MEGA 5.05 [24]. В анализе использовали строгие молекулярные часы и мутационную скорость, равную 2.041×10^{-8} замен на сайт в год. Это значение является оптимальным для изучения динамики N_e в последние 30 тыс. лет истории согласно данным об изменениях значений мутационной скорости мтДНК человека во времени [22, 25]. Протяженность байесовского анализа динамики эффективной численности популяций составляла от 100 до 400 млн циклов для выборок соответственно меньшего и большего размера. Для анализа данных, сгенерированных BEAST 1.10.2, применяли пакет программ Tracer 1.4. Стабилизацию марковских цепей MCMC (Markov Chain Monte Carlo) считали завершенной, если значение параметра ESS (Effective Sample Size) для всех статистик было более 200. Изменения эффективной численности популяций оценивали не в абсолютных значениях, а с помощью пропорционального N_e параметра $N_e\mu$ (произведение эффективной численности популяций и мутационной скорости), вычисляемого непосредственно по данным об изменчивости мтДНК с помощью пакета программ BEAST 1.10.2.

Для проведения сравнительного анализа полногеномной изменчивости мтДНК на популяционном уровне использовали, кроме украинской выборки, опубликованные данные для русских [4], поволжских татар [26], эстонцев [27], венгров [28], сербов [7], поляков [4–6], чехов (данные GenBank), словаков (данные GenBank), болгар (Family Tree DNA project), датчан [29], тосканцев (1000 Genomes Project), сардинцев [30]. Параметры генетического разнообразия в популяциях рассчитывали с помощью пакета программ DnaSP 5.10.01 [31]. Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA, F_{ST}-анализ), основанный на попарных нуклеотидных различиях между митогеномами, проводили с помощью пакета программ Arlequin 3.5.1.2 [32]. Расположение популяций в двухмерном пространстве исследовали с помощью метода многомерного шкалирования межпопуляционных F_{ST}-различий, реализованного в пакете программ STATISTICA10 package (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ разнообразия мтДНК в европейских популяциях

Анализ параметров разнообразия митохондриальных генофондов европейских популяций показал, что украинский генофонд не отличается от генофондов других европейских народов ни по уровню разнообразия гаплотипов (*Hd*), ни по показателям нуклеотидного разнообразия (π и mpd) (табл. 1). Европейские митохондриальные генофонды характеризуются высоким генетическим разнообразием и очень низкими значениями *D*-статистики Таджимы, указывающими на избыток вариантов полиморфизма, распространенных в популяциях с низкой частотой. Это может свидетельствовать о недавнем росте численности популяций или о воздействии отрицательного отбора на полиморфизм мтДНК [32].

Периоды популяционного роста численности обнаруживаются и при анализе динамики эффективного размера популяций по данным об изменчивости целых митохондриальных геномов у украинцев. Первый из этих периодов связан с медленным и продолжительным увеличением численности от примерно 50 тыс. лет тому назад, за которым последовал медленный спад численности в ледниковое время (20–30 тыс. лет тому назад) (график не показан). Следующий рост численности населения наблюдается в послеледниковый период, начиная от 10 тыс. лет назад (95%-ный доверительный интервал (ДИ): 9.5–10.6 тыс. лет назад). Наиболее резкий (10-кратный) рост численности произошел в период от 10 до 5.3 тыс. лет назад.

Между тем предыдущие исследования показали, что более детальная картина динамики N_e популяций может быть получена в выборках большего размера, чем исследованная выборка украинцев ($N = 144$) [3, 33]. Поэтому мы добавили к выборке украинских митогеномов аналогичные данные для географически близких русских популяций Белгородской, Орловской и Тульской об-

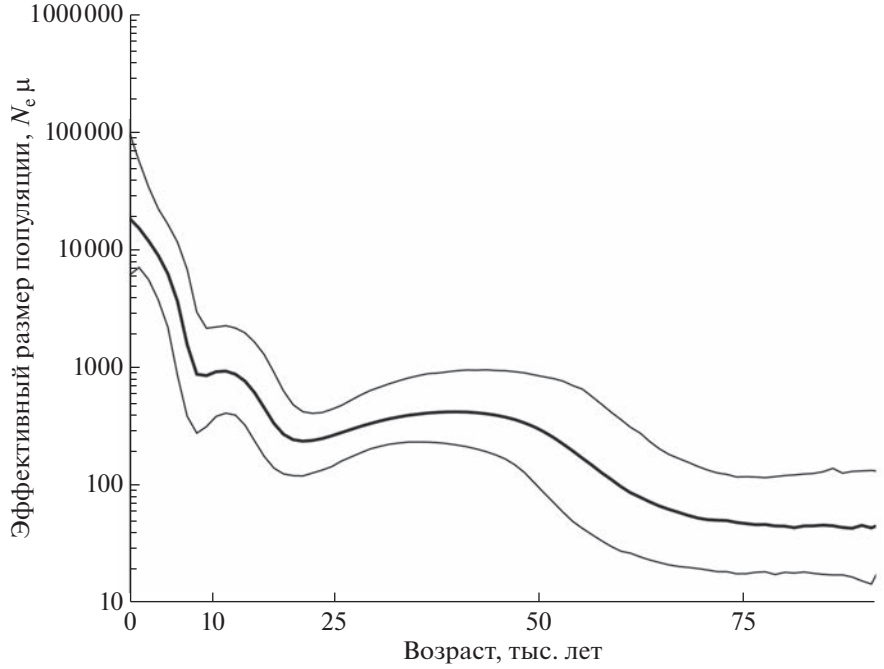


Рис. 1. Байесовский график динамики эффективной численности популяций во времени, построенный по данным об изменчивости целых митохондриальных геномов украинцев и русских Белгородской, Орловской и Тульской областей. На графике показаны значения медианы и 95%-ного доверительного интервала с наивысшей апостериорной вероятностью.

ластей, увеличив размер выборки до 315 митогеномов. Результаты анализа показали увеличение численности населения южной части Восточной Европы от минимума N_e примерно 21 тыс. лет назад (что соответствует максимуму последнего оледенения) до максимума примерно 11.8 тыс. лет назад с последующим снижением до 9.4 тыс. лет назад и затем резким (20-кратным) ростом численности, начавшимся примерно 8.2 тыс. лет назад (95% ДИ: 7.1–9.4 тыс. лет назад) (рис. 1).

Поскольку демографическая история населения юга и севера Восточной Европы может различаться [34], нами проведен анализ динамики N_e в популяциях псковско-новгородского русского населения и их соседей – эстонцев (рис. 2). Анализ 246 митогеномов показал, что эффективная численность населения Северо-Запада начала расти лишь примерно 18 тыс. лет тому назад до максимальных значений N_e примерно 8.6 тыс. лет назад (95% ДИ: 8.0–9.2 тыс. лет назад). После этого периода популяционный размер снижался, однако примерно 4.3 тыс. лет назад (95% ДИ: 3.7–4.9 тыс. лет назад) произошел довольно резкий (почти 7-кратный) популяционный рост.

Таким образом, результаты проведенного анализа свидетельствуют о различиях по долговременной динамике N_e между севером и югом Восточной Европы. Ранее по данным о распределении частот гаплогрупп мтДНК у населения Восточной Европы был сделан вывод о том, что внутрипопуляционное разнообразие мтДНК снижается к северу [34]. Это объяснялось усилением дрейфа в северных популяциях вследствие снижения продуктивности территорий и падения плотности населения. По мере возрастания географической широты предполагалось также уменьшение эффективного размера популяций, увеличение степени изоляции субпопуляций, а также возрастание случайного инбридинга и генетического груза популяции [34]. Между тем результаты исследования изменчивости целых митохондриальных геномов показывают, что популяции севера и юга Восточной Европы не различаются по разнообразию гаплотипов мтДНК, однако нуклеотидное разнообразие, измеряемое по числу попарных нуклеотидных различий между митогеномами, действительно несколько выше на юге (табл. 2). Трудно судить, насколько это связано с инбридингом и генетическим грузом популяций. Однако исходя из результатов анализа динамики N_e, вполне возможно, что более высокое разнообразие мтДНК в популяциях юга Восточной Европы может быть связано с такими долговременными эффектами, как более длительное присутствие популяций человека на юге Европы (например, в рефугиумах в ледниковое время) и более раннее начало демографических экспансий – еще в неолитическое время, что могло быть связано с распространением носителей технологий агрокультуры, вышедших из

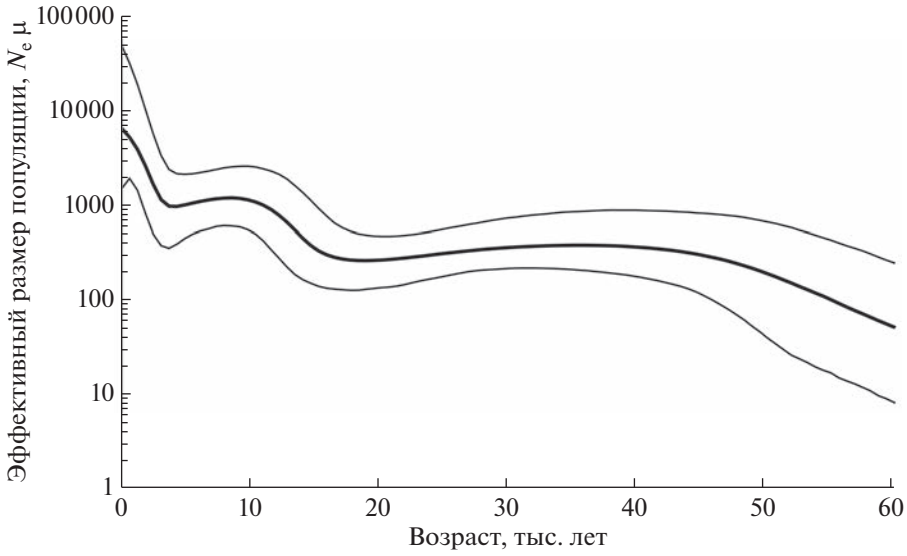


Рис. 2. Байесовский график динамики эффективной численности популяций во времени, построенный по данным об изменчивости целых митохондриальных геномов русских Псковской и Новгородской областей и эстонцев. На графике показаны значения медианы и 95%-ного доверительного интервала с наивысшей апостериорной вероятностью.

Анатолии. В популяциях севера Восточной Европы выявляется только экспансия эпохи бронзового века, связанная, возможно, с миграциями носителей курганной культуры. В популяциях юга сигналы этой экспансии также присутствуют – и даже в более выраженной форме, поскольку рост численности населения на юге Восточной Европы в эпоху бронзы в несколько раз превышал таковой на севере (по результатам анализа графиков на рис. 1 и 2).

Межпопуляционные различия по данным об изменчивости целых митогеномов

Все изученные европейские популяции характеризуются достаточно высоким уровнем разнообразия гаплотипов мтДНК, однако, как показало исследование *F*-статистик, межпопуляционные различия, основанные на анализе попарных нуклеотидных различий между гаплотипами мтДНК, очень низки ($F_{ST} = 0.36\%$, $p < 0.00001$). По результатам этого анализа украинцы проявляют наибольшее сходство со словаками, русскими, поляками, сербами, эстонцами (значения F_{ST} изменяются в диапазоне от 0 до 0.1%), а максимальные отличия демонстрируют поволжские татары и сардинцы (примерно 1.3%) (табл. 3). Последние популяции в целом занимают наиболее удаленное положение (по результатам многомерного шкалирования F_{ST}-различий) как друг от друга, так и от остальных европейских популяций, проанализированных в настоящей работе (рис. 3). В случае сардинцев это может объясняться их изолированным островным положением и сохранением некоторых генетических особенностей еще с эпохи позднего неолита [35], а генофонд поволжских татар имеет другую особенность – наличие митохондриальных линий восточноазиатского происхождения [26]. Важно отметить, что на графике многомерного шкалирования украинцы располагаются вместе с западными и восточными славянами, занимая центральное положение между поляками, чехами, словаками и русскими, а также эстонцами. Между тем южные славяне (сербы и болгары) удалены от этой группы популяций, а также друг от друга. При этом сербы проявляют большее генетическое сходство с южными европейцами, а болгары – с восточными европейцами.

Таблица 2. Генетическое разнообразие в популяциях севера и юга Восточной Европы по данным об изменчивости целых митохондриальных геномов

Популяция	*N*	*k*	*Hd* (s.e.)	π (s.e.)	mpd
Север	246	225	0.999 (0.0005)	0.00166 (0.00005)	27.55
Юг	315	311	0.999 (0.0003)	0.0018 (0.00006)	29.7

Примечание. Обозначения как в табл. 1. В региональную группу популяций “Север” вошли русские Псковской и Новгородской областей и эстонцы; в группу “Юг” – русские Белгородской, Орловской и Тульской областей и украинцы.

Таблица 3. F_{ST}-различия (в %) между европейскими популяциями по данным об изменчивости нуклеотидных последовательностей целых митогеномов

Популяция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Русские	0	+	+	–	–	–	+	–	+	+	–	–	–
2. Татары	1.68	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. Сардинцы	1.109	3.746	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. Эстонцы	0	1.024	1.037	0	–	–	–	–	–	+	–	–	–
5. Тосканцы	0.155	1.93	0.775	0.113	0	–	–	–	–	–	–	–	–
6. Венгры	0.452	1.052	1.577	0.214	0.077	0	–	–	–	–	–	–	–
7. Сербы	0.398	1.868	1.372	0.157	0.264	0.227	0	+	+	+	–	–	–
8. Поляки	0.005	0.83	1.171	0	0.104	0.122	0.309	0	–	+	–	–	–
9. Болгары	0.371	0.931	1.991	0.29	0.236	0	0.67	0.036	0	+	–	+	–
10. Датчане	0.274	2.097	1.567	0.547	0.19	0.076	0.48	0.319	0.395	0	–	+	+
11. Чехи	0.04	1.337	1.251	0.076	0.182	0	0.262	0.018	0.21	0	0	–	–
12. Словаки	0.047	1.447	1.138	0	0.359	0.18	0.112	0.115	0.544	0.427	0.009	0	–
13. Украинцы	0.047	1.283	1.318	0.077	0.306	0.149	0.068	0.05	0.369	0.404	0.125	0	0

Примечание. Значения F_{ST} основаны на попарных нуклеотидных различиях между гаплотипами мтДНК и показаны под диагональю, над диагональю знаком “+” отмечены статистически достоверные межпопуляционные различия (при уровне значимости $p < 0.05$) и знаком “–” недостоверные различия.

Филогеографический анализ полиморфизма мтДНК

Митохондриальный генофонд исследованной выборки украинцев представлен преимущественно (97.2%) гаплогруппами западноевразийского происхождения: гаплогруппами H (42.2%), HV (2.1%), V (4.9%), J (9.7%), T (7.6%), K (3.5%), U2e (2.8%), U3 (0.7%), U4 (4.9%), U5 (6.9%), I (5.6%), W (2.1%), X (4.2%). Восточноазиатские гаплогруппы C, D и Z присутствуют в выборке с суммарной частотой 2.8%. Следует отметить, что восточноазиатский компонент был выявлен со сходными частотами и в других исследованиях полиморфизма мтДНК у украинцев (1.6% в работе [12], 2.5% в работе [11]). Структура западноевразийского компонента у украинцев очень сложная и представлена не менее 100 подгруппа-

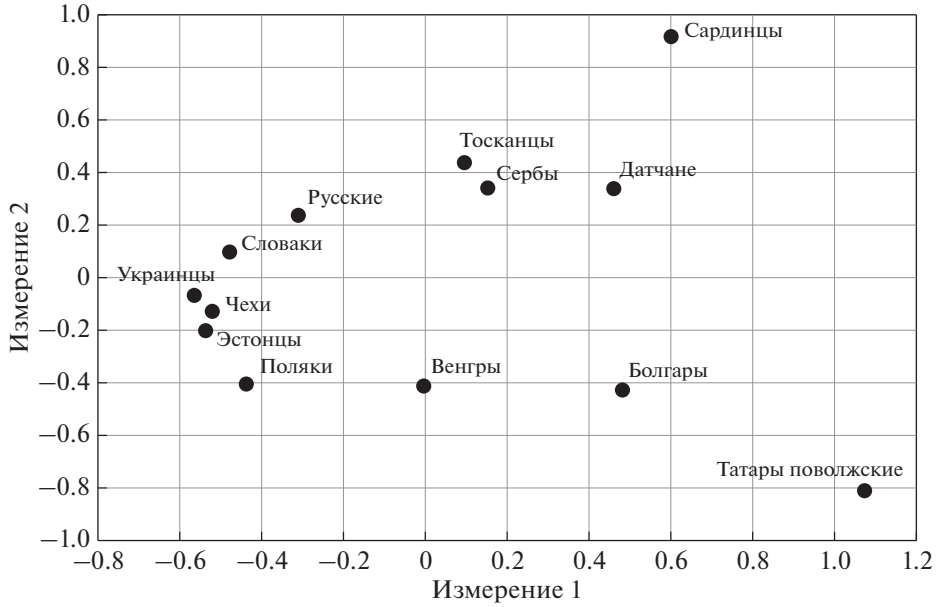


Рис. 3. Результаты многомерного шкалирования межпопуляционных F_{ST}-значений, основанных на попарных нуклеотидных различиях между последовательностями целых митохондриальных геномов из различных популяций Европы. Величина стресса = 0.000032.

ми различных гаплогрупп мтДНК (табл. 1 дополнительных материалов).

Результаты филогеографического анализа показывают, что митохондриальные гаплотипы, выявленные у украинцев, относятся к подгруппам мтДНК, распространенным у представителей различных народов Европы. В анализе были использованы более 52000 митохондриальных геномов от представителей различных этнических групп мира. Исследование показало, что 16% украинских гаплотипов мтДНК идентичны таковым в других европейских популяциях – в основном, славянских и германоязычных. На долю этноспецифичных гаплотипов мтДНК приходится всего лишь 3.5% украинских образцов (подруппы H10a1b и U4c1a-2905-16355). Гораздо выше частота славяно-специфичных гаплотипов мтДНК – 23.6% (табл. 2 дополнительных материалов). Результаты молекулярного датирования показывают, что возраст такого рода подгрупп мтДНК у украинцев изменяется в широком диапазоне – от 1.3 до 6.6 тыс. лет. В среднем эволюционный возраст этого генетического компонента составляет 2.7 ± 0.2 тыс. лет.

Анализ опубликованных данных об изменчивости мтДНК у славян показывает, что частота этноспецифичных гаплотипов мтДНК достаточно широко изменяется в различных этнических группах – от 1.3% у словаков до 10.3% у поляков (табл. 4). Доля гаплотипов, обнаруженных, главным образом, только у славян, также варьирует: меньше всего славяно-специфичных гаплотипов мтДНК обнаружено у чехов и сербов, а больше всего – у украинцев. Насколько этот результат проясняет вопрос о происхождении славян, пока непонятно, поскольку для получения более надежных результатов необходимо больше данных об изменчивости мтДНК на полногеномном уровне как в различных славянских группах, так и у их соседей. А в настоящее время популяции особенно восточной части Европы исследованы очень фрагментарно.

В целом результаты исследований показывают, что лишь в относительно изолированных популяциях фракция этноспецифичных гаплотипов мтДНК может достигать больших объемов. Так, одно из первых исследований в этом направлении продемонстрировало, например, что у населения Сардинии примерно 80% митогеномов (а всего проанализировано около 3.5 тыс. митогеномов) формируют специфичные для сардинцев подгруппы мтДНК, возникшие в разное время на острове на основе различных предковых линий мтДНК [35]. Анализ полиморфизма 843 митогеномов финнов, история формирования которых также сопровождалась периодами изоляции, позволил установить, что 33% митогеномов финнов относятся к финно-специфичным подгруппам мтДНК [36]. Аналогично у басков – еще одного европейского народа-изолята обнаружена высокая частота (44%) специфичных для басков гаплотипов мтДНК [37]. Примерно треть (27%) митохондриального генофонда приходится на этноспецифичные подгруппы мтДНК и у армян, у которых широко распространены эндогамные браки [38].

Таблица 4. Популяционная специфичность гаплотипов мтДНК в различных этнических группах славян

Популяция	*N*	Популяционная специфичность (%)	
		на этническом уровне	на уровне славянской общности
Украинцы	144	3.5	23.6
Русские	466	9.7	12.2
Поляки	815	10.3	15.6
Чехи	150	5.3	9.3
Словаки	139	1.3	11.5
Сербы	226	10.2	8.0

Примечание. *N* – размер выборки.

Проведенное нами исследование показало, таким образом, что в славянских популяциях, формировавшихся в условиях смешения со своими соседями, частота этноспецифичных компонентов митохондриальных генофондов ожидаемо низка, однако фракция следующего иерархического уровня – общности славян – может достигать довольно высоких частот, как, например, у украинцев. Дополнительные исследования славяно-специфичных фракций гаплотипов мтДНК позволят в перспективе получить сведения о разнообразии и эволюционном возрасте собственно славянских компонентов в генофондах народов и особенностях динамики эффективной численности предковых популяций.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kivisild T.* Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes // Investig. Genet. 2015. V. 6. e3. https://doi.org/10.1186/s13323-015-0022-2

2. *Деренко М.В., Малярчук Б.А.* Молекулярная филогеография населения Северной Евразии по данным об изменчивости митохондриальной ДНК. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2010. 376 с.
3. *Малярчук Б.А., Деренко М.В.* Разнообразие и структура митохондриальных генофондов славян в этногенетическом аспекте // Успехи соврем. биологии. 2020. Т. 140. № 4. С. 333–346. https://doi.org/10.31857/S0042132420040109
4. *Malyarchuk B., Litvinov A., Derenko M. et al.* Mitogenomic diversity in Russians and Poles // Forensic Sci. Int. Genet. 2017. V. 30. P. 51–56. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.06.003
5. *Skonieczna K., Malyarchuk B., Jawień A. et al.* Mitogenomic differences between the normal and tumor cells of colorectal cancer patients // Hum. Mut. 2018. V. 39. P. 691–701. https://doi.org/10.1002/humu.23402
6. *Piotrowska-Nowak A., Kosior-Jarecka E., Schab A. et al.* Investigation of whole mitochondrial genome variation in normal tension glaucoma // Exp. Eye Res. 2019. V. 178. P. 186–197. https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.10.004
7. *Davidovic S., Malyarchuk B., Grzybowski T. et al.* Complete mitogenome data for the Serbian population: The contribution to high quality forensic databases // Int. J. Legal Med. 2020. V. 134. P. 1581–1590. https://doi.org/10.1007/s00414-020-02324-x
8. *Malyarchuk B.A., Derenko M.V.* Mitochondrial DNA variability in Russians and Ukrainians: Implication to the origin of the Eastern Slavs // Ann. Hum. Genet. 2001. V. 65. P. 63–78. https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.2001.6510063.x
9. *Nikitin A.G., Kochkin I.T., June C.M. et al.* Mitochondrial DNA sequence variation in the Boyko, Hutsul, and Lemko populations of the Carpathian highlands // Hum. Biol. 2009. V. 81. P. 43–58. https://doi.org/10.3378/027.081.0104
10. *Балановский О.П., Пшеничнов А.С., Фролова С.А. и др.* Основные черты митохондриального генофонда восточных славян // Мед. генетика. 2010. Т. 9. № 1. С. 29–37.
11. *Mielnik-Sikorska M., Daca P., Malyarchuk B. et al.* The history of Slavs inferred from complete mitochondrial genome sequences // PLoS One. 2013. V. 8 e54360. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054360
12. *Pshenichnov A., Balanovsky O., Utevska O. et al.* Genetic affinities of Ukrainians from the maternal perspective // Am. J. Phys. Anthropol. 2013. V. 152. P. 543–550. https://doi.org/10.1002/ajpa.22371
13. *Kushniarevich A., Utevska O., Chuhryaeva M. et al.* Genetic heritage of the Balto-Slavic speaking populations: A synthesis of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal data // PLoS One. 2015. V. 10. e0135820. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135820
14. *Malyarchuk B., Grzybowski T., Derenko M. et al.* Mitochondrial DNA phylogeny in Eastern and Western Slavs // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25. P. 1651–1658. https://doi.org/10.1093/molbev/msn114
15. *Pala M., Olivieri A., Achilli A. et al.* Mitochondrial DNA signals of late glacial recolonization of Europe from near eastern refugia // Am. J. Hum. Genet. 2012. V. 90. P. 915–924. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.04.003
16. *Olivieri A., Pala M., Gandini F. et al.* Mitogenomes from two uncommon haplogroups mark late glacial/postglacial expansions from the near east and neolithic dispersals within Europe // PLoS One. 2013. V. 8. e70492. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070492
17. *Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G. et al.* Western Eurasian ancestry in modern Siberians based on mitogenomic data // BMC Evol. Biol. 2014. V. 14. 217. https://doi.org/10.1186/s12862-014-0217-9
18. *Oleksyk T.K., Wolfsberger W.W., Weber A.M. et al.* Genome diversity in Ukraine // Gigascience. 2021. V. 10. giaa159. https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa159
19. *Behar D.M., van Oven M., Rosset S. et al.* A "Copernican" reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root // Am. J. Hum. Genet. 2012. V. 90. P. 675–684. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.002
20. *Bianco E., Laval G., Font-Porterias N. et al.* Recent common origin, reduced population size, and marked admixture have shaped European Roma genomes // Mol. Biol. Evol. 2020. V. 37. P. 3175–3187. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa156
21. *Starikovskaya E., Shalaurova S., Dryomov S. et al.* Mitochondrial DNA variation of Leber's hereditary optic neuropathy in Western Siberia // Cells. 2019. V. 8. 1574. https://doi.org/10.3390/cells8121574
22. *Soares P., Ermini L., Thomson N. et al.* Correcting for purifying selection: An improved human mitochondrial molecular clock // Am. J. Hum. Genet. 2009. V. 84. P. 740–759. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.05.001
23. *Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D. et al.* Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. P. 1969–1973. https://doi.org/10.1093/molbev/mss075
24. *Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739. https://doi.org/10.1093/molbev/msr121
25. *Soares P.A., Trejaut J.A., Rito T. et al.* Resolving the ancestry of Austronesian-speaking populations // Hum. Genet. 2016. V. 135. P. 309–326. https://doi.org/10.1007/s00439-015-1620-z
26. *Malyarchuk B., Derenko M., Denisova G., Kravtsova O.* Mitogenomic diversity in Tatars from the Volga-Ural region of Russia // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. P. 2220–2226. https://doi.org/10.1093/molbev/msq065
27. *Stoljarova M., King J.L., Takahashi M. et al.* Whole mitochondrial genome genetic diversity in an Estonian population sample // Int. J. Legal Med. 2016. V. 130. P. 67–71. https://doi.org/10.1007/s00414-015-1249-4
28. *Malyarchuk B., Derenko M., Denisova G. et al.* Whole mitochondrial genome diversity in two Hungarian populations // Mol. Genet. Genomics. 2018. V. 293. P. 1255–1263. https://doi.org/10.1007/s00438-018-1458-x

29. *Raule N., Sevini F., Li S. et al.* The co-occurrence of mtDNA mutations on different oxidative phosphorylation subunits, not detected by haplogroup analysis, affects human longevity and is population specific // Aging Cell. 2014. V. 13. P. 401–407. https://doi.org/10.1111/acel.12186

30. *Fraumene C., Belle E.M., Castri L. et al.* High resolution analysis and phylogenetic network construction using complete mtDNA sequences in Sardinian genetic isolates // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. P. 2101–2111. https://doi.org/10.1093/molbev/msl084

31. *Librado P., Rozas J.* DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1451–1452. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187

32. *Excoffier L., Lischer H.E.* Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resour. 2010. V. 10. P. 564–567. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

33. *Малярчук Б.А., Литвинов А.Н., Деренко М.В.* Структура и формирование митохондриального генофонда русского населения Восточной Европы // Генетика. 2019. Т. 55. № 5. С. 574–582. https://doi.org/10.1134/S0016675819050102

34. *Балановский О.П., Кошель С.М., Запорожченко В.В. и др.* Эколого-генетический мониторинг в популяциях человека: гетерозиготность, гаплотипическое разнообразие мтДНК и генетический груз // Генетика. 2011. Т. 47. № 11. С. 1523–1535.

35. *Olivieri A., Sidore C., Achilli A. et al.* Mitogenome diversity in Sardinians: A genetic window onto an Island's past // Mol. Biol. Evol. 2017. V. 34. P. 1230–1239. https://doi.org/10.1093/molbev/msx082

36. *Översti S., Onkamo P., Stoljarova M. et al.* Identification and analysis of mtDNA genomes attributed to Finns reveal long-stagnant demographic trends obscured in the total diversity // Sci. Rep. 2017. V. 7. 6193. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05673-7

37. *García Ó., Alonso S., Huber N. et al.* Forensically relevant phylogeographic evaluation of mitogenome variation in the Basque Country // Forensic Sci. Int. Genet. 2020. V. 46. 102260. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102260

38. *Derenko M., Denisova G., Malyarchuk B. et al.* Insights into matrilineal genetic structure, differentiation and ancestry of Armenians based on complete mitogenome data // Mol. Genet. Genomics. 2019. V. 294. P. 1547–1559. https://doi.org/10.1007/s00438-019-01596-2

Mitochondrial Gene Pool of Ukrainians in the Context of Variability of Whole Mitogenomes in Slavic Peoples

B. A. Malyarchuk[a], * and M. V. Derenko[a]

[a] *Institute of Biological Problems of the North, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia*

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

Data on the variability of nucleotide sequences of whole mitochondrial genomes in Ukrainians were analyzed. A comparative analysis of genetic diversity parameters showed that Ukrainians, like other European populations, are characterized by a high level of mtDNA diversity. However, between-population differences in Europe are very low (F_{ST} = 0.36%, $p < 0.00001$). According to the results of the F_{ST}-analysis, Ukrainians show the greatest similarity with Slovaks, Russians, Poles, Serbs, and Estonians. On the graph of multidimensional scaling of F_{ST}-distances, Ukrainians are located together with Western and Eastern Slavs, occupying a central position among them. The results of the analysis of the dynamics of the effective population size (N_e) showed differences in the long-term dynamics of N_e between populations of the north and south of Eastern Europe. For Ukrainians and the southwestern Russian populations, a period of sharp population growth was recorded in the Neolithic period (approximately 8.2 thousand years ago), while for Estonians and northwestern Russians, population growth was observed much later, in the Bronze Age (approximately 4.3 thousand years ago). An analysis of data on mtDNA variability in Slavic populations showed that the frequency of ethnic specific mtDNA haplotypes varies quite widely in different ethnic groups, from 1.3% in Slovaks to 10.3% in Poles. The proportion of Slavic-specific mtDNA haplotypes also varies: the least number of such haplotypes was found in Czechs and Serbs (less than 10%), and most of all in Ukrainians (23.6%).

Keywords: mitochondrial DNA, molecular phylogeography, population specificity of mtDNA haplotypes, Ukrainians.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 1, с. 115–122

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

УДК 616.1

РОЛЬ rs2238296 ГЕНА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ГАММА В СОЧЕТАНИИ С ПОЛИМОРФНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА В РАЗВИТИИ ПОСТИНФАРКТНОЙ АНЕВРИЗМЫ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА

© 2023 г. Е. А. Кужелева[1], *, А. А. Гарганеева[1], О. В. Тукиш[1], А. К. Несова[1], М. В. Голубенко[2], С. Л. Андреев[1], В. М. Шипулин[1]

[1]Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634012 Россия

[2]Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

**e-mail: kea@cardio-tomsk.ru*

Поступила в редакцию 25.02.2022 г.
После доработки 30.03.2022 г.
Принята к публикации 12.04.2022 г.

Изучали связь полиморфного варианта гена митохондриальной ДНК-полимеразы гамма (*POLG* rs2238296) в совокупности с однонуклеотидными полиморфными вариантами генов антиоксидантной системы организма (митохондриального фактора транскрипции А (*TFAM* rs1937), супероксиддисмутазы (*SOD2* rs4880), глутатионпероксидазы (*GPX1* rs1050450), каталазы (*CAT* rs1001179), параоксоназы 1 (*PON1* rs854560) и НАДФ-Н оксидазы (*CYBA* rs4673)) с особенностями постинфарктного ремоделирования левого желудочка (ЛЖ). Были обследованы 153 пациента с ишемической болезнью сердца (137 мужчины и 16 женщин) в возрасте 56 (50; 60.5) лет. Генотипирование осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. При анализе распределения частот генотипов вариантов исследуемых генов не было обнаружено существенной разницы по генам *SOD2*, *GPX1*, *CAT*, *PON1*, *TFAM* в исследуемых группах. В отношении генов *POLG* и *CYBA* были установлены значимые различия: генотип *CC* rs2238296 гена *POLG* встречался у каждого третьего пациента с аневризмой ЛЖ (30.3%), тогда как в группе без аневризмы – только в каждом восьмом случае (12.3%, $p = 0.006$). Генотип *CC* rs4673 гена *CYBA* встречался у каждого второго пациента с аневризмой (51.8%) и у 32% – без аневризмы ЛЖ ($p = 0.01$). Пациенты с сочетанием генотипов *CC* (*POLG*) и *CC* (*CYBA*) были представлены исключительно мужчинами более молодого возраста, которые характеризовались менее отягощенным коморбидным фоном, в сравнении с больными, имеющими другой генотип указанных генов. При этом величина фракции выброса ЛЖ у таких пациентов была существенно ниже (40 (27; 52) и 50 (40; 61), $p = 0.006$), а развитие аневризмы ЛЖ регистрировалось в 73% случаев.

Ключевые слова: постинфарктная аневризма, *POLG*, *CYBA*, хроническая сердечная недостаточность, атеросклероз коронарных артерий.

DOI: 10.31857/S0016675823010071, **EDN:** CMPIIW

Перенесенный инфаркт миокарда (**ИМ**) представляет собой одну из основных причин развития хронической сердечной недостаточности (**ХСН**) и регистрируется у 15–30% больных ХСН [1, 2]. Процесс постинфарктного ремоделирования сердца, клинически проявляющийся как изменение размера, формы и функции сердца [3], во многом детерминируется экспрессией определенного набора генов, приводящей к молекулярным, клеточным и интерстициальным изменениям.

В настоящее время стратегия ведения пациентов с острым инфарктом миокарда предусматривает в первую очередь реперфузионное лечение (первичное чрескожное коронарное вмешательство или фармакоинвазивная стратегия) [4], что обусловливает значительное снижение частоты развития постинфарктной аневризмы сердца согласно данным популяционных исследований [5]. Вместе с тем осуществление анализа ретроспективных данных, собранных до широкого внедрения реперфузионной стратегии лечения острого ИМ, позволило сформировать репрезентативную группу больных с постинфарктной аневризмой левого желудочка в когорте пациентов с обструк-

тивным многососудистым атеросклерозом коронарных артерий.

Как известно, основными механизмами постинфарктного ремоделирования сердца являются клеточная гибель, нарушение энергетического и ионного обмена, воспаление, дисбаланс синтеза и распада коллагена, нейрогормональная активация и оксидативный стресс. В результате острого ишемического повреждения происходит нарушение функции митохондрий, что приводит к усилению процессов апоптоза кардиомиоцитов за счет накопления свободных радикалов, которые адекватно не утилизируются [6]. В процессах синтеза и утилизации свободных радикалов большое значение имеют ферменты антиоксидантной системы организма, такие как каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, параоксоназа и другие [7], в свою очередь активность указанных ферментов во многом детерминирована генетическими факторами [8, 9].

Цель настоящего исследования – оценка взаимосвязи полиморфного варианта C/T (rs2238296) гена митохондриальной ДНК-полимеразы гамма в совокупности с однонуклеотидными полиморфными вариантами (**ОНП**) генов антиоксидантной системы организма с особенностями постинфарктного ремоделирования левого желудочка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено ретроспективное исследование по типу случай–контроль больных с обструктивным многососудистым поражением коронарного русла, перенесших в анамнезе инфаркт миокарда. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие до начала процедур исследования. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом.

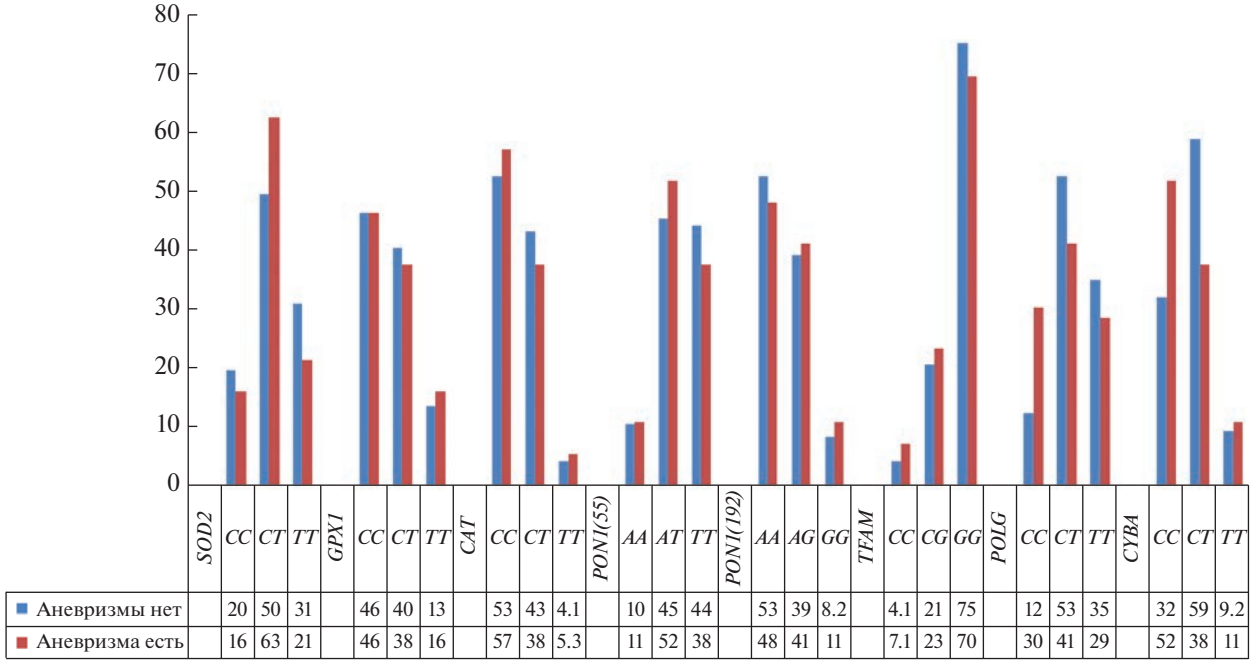
Критериями включения явились: факт перенесенного ИМ не ранее шести месяцев до включения в исследование и многососудистое атеросклеротическое поражение коронарных артерий как показание к хирургической реваскуляризации миокарда [10].

Критерии исключения: инфаркт миокарда или прогрессирующая стенокардия в течение шести предыдущих месяцев, отказ пациента от участия в исследовании.

В исследование включено 153 пациента (137 мужчин и 16 женщин), в возрасте 56 (50; 60.5) лет. Все пациенты были обследованы по единому алгоритму, включающему сбор жалоб и анамнеза заболевания, клинический осмотр с определением индекса массы тела, симптомов и признаков хронической сердечной недостаточности. Инструментальное обследование включало электрокардиографию (ЭКГ), эхокардиографию (ЭхоКГ) с использованием ультразвуковой системы Philips HD 15. Проведены лабораторные анализы крови. Коронароангиография выполнялась по клиническим показаниям на ангиографическом комплексе “Siemens Axion Aptos” не ранее чем за 2 мес. до включения в исследование. Пациенты были разделены на две группы в зависимости от особенностей постинфарктного ремоделирования левого желудочка (**ЛЖ**): 1-я группа – больные без аневризмы ЛЖ ($n = 97$); 2-я группа – пациенты с развившейся аневризмой ЛЖ после перенесенного ИМ ($n = 56$).

Материалом для генетического анализа явились образцы геномной ДНК пациентов, хранящиеся в биоколлекции Томского НИМЦ “Биобанк населения Северной Евразии”. Геномная ДНК была выделена из лейкоцитов венозной крови пациентов методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). В рамках работы проводили генотипирование восьми ОНП семи генов: митохондриальной ДНК-полимеразы гамма (*POLG* (rs2238296 – T/C)), митохондриального фактора транскрипции A (*TFAM* (rs1937 – Ser12Thr)), супероксиддисмутазы (*SOD2* (rs4880 – Ala16Val)), глутатионпероксидазы (*GPX1* (rs1050450 – Pro198Leu)), каталазы (*CAT* (rs1001179 – C-262T)), параоксоназы 1 (*PON1* (rs854560 – Leu55Met, rs662 – Gln192Arg)) и НАДФН-оксидазы (*CYBA* (rs4673 – His72Tyr)). Последовательность праймеров, условия генотипирования и рестрикции могут быть предоставлены авторами по запросу.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 10.0. Описание количественных данных осуществлялось в виде медианы и интерквартильного размаха (*Me* (*Q25*; *Q75*)), учитывая ненормальное распределение признаков при проверке распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Качественные значения представлены в абсолютных и относительных величинах (n (%)). Для сравнения количественных данных в двух независимых выборках использовался *U*-критерий Манна–Уитни. Для определения статистической значимости различий номинальных признаков использовали анализ таблиц сопряженности (критерий χ^2 Пирсона, а также двусторонний точный тест Фишера). Для анализа ассоциации изучаемых полиморфных вариантов с постинфарктным ремоделированием ЛЖ производился расчет отношения шансов с 95%-ным доверительным интервалом (ОШ; 95%ДИ). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0.05 (p – достигнутый уровень значимости). Распределение частот генотипов исследуемых полиморфных вариантов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0.05$).



	SOD2	*CC*	*CT*	*TT*	*GPX1*	*CC*	*CT*	*TT*	*CAT*	*CC*	*CT*	*TT*	*PON1(55)*	*AA*	*AT*	*TT*	*PON1(192)*	*AA*	*AG*	*GG*	*TFAM*	*CC*	*CG*	*GG*	*POLG*	*CC*	*CT*	*TT*	*CYBA*	*CC*	*CT*	*TT*
Аневризмы нет		20	50	31		46	40	13		53	43	4.1		10	45	44		53	39	8.2		4.1	21	75		12	53	35		32	59	9.2
Аневризма есть		16	63	21		46	38	16		57	38	5.3		11	52	38		48	41	11		7.1	23	70		30	41	29		52	38	11

Рис. 1. Распределение частот генотипов полиморфных вариантов генов в группах пациентов с аневризмой и без аневризмы левого желудочка после перенесенного инфаркта миокарда.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследуемые группы были представлены преимущественно мужчинами в возрасте 50–60 лет. Сахарный диабет 2-го типа, ожирение, периферический атеросклероз, хроническая обструктивная болезнь легких (**ХОБЛ**), перенесенное в анамнезе острое нарушение мозгового кровообращения (**ОНМК**) встречались одинаково часто в обеих группах ($p > 0.05$). Характер поражения коронарного русла был сопоставим, так как многососудистый коронарный атеросклероз явился одним из критериев включения в исследование. Количество перенесенных в прошлом ИМ, а также время, прошедшее после последнего ИМ, не различались среди больных с развитием и без развития аневризмы левого желудочка ($p > 0.05$) (табл. 1).

Таким образом, группы не различались по гендерно-возрастным параметрам и коморбидному фону. Функциональный класс стенокардии напряжения также был сопоставим в исследуемых группах ($p > 0.05$). Тогда как симптомы хронической сердечной недостаточности были наиболее выражены в когорте больных с аневризмой левого желудочка, среди которых преобладал третий функциональный класс ХСН по классификации NYHA. Пациенты, у которых развилась постинфарктная аневризма, имели, соответственно, меньшую фракцию выброса левого желудочка по данным ЭхоКГ (54.5 (44; 64) и 43 (30; 53.5), $p < 0.001$), большие диастолический и систолический объемы ($p = 0.001$), а также у них чаще диагностировались желудочковые нарушения ритма сердца высоких градаций (13.4 и 25%, $p = 0.06$), что может объясняться наличием аритмогенных очагов в измененном миокарде.

Медикаментозная терапия пациентов обеих исследуемых групп в большинстве случаев не соответствовала современным клиническим рекомендациям (табл. 2), что было обусловлено отсутствием четких рекомендательных документов на период включения пациентов в исследование (2006–2008 гг.). По этой же причине большинству больных не проводилась реваскуляризация миокарда на момент развития ИМ: только 2% пациентов из первой группы было выполнено стентирование инфаркт-связанной артерии.

При анализе распределения частот генотипов вариантов исследуемых генов не было обнаружено существенной разницы по генам *SOD2*, *GPX1*, *CAT*, *PON1* и *TFAM* в исследуемых группах (рис. 1). Тогда как в отношении генов *POLG* и *CYBA* были установлены значимые различия. Так, генотип *CC* rs2238296 гена *POLG* встречался у каждого третьего пациента с аневризмой ЛЖ (30.3%), тогда как в группе без аневризмы – только в каждом восьмом случае (12.3%; $p = 0.006$). Шанс развития аневризмы левого желудочка при наличии генотипа *CC* полиморфного варианта rs2238296 был выше в 3 раза (ОШ 3.1; 95%ДИ 1.3–7.0).

Генотип *CC* rs4673 гена *CYBA* встречался у каждого второго пациента с аневризмой (51.8%) и у 32% – без аневризмы левого желудочка. При этом

Таблица 1. Клинико-анамнестическая характеристика пациентов

Анализируемый признак	Группа 1 (аневризмы нет; $n = 97$)	Группа 2 (аневризма есть; $n = 56$)	p
Пол, муж/жен, *n* (%)	85/12 (87.6/12.4)	52/4 (92.9/7.1)	0.3
Средний возраст, *Me* (*Q25*; *Q75*), годы	55 (50; 60.5)	57 (50;60)	0.8
ФК ИБС, *n* (%)			
I	10 (10.3)	11 (19.6)	0.1
II	53 (54.6)	27 (48.2)	0.4
III	34 (35.1)	18 (32.1)	0.7
ФК ХСН (NYHA), *n* (%)			
I	6 (6.2)	2 (3.6)	0.4
II	43 (44.3)	15 (26.7)	0.03
III	46 (47.4)	38 (67.9)	0.01
IV	2 (2.1)	1 (1.8)	0.9
Сахарный диабет, *n* (%)	19 (19.6)	8 (14.3)	0.4
Ожирение, *n* (%)	40 (41)	20 (38.5)	0.3
Периферический атеросклероз, *n* (%)	58 (59.8)	27 (49.1)	0.18
Острое нарушение мозгового кровообращения, *n* (%)	8 (8.2)	5 (9)	0.4
Хроническая обструктивная болезнь легких, *n* (%)	28 (28.8)	13 (23.2)	0.5
Нарушения ритма сердца, *n* (%)	13 (13.4)	14 (25)	0.04
Индекс массы тела, *Me* (*Q25*; *Q75*), кг/м^2	28 (25.75; 31)	27 (24; 31)	0.15
Возраст на момент первого инфаркта миокарда, *Me* (*Q25*; *Q75*), мес.	51.3 (44.7; 56.7)	52.2 (47.6; 58)	0.2
Время от последнего инфаркта миокарда до включения в исследование, *Me* (*Q25*; *Q75*), мес.	12.5 (7.5; 51)	13.5 (8.5; 47.5)	0.38
Число перенесенных инфарктов миокарда, *n* (%)			>0.05
1	66 (68)	36 (64)	
2	25 (25.8)	15 (26.8)	
3	3 (3.1)	3 (5.4)	
4	3 (3.1)	2 (3.6)	
Конечный диастолический объем, *Me* (*Q25*; *Q75*), мл	134 (104; 175)	189 (140; 229)	0.001
Конечный систолический объем, *Me* (*Q25*; *Q75*), мл	58 (39; 100.5)	112 (67.25; 162.25)	0.001
Масса миокарда, *Me* (*Q25*; *Q75*), г	223 (181.25; 281.5)	250 (205; 298.5)	0.053
Фракция выброса левого желудочка, *Me* (*Q25*; *Q75*), %	54.5 (44; 64)	43 (30; 53.5)	<0.001

Примечание. *Me* (*Q25*; *Q75*) – медиана и интерквартильный размах; *p* – уровень значимости различий; ФК – функциональный класс; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ХСН – хроническая сердечная недостаточность.

отношение шансов развития аневризмы при наличии варианта *CC* гена *CYBA* составило 2.3 (95%ДИ 1.16–4.5) ($p = 0.01$). Таким образом, генотип *CC* rs2238296 гена *POLG* и генотип *CC* rs4673 гена *CYBA* были ассоциированы с развитием постинфарктной аневризмы левого желудочка у больных с обструктивным коронарным атеросклерозом.

Учитывая полученные результаты, отдельный интерес представляет группа с сочетанием указанных полиморфных вариантов ($n = 11$; табл. 3). Особенности исследуемой группы были изучены в сравнении с пациентами, имеющими отличный от исследуемого генотип ($n = 142$). Из 11 пациентов у восьми была диагностирована аневризма

Таблица 2. Медикаментозная терапия пациентов на момент включения в исследование

Группа препаратов	Группа 1 (аневризмы нет; $n = 97$)	Группа 2 (аневризма есть; $n = 56$)	p
Статины, n (%)	53 (55)	34 (60.7)	0.5
иАПФ, n (%)	26 (27)	12 (21.4)	0.5
АРА, n (%)	1 (1)	3 (5.4)	0.14
БАБ, n (%)	28 (29)	22 (39.3)	0.19
Диуретики, n (%)	25 (25.8)	22 (39.3)	0.08
Антагонисты альдостерона, n (%)	23 (23.7)	14 (25)	0.86
Нитраты, n (%)	11 (11.3)	6 (10.7)	0.9
Аспирин, n (%)	41 (42.2)	32 (57)	0.08

Примечание. иАПФ – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента; АРА – антагонисты рецепторов ангиотензина II; БАБ – бета-адреноблокаторы; p – уровень значимости различий.

ЛЖ (73%), тогда как в группе сравнения – только у 34% ($p = 0.01$). Таким образом, шанс развития постинфарктной аневризмы у пациентов с сочетанием полиморфных вариантов *CC* rs2238296 гена *POLG* и *CC* rs4673 гена *CYBA* был увеличен в 5.6 (95%ДИ 1.4–22) раз. При этом пациенты с анализируемым генотипом были представлены исключительно мужчинами более молодого возраста (50 (46; 59) и 56 (50; 61) лет, $p = 0.06$), без сахарного диабета 2-го типа ($p = 0.1$) и значительно реже страдающими ожирением ($p = 0.03$) и артериальной гипертонией ($p = 0.1$) в сравнении с пациентами, имеющими другой генотип указанных генов. Только у половины из них диагностировалась артериальная гипертония (54.5%), тогда как в группе сравнения – у 84% пациентов ($p = 0.1$). Частота регистрации ХОБЛ, периферического атеросклероза, количество перенесенных инфарктов миокарда в анамнезе, возраст на момент первого ИМ и время от последнего ИМ до включения в исследование не различались. Выраженность клинических проявлений стенокардии напряжения и ХСН была сопоставима в исследуемых группах. Тем не менее при более легком коморбидном фоне фракция выброса ЛЖ у пациентов с анализируемым генотипом была существенно ниже (40 (27; 52) и 50 (40; 61), $p = 0.006$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Острая гипоксия, которой подвергаются клетки миокарда во время ишемии, приводит к развитию дисфункции клеточных органелл, в большей степени митохондрий, что является причиной недостаточной утилизации активных форм кислорода в дыхательной цепи переноса электронов. Как известно, отличительной особенностью митохондрий является наличие собственной ДНК, кодирующей компоненты дыхательной цепи. Мутации митохондриальной ДНК вызывают нарушения нормального функционирования органелл и клеток и потенцируют процессы запрограммированной клеточной гибели [11, 12].

Способность митохондрий противостоять ишемическому повреждению во многом определяется генетическими факторами. ДНК-полимераза гамма отвечает как за репликацию, так и за репарацию ДНК. Ранее было показано, что при выраженном окислительном стрессе (в частности, обработка перекисью водорода) формируются дефектные молекулы ДНК-полимеразы, функциональная активность которых существенно снижена: репликация в 2 раза, а репарация – до 20 раз [11]. В результате несовершенства фермента образуются копии мтДНК с большим количеством ошибок из-за нарушения процессов репарации. При этом в различных исследованиях продемонстрировано, что большое число копий мтДНК, а также делеции мтДНК ассоциированы с развитием сердечно-сосудистых осложнений после кардиохирургических вмешательств [13, 14].

Таким образом, кодирующий каталитическую субъединицу ДНК-полимеразы гамма ген *POLG* может являться одним из генов, определяющих предрасположенность к патологическому постинфарктному ремоделированию с развитием аневризмы ЛЖ. Однако данные по ассоциации изучаемого ОНП гена *POLG* с постинфарктными изменениями отсутствуют, как для российских, так и для зарубежных популяций. Согласно имеющимся публикациям, лейкоциты крови с мутациями в гене *POLG* более чувствительны к апоптозу, вызванному окислительным стрессом [15].

В настоящей работе проанализирован полиморфный маркер, расположенный во втором интроне гена *POLG*. Этот вариант потенциально может влиять на регуляцию транскрипции. В частности, согласно базе данных проекта GTEx, посвященного изучению тканеспецифичной генной экспрессии, этот полиморфный вариант может влиять на экспрессию данного гена в разных тканях [16]. Популяционные исследования показали,

Таблица 3. Клинико-анамнестическая характеристика пациентов с сочетанием генотипов *CC* rs2238296 гена *POLG* и *CC* rs4673 гена *CYBA* в сравнении с другими больными

Признак	Группа 1 (*CC POLG* + *CC CYBA*; *n* = 11)	Группа 2 (*n* = 142)	*p*
Пол, муж/жен, *n* (%)	11/0 (100/0)	126/16 (88.7/11.3)	0.3
Возраст, *Me* (*Q25*; *Q75*), годы	50 (46; 59)	56 (50; 61)	0.06
ФК ИБС, *n* (%)			
I	3 (27.3)	18 (12.7)	0.2
II	7 (63.6)	73 (51.4)	0.4
III	1 (9.1)	51 (35.9)	0.4
ФК ХСН (NYHA), *n* (%)			
I	1 (9.1)	7 (4.9)	0.5
II	4 (36.4)	54 (38)	0.9
III	6 (45.5)	78 (55)	0.9
IV	0	3 (2.1)	0.8
Фракция выброса левого желудочка, *Me* (*Q25*; *Q75*), %	40 (27; 52)	50 (40; 61)	0.006
Сахарный диабет, *n* (%)	0	27 (19)	0.1
Ожирение, *n* (%)	1 (10)	59 (41.5)	0.03
Артериальная гипертония, *n* (%)	6 (54.5)	119 (84)	0.1
Периферический атеросклероз, *n* (%)	5 (45.5)	80 (56.3)	0.5
Острое нарушение мозгового кровообращения, *n* (%)	6 (54)	52 (36.6)	0.2
Хроническая обструктивная болезнь легких, *n* (%)	6 (54)	76 (53.2)	0.9
Нарушения ритма сердца, *n* (%)	3 (27.3)	14 (9.8)	0.1
Возраст на момент первого инфаркта миокарда, *Me* (*Q25*; *Q75*), годы	47.7 (44.7; 54.4)	51.4 (46.6; 57)	0.3
Время от последнего инфаркта миокарда до включения в исследование, *Me* (*Q25*; *Q75*), мес.	25 (11; 49)	15 (8.5; 48.7)	0.2
Число перенесенных инфарктов миокарда, *n* (%)			
1	7 (64)	95 (67)	0.8
2	3 (27)	14 (10)	0.1
3	0	6 (4.2)	0.6
4	1 (10)	4 (2.8)	0.3

Примечание. *Me* (*Q25*; *Q75*) – медиана и интерквартильный размах; *p* – уровень значимости различий; ФК – функциональный класс; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ХСН – хроническая сердечная недостаточность.

что генотип *CC* rs2238296 *POLG* встречается примерно у 17% русских, а в популяциях коренного населения Сибири его частота несколько ниже – 12–14% [17]. Таким образом, полученные данные, в том числе по распространенности генотипа *CC* в популяции пациентов без аневризмы левого желудочка, не противоречат немногочисленным имеющимся литературным данным.

Другим геном антиоксидантной системы организма, ОНП которого ассоциирован с развитием постинфарктной аневризмы ЛЖ у больных обструктивным коронарным атеросклерозом, согласно полученным данным, является *CYBA*. Данный ген кодирует регуляторную субъединицу (p22phox) НАДФН-оксидазы, которая поддерживает окислительно-восстановительное равновесие в клет-

ках и в кровеносных сосудах. Наши результаты показывают, что генотип *CC* полиморфного варианта rs4673 гена *CYBA* ассоциирован с развитием аневризмы левого желудочка. В литературе встречаются сведения об ассоциации аллеля T с долгожительством, а также о наличии ассоциаций генотипа *CC* с развитием неблагоприятных событий у больных ишемической болезнью сердца в связи с повышением активности фермента НАДФ-Н – оксидазы и продукции активных форм кислорода [9, 18].

Таким образом, на основании проведенного исследования установлено, что генотипы *CC* rs2238296 гена *POLG* и *CC* rs4673 гена *CYBA* ассоциированы со значительным повышением риска развития постинфарктной аневризмы ЛЖ у больных с обструктивным атеросклерозом коронарных артерий. Полученные результаты являются уникальными, в зарубежной и отечественной литературе аналогичных данных не представлено. Сочетание двух генетических маркеров может повысить предсказательную точность генетических исследований в прогнозировании постинфарктного ремоделирования левого желудочка.

Основные ограничения исследования – ретроспективный дизайн, небольшая численность группы пациентов с сочетанием генотипов *CC POLG* и *CC CYBA*.

Постинфарктное ремоделирование левого желудочка с развитием его аневризмы ассоциировано с генотипом *CC* rs2238296 гена *POLG* и генотипом *CC* rs4673 гена *CYBA*. При сочетании неблагоприятных генотипов, которое встречается у 7% пациентов с обструктивным коронарным атеросклерозом, шанс развития постинфарктной аневризмы сердца увеличен в 5.6 раз, несмотря на более молодой возраст и меньшую коморбидность пациентов.

Исследование проведено в рамках госзадания, тема ФНИ № 122020300045-5.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Фомин И.В.* Хроническая сердечная недостаточность в Российской Федерации: что сегодня мы знаем и что должны делать // Рос. кардиол. журн. 2016. № 8. С. 7–13. https://doi.org/10.15829/1560-4071-2016-8-7-13
2. *Гарганеева А.А., Кужелева Е.А., Кузьмичкина М.А. и др.* Изменения характеристик и лечения больных с хронической сердечной недостаточностью, поступивших в кардиологический стационар в 2002 и 2016 годах // Кардиология. 2018. Т. 58. № 12S. С. 18–26. https://doi.org/10.18087/cardio.2605
3. *Cohn J.N., Ferrari R., Sharpe N.* Cardiac remodeling–concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling // J. Am. College Cardiology. 2000. V. 35. № 3. P. 569–582. https://doi.org/10.1016/s0735-1097(99)00630-0
4. Российское кардиологическое общество, Ассоциация сердечно-сосудистых хирургов России. Острый инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST электрокардиограммы. Клинические рекомендации 2020 // Рос. кардиол. журн. 2020. Т. 25. № 11. С. 4103. https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-4103
5. *Гарганеева А.А., Округин С.А., Борель К.Н. и др.* Инфаркт миокарда на рубеже двух столетий: демографические и социальные тенденции // Клинич. медицина. 2016. Т. 94. № 6. С. 463–467. https://doi.org/10.18821/0023-2149-2016-94-6-463-467
6. *Li Y., Liu X.* Novel insights into the role of mitochondrial fusion and fission in cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion // J. Cellular Physiology. 2018. V. 233. № 8. P. 5589–5597. https://doi.org/10.1002/jcp.26522
7. *Doğan A., Özşensoy Y., Türker F.S.* MnSOD, CAT and GPx-3 genetic polymorphisms in coronary artery disease // Mol. Biology Reports. 2019. V. 46. № 1. P. 841–845. https://doi.org/10.1007/s11033-018-4539-3
8. *Жейкова Т.В., Голубенко М.В., Буйкин С.В. и др.* Ассоциация полиморфизма Thr12Ser гена митохондриального фактора транскрипции А TFAM с ишемической болезнью сердца // Бюл. сиб. медицины. 2012. Т. 11. № 6. С. 47–50. https://doi.org/10.20538/1682-0363-2012-6-47-50
9. *Жейкова Т.В., Голубенко М.В., Буйкин С.В. и др.* Анализ ассоциаций полиморфного локуса *242C > T* гена субъединицы p22phox НАДФН-оксидазы (*CYBA*) с долгожительством в российской популяции // Генетика. 2013. Т. 49. № 3. С. 410–414.
10. *Neumann F.J., Sousa-Uva M., Ahlsson A. et al.* ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization // Rossijskij kardiol. zhurnal. 2019. № 8. P. 151–226. https://doi.org/10.15829/1560-4071-2019-8-151-226
11. *Anderson A.P., Luo X., Russell W., Yin Y.W.* Oxidative damage diminishes mitochondrial DNA polymerase replication fidelity // Nucl. Acids Res. 2020. № 1. P. 817–829. https://doi.org/10.1093/nar/gkz1018
12. *Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T.D. et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging // Science. 2005. V. 309. № 5733.

P. 481–484.
https://doi.org/10.1126/science.1112125

13. *Zhang J., Xu S., Xu Y. et al.* Relation of mitochondrial DNA copy number in peripheral blood to postoperative atrial fibrillation after isolated off-pump coronary artery bypass grafting // Am. J. Cardiology. 2017. V. 119. № 3. P. 473–477.
https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2016.10.017
14. *Levitsky S., Laurikka J., Stewart R.D. et al.* Mitochondrial DNA deletions in coronary artery bypass grafting patients // Eur. J. Cardio-Thoracic Surgery. 2003. V. 24. № 5. P. 777–784.
https://doi.org/10.1016/S1010-7940(03)00501-3
15. *Formichi P., Radi E., Branca C. et al.* Oxidative stress-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes from patients with POLG-related disorders // J. Neurological Sciences. 2016. № 368. P. 359–368.
https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.07.047
16. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. Accessed September 6, 2021. https://www.gtexportal.org/home/snp/rs2238296
17. *Буйкин С.В., Голубенко М.В., Погребенкова В.В. и др.* Ген POLG митохондриальной γ-полимеразы: частота и анализ сцепления двух единичных нуклеотидных замен (SNP) в популяциях народов Сибири // Мол. биология. 2006. Т. 40. № 6. С. 1081–1083.
18. *Racis M., Sobiczewski W., Stanisławska-Sachadyn A. et al.* NADPH oxidase gene polymorphism is associated with mortality and cardiovascular events in 7-year follow-up // J. Clin. Medicine. 2020. V. 9. № 5. P. 1475.
https://doi.org/10.3390/jcm9051475

The Role of rs2238296 of the Mitochondrial DNA Polymerase Gamma Gene in Combination with Polymorphic Variants of Antioxidant Defense Genes in the Development of Postinfarction Left Ventricular Aneurysm

E. A. Kuzheleva[a], *, A. A. Garganeeva[a], O. V. Tukish[a], A. K. Nesova[a], M. V. Golubenko[b], S. L. Andreev[a], and V. M. Shipulin[a]

[a] *Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634012 Russia*
[b] *Scientific Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia*
**e-mail: kea@cardio-tomsk.ru*

Studied the relationship of the polymorphic variant of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (*POLG* rs2238296) in combination with single-nucleotide polymorphic variants of the genes of the antioxidant system of the body (mitochondrial transcription factor A (*TFAM* rs1937), superoxide dismutase (*SOD2* rs4880), glutathione peroxidase (*GPX1* rs1050450), catalase (*CAT* rs1001179), paraoxonase 1 (*PON1* rs854560) and NADP-H oxidase (*CYBA* rs4673)) with features of postinfarction remodeling of the left ventricle (LV). One hundred and fifty-three patients with coronary heart disease (137 men and 16 women) aged 56 (50; 60.5) years were examined. Genotyping was carried out using a polymerase chain reaction followed by analysis of the polymorphism of the lengths of restriction fragments. No significant difference was found in the *SOD2*, *GPX1*, *CAT*, *PON1*, *TFAM* genes in the studied groups. Significant differences were found with respect to the *POLG* and *CYBA* genes: the *CC* rs2238296 genotype of the *POLG* gene was found in every third patient with LV aneurysm (30.3%), where as in the group without aneurysm – only in every eighth case (12.3%, $p = 0.006$). The *CC* rs4673 genotype of the *CYBA* gene was found in every second patient with an aneurysm (51.8%) and in 32% without LV aneurysm ($p = 0.01$). Patients with a combination of *CC* (*POLG*) and *CC* (*CYBA*) genotypes were represented exclusively by younger men, who were characterized by a less burdened comorbid background, in comparison with patients with a different genotype of these genes. At the same time, the LV ejection fraction in such patients was significantly lower (40 (27; 52) and 50 (40; 61), $p = 0.006$), and the development of LV aneurysm was recorded in 73% of cases.

Keywords: postinfarction aneurysm, *POLG*, *CYBA*, chronic heart failure, atherosclerosis coronary artery.